



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/15/2021 (EHK 1189)

Detekce CMV - DNA

Praha, červenec 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	4
5.	Vyhodnocení	5
6.	Závěr	12
	Příloha – výsledkový protokol jednotlivé laboratoře	

Program zkoušení způsobilosti PT#M/15/2021 byl zaměřen na detekci CMV-DNA. Návrh a realizace PT#M/15/2021 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 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. individuální vyhodnocení jednotlivých laboratoří, je rozesílána poštou.

Za správnost výsledků ručí koordinátor příslušného cyklu EHK.

Zprávu vypracoval:

MUDr. Vlasta Štěpánová, Ph.D. (FN Hradec Králové, ÚKM, NRL pro CMV)

Zprávu autorizoval:

MUDr. Jana Kozáková

Tel: 267 082 260

Dne: 22. 7. 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/15/2021

Identifikace cyklu:	EHK 1189
Název:	Detekce CMV - DNA
Koordinátor:	MUDr. Kozáková
Subdodavatel:	FN Hradec Králové, ÚKM, NRL pro CMV, MUDr. Vlasta Štěpánová, Ph.D.
Charakteristika materiálu:	Viz kapitola 3
Podstata a účel PT/EHK:	Kvalitativní a kvantitativní průkaz CMV DNA
Kritéria pro účast na PT/EHK:	Požadavky na laboratoře: zajištění laboratorních procesů podle ČSN EN ISO 15189:2013
Způsob přípravy:	viz kapitola 2
Množství připravovaného testovaného materiálu:	Cca pro 30 laboratoří
Označení vzorkovnic:	EHK 1189, PT # M/15, č. 1 – 6, 23. 3. 2021
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.
Test homogenity a stability:	Provádí se 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, záměna vzorků, lidský faktor
Počet účastníků:	29
Termín distribuce:	23. 3. 2021
Způsob distribuce:	přepravní službou (zajišťuje Koordinační pracoviště)
Předání výsledků:	písemně na předepsaných formulářích
Způsob vyhodnocení výsledků:	Viz kapitola 4
Určení maximální směrodatné odchylky:	aritmetický průměr minus 2 směrodatné odchylky
Určení přijaté vztažné hodnoty:	Za správnou hodnotu (kopie/ml) je považován výsledek získaný jako průměr ze všech hodnot získaných ze zúčastněných laboratoří
Termín uveřejnění očekávaných výsledků:	6. 5. 2021
Termín uveřejnění závěrečné zprávy:	Do 20. 7. 2021

2. Způsob přípravy vzorků

Výchozím materiálem byl kmen CMV AD169, který se dlouhodobě uskládá při -80°C . Před použitím byl rozmražen a opakovaně pasážován na buněčné kultuře lidských embryonálních fibroplastů (LEP). Pasážovaný virus byl z infikovaných buněk uvolněn opakovaným krátkodobým zmražením (-20°C) a rozmražením a sonifikací ultrazvukem. Poté byla provedena orientační kvantifikace CMV DNA. Následně byl poolován do lidské testované plazmy tak, aby vznikly požadované kvantitativní vzorky panelu EHK. Po provedení testování byly vzorky rozpipetovány po 0,6 ml do předem označených 1,5 ml zkumavek. Do doby transportu byly vzorky uloženy při -20°C .

3. Charakteristika materiálu

6 vzorků s 1 ml plazmy pro stanovení CMV DNA

Tab. č. 1: Panel EHK.

Vzorek	Obsah vzorku ¹	Správný výsledek EHK	
		kvalitativně	kvantitativně (kopie/ml)
NRL CMV 21-01	CMV AD169	silně pozitivní	$7,26 \cdot 10^6$
NRL CMV 21-02	CMV AD169	negativní	0
NRL CMV 21-03	CMV AD169	pozitivní	$6,83 \cdot 10^3$
NRL CMV 21-04	CMV AD169	pozitivní	$5,03 \cdot 10^4$
NRL CMV 21-05	CMV AD169	negativní	0
NRL CMV 21-06	CMV AD169	pozitivní	$3,54 \cdot 10^3$

¹Jako matrice vzorku byla u vzorků 21-01 až 21-06 použita testovaná negativní plazma.

4. Způsob hodnocení

Za správnou hodnotu (kopie/ml) je považován výsledek získaný jako průměr ze všech hodnot získaných ze zúčastněných laboratoří.

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).

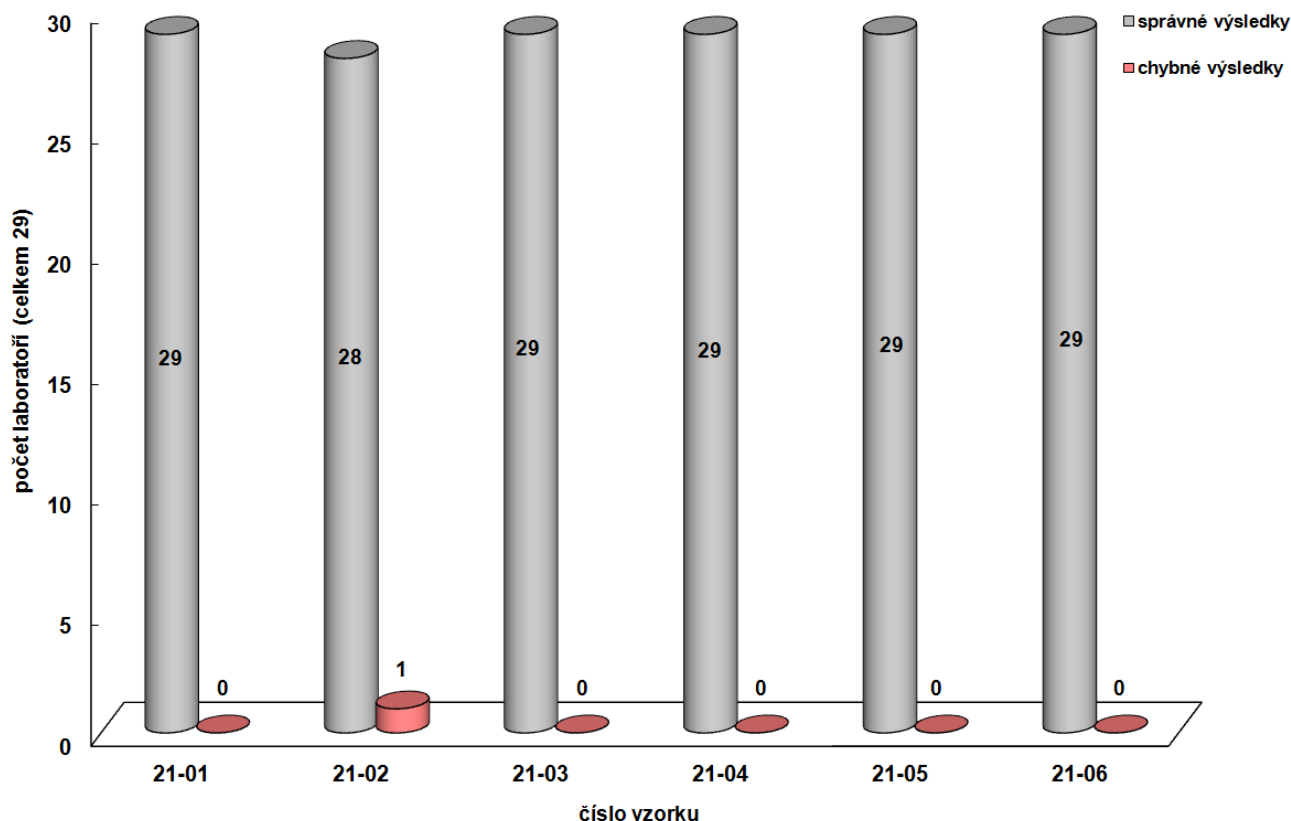
Laboratoř se může účastnit pouze kvalitativního určení CMV DNA, jehož výsledek je zásadní pro úspěšnost v EHK.

5. Vyhodnocení

Kvalitativní vyhodnocení – celkem 29 laboratoří

Tab. č. 2: Vyhodnocení kvalitativních výsledků (celkem 29 panelů).

Vzorek	Výsledek EHK	Získaný počet bodů za správný výsledek	Počet výsledků - správných/celkem	Úspěšnost
NRL CMV 21-01	silně pozitivní	3	29/29	100,0 %
NRL CMV 21-02	negativní	3	28/29	96,6 %
NRL CMV 21-03	pozitivní	2	29/29	100,0 %
NRL CMV 21-04	pozitivní	2	29/29	100,0 %
NRL CMV 21-05	negativní	3	29/29	100,0 %
NRL CMV 21-06	pozitivní	2	29/29	100,0 %



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

Celkem bylo možné získat **15 bodů**, kterých dosáhlo 28 laboratoří (tj. 96,6 %), kvalitativní hodnocení těchto laboratoří bylo **výborné**. Jedna laboratoř (č. laboratoře 34) vydala **falešnou pozitivitu u vzorku NRL CMV 21-02** a získala celkově v kvalitativním hodnocení 12 bodů, tj.

velmi dobré výsledky. Falešná pozitivita byla způsobena chybnou technikou pipetování buď při izolaci CMV DNA, nebo při přípravě PCR (jednalo se o kontaminaci od vzorku NRL CMV 21-01).

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) – laboratoře s těmito výsledky neuspěly.

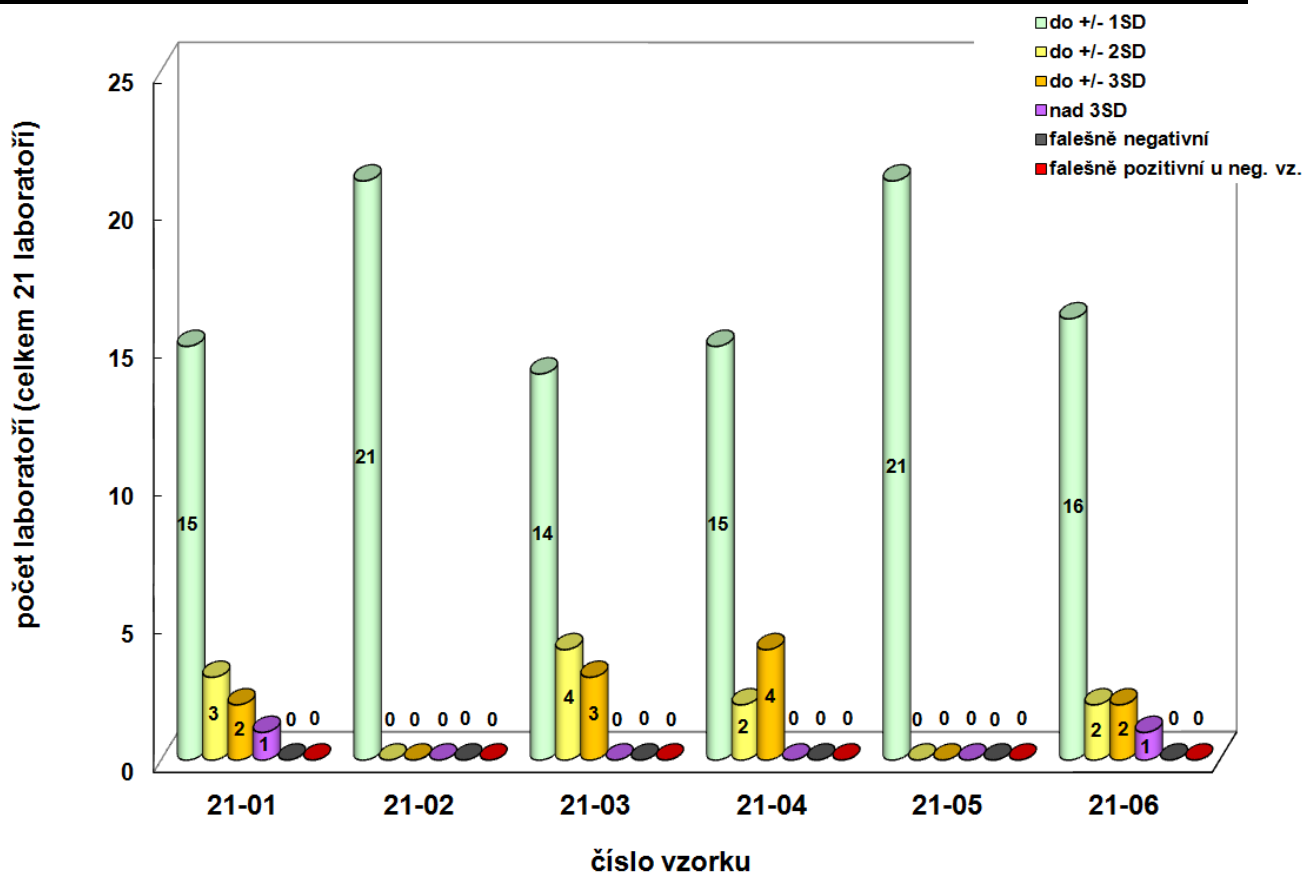
Tab. č. 3: Kvantitativní výsledky vzorků EHK a jednotlivá rozmezí směrodatných odchylek.

Vzorek	Výsledek EHK kopie/ml ¹	Rozmezí		
		+/- 1 SD ² (kopie/ml)	+/- 2 SD ² (kopie/ml)	+/- 3 SD ² (kopie/ml)
NRL CMV 21-01	7,26.10 ⁶	3,64.10 ⁶ – 1,45.10 ⁷	1,83.10 ⁶ – 2,88.10 ⁷	9,19.10 ⁵ – 5,73.10 ⁷
NRL CMV 21-02	0	0	0	0
NRL CMV 21-03	6,83.10 ³	3,22.10 ³ – 1,45.10 ⁴	1,52.10 ³ – 3,07.10 ⁴	7,17.10 ² – 6,51.10 ⁴
NRL CMV 21-04	5,03.10 ⁴	2,56.10 ⁴ – 9,91.10 ⁴	1,30.10 ⁴ – 1,95.10 ⁵	6,59.10 ³ – 3,84.10 ⁵
NRL CMV 21-05	0	0	0	0
NRL CMV 21-06	3,54.10 ³	1,66.10 ³ – 7,53.10 ³	7,81.10 ² – 1,60.10 ⁴	3,67.10 ² – 3,41.10 ⁴

¹Průměr hodnot všech laboratoří u jednotlivých vzorků. ² 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 21-01	15	3	2	1	0	0
NRL CMV 21-02	21	0	0	0	0	0
NRL CMV 21-03	14	4	3	0	0	0
NRL CMV 21-04	15	2	4	0	0	0
NRL CMV 21-05	21	0	0	0	0	0
NRL CMV 21-06	16	2	2	1	0	0
Počet přidělených bodů za výsledek v daném intervalu	1	2	3	4	5	5



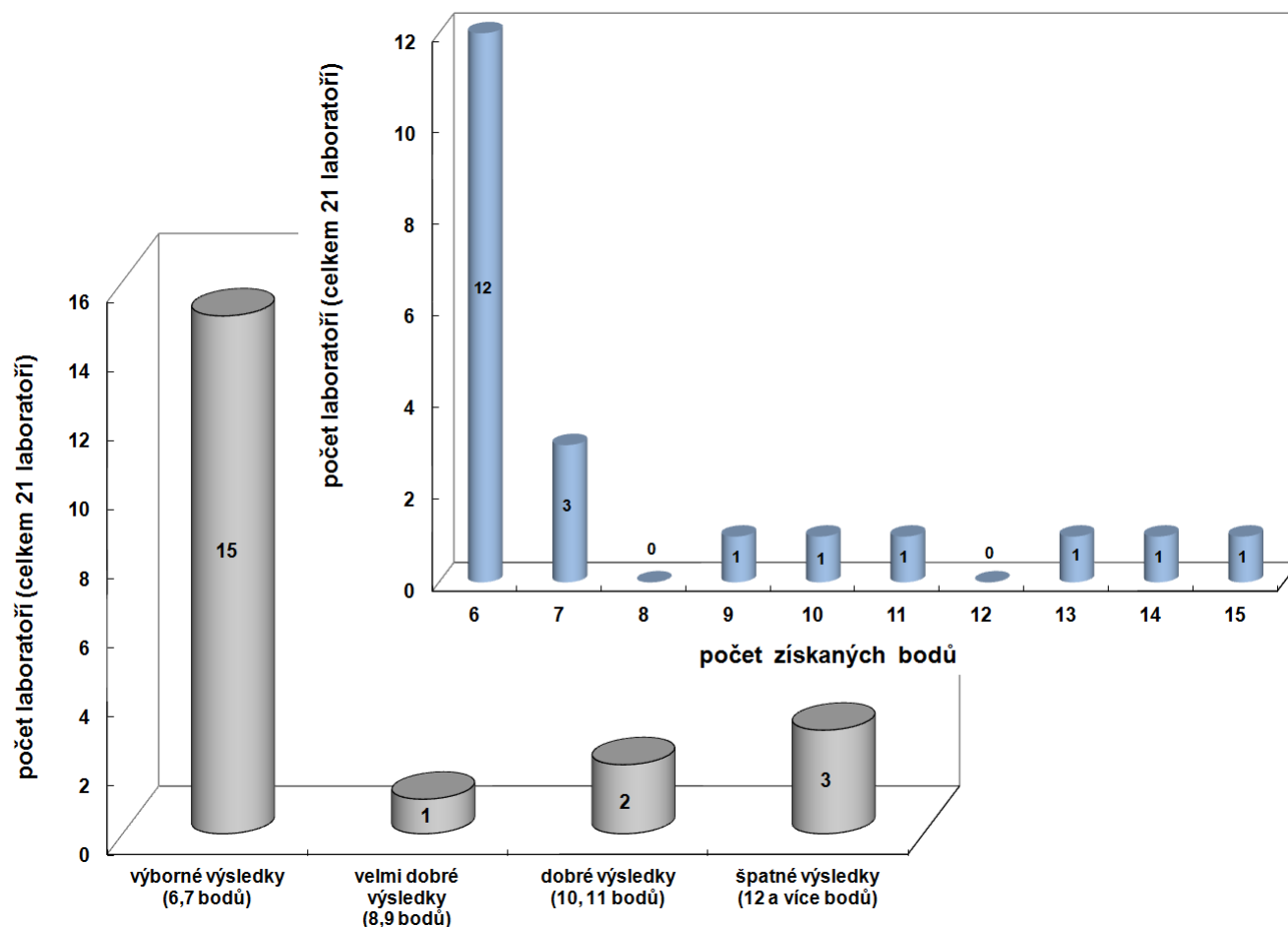
Graf č. 2: Vyhodnocení kvantitativních výsledků u jednotlivých vzorků.

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

Celkový počet získaných bodů	Počet panelů	Procentuální zastoupení
6 bodů (nejlepší)	12	57,1 %
7 bodů	3	14,3 %
8 bodů	0	--
9 bodů	1	4,8 %
10 bodů	1	4,8 %
11 bodů	1	4,8 %
12 bodů	0	--
13 bodů	1	4,8 %
14 bodů	1	4,8 %
15 bodů	1	4,8 %

Z celkového počtu 21 hodnocených laboratoří mělo všechny kvantitativní výsledky v rozmezí +/- 1 SD (tj. zisk 6 bodů) 12 laboratoří. Nejhorší skóre (nejvyšší počet získaných bodů) - 15 bodů získala jedna laboratoř (č. laboratoře 748), která výsledky systematicky nadhodnocovala (celkově hodnoceno jako neakceptovatelné kvantitativní výsledky).

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 18 laboratoří. Neakceptovatelné kvantitativní výsledky se v letošním roce objevily u 3 laboratoří (13, 14 a 15 získaných bodů).



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

Doplňující informace:

Dotazník vyplnilo všech 29 laboratoří (8 laboratoří s kvalitativním průkazem a 21 s kvantitativním průkazem).

Akreditace ČIA, SAK, SNAS

- ano – 18 laboratoří (5 laboratoří s kvalitativním průkazem, 13 s kvantitativním průkazem) - 16× ČIA, 2× SAK
- ne – 10 laboratoří (3 laboratoře s kvalitativním průkazem, 8 s kvantitativním průkazem)
- 1 laboratoř řádně nevyplnila tuto otázku

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

- ano – 11 laboratoří (audit NASKL II; 1 laboratoř má akreditaci SAK a audit NASKLII)
- ne – 17 laboratoří
- nevyplněno – 1 laboratoře

Izolace

Typ izolace	Počet laboratoří	Izolační kit od firmy	Název izolačního kitu
kolonky	14 laboratoří	<i>GeneProof</i> – 5 laboratoří	Pathogen Free DNA Isolat. Kit (4×)
			DNA Isolation Kit (1×)
		<i>QIAGEN</i> – 6 laboratoří	QIAamp DNA Mini Kit (2×)
			QIAamp Blood Mini Kit (2×)
			QIAamp kit (1×)
			QIACube QIAamp DNA Mini Kit (1×)
<i>Roche</i> – 1 laboratoř	High Pure Viral NA Kit (1×)		
magnetické partikule	15 laboratoří	<i>ELITech group</i> – 1 laboratoř	ELITe InGenius SP200 (1×)
		<i>GeneProof</i> – 3 laboratoř	croBEE 201A Nucleic Acid Extraction Kit (3×)
		<i>QIAGEN</i> – 1 laboratoř	Biorobot EZ1+EZ1 DSP Virus Kit (1×)
		<i>RBCBioscience</i> – 2 laboratoř	MagCore Viral Nucleic Acid Extraction Kit (2×)
		<i>Roche</i> – 3 laboratoře	MagNA Pure Nucleic Acid Isolation Kit (1×)
			MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit (1×)
			COBAS AmpliPrep Total Nucleic Acid (1×)
		<i>Sacace</i> – 4 laboratoře	SaMag SACACE Viral Nucleic Acid Extraction Kit (4×)
		<i>BioVendor</i> – 1 laboratoř	MT-Prep Viral/Pathogen Nucleic Acids Extraction kit B (1×)
<i>Seegene</i> – 1 laboratoř	STARMag ProPrep (plate type) (1×)		
<i>STRATEC MOLECULAR</i> – 1 laboratoř	InviMag Universal Kit (1×)		
jiné	---		

Metodika

- kvalitativní vyšetření – 8 laboratoří
- kvantitativní vyšetření – 21 laboratoří

z toho:

konvenční PCR (žádná laboratoř)	komerční	---
	in-house	---
real-time PCR (29 laboratoří)	komerční	27 laboratoří (8× kvalitativně a 19× kvantitativně)
	in-house	2 laboratoře (kvantitativně)

Pozn.:

- všechny laboratoře používají pouze real-time PCR
- všech 8 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, které musí být plně validovány

použité komerční kity (19 laboratoří)

- všech 19 laboratoří používá kity s CE značkou

Firma	Počet laboratoří	Název kitu
Argene	1 laboratoř	CMV R-gene
ELITech group	1 laboratoř	Elite CMV MGB Kit
GeneProof	14 laboratoří	Cytomegalovirus PCR Kit
InterLabService	1 laboratoř	AmpliSens CMV-Screen/Monitor FRT PCR Kit
QIAGEN	1 laboratoř	artus CMV LC RT-PCR Kit
Roche	1 laboratoř	COBAS TaqMan CMV Test
Sacace Biotechnologies	7 laboratoří	CMV Real-TM a CMV Real-TM Quant
Diagenode	1 laboratoř	H-Dia CMV Q

použité přístroje

Firma	Přístroj	Počet laboratoří	Typ přístroje
BioRad	Bio-Rad CFX	3 laboratoře	CFx96 (2×)
			CFx384 (1×)
Cepheid	SmartCycler	1 laboratoř	Smart Cycler (1×)
ELITech group	ELITe In Genius	1 laboratoř	ELITe In Genius (1×)
GeneProof	croBEE Real-Time PCR System	4 laboratoře	croBEE Real-Time PCR System (4×)
Hangzhou Bioer Technology co., Ltd	Line Gene	1 laboratoř	Line Gene (1×)
QIAGEN	Rotor-Gene	13 laboratoří	6000 (5×)
			Q (7×)
			neoznačen (1×)
Roche	LightCycler	4 laboratoře	typ 1.5 (1×)
			typ 2.0 (2×)
	COBAS TaqMan	1 laboratoř	COBAS TaqMan (1×)
Sacace Biotechnologies	Sacycler	1 laboratoř	Sacycler 96 (1×)

Inhibiční kontrola

- Kontrola inhibice je součástí vyšetření CMV DNA u všech 29 laboratoří (včetně 2 laboratoří, které používají in-house real-time PCR metodu). 2 laboratoře (58, 748) v dotazníku zaškrtnula, že IC není součástí vyšetření, přestože používaný kit dle údajů zveřejněných výrobcem deklaruje přítomnost IC jako součást analýzy.
- Inhibice nebyla u žádného vzorku, přesto laboratoř 34 v dotazníku zaškrtnula inhibice ANO (laboratoř ale inhibici ve výsledkovém a dotazníkovém protokolu neuvedla).

6. Závěr

Do letošního EHK 1189 se přihlásilo 30 laboratoří, jedna laboratoř výsledky nevrátila zpět k vyhodnocení. Hodnotilo se tedy 29 panelů (96,7 %). Počet panelů s kvalitativními výsledky byl 29 (100 %). Počet panelů s kvantitativními výsledky byl 21 (72,4%).

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

KONEC ZÁVĚREČNÉ ZPRÁVY