



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/13-14/2018 (č. 1013-1014)

Detekce HBV-DNA a HCV-RNA

Praha, květen 2018

Obsah

1. Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT (Proficiency Testing) 3
2. Hodnocení 4-7
3. Příloha – výsledkový protokol jednotlivé laboratoře

Program zkoušení způsobilosti PT#M/13-14/2018 byl zaměřen na detekci HBV-DNA a HCV-RNA. Návrh a realizace PT#M/13-14/2018 byly prováděny podle standardního operačního postupu SOP M/13-14 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.

Příloha závěrečné zprávy, tj. ohodnocený výsledkový protokol, je rozesílána poštou.

Koordinátor:

Mgr. Pavel Fritz
tel: 267 082 484 (2 455)
email: pavel.fritz@szu.cz

Zprávu vypracoval:

Mgr. Pavel Fritz, NRL pro virové hepatitidy, SZÚ Praha

Zprávu schválil:

RNDr. Vratislav Němeček, SSc., NRL pro virové hepatitidy, SZÚ Praha

Dne: 15. 5. 2018

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

www.szu.cz/espt
email: apcem@szu.cz

Souhrnné informace o přípravě a hodnocení EPT#M/13-14/2018 (EHK1013-1014)

Identifikace kola:	PT#M/13-14/2018 (EHK1013-1014)
Název:	Detekce HBV-DNA (EHK1013) a HCV-RNA (EHK1014)
Poskytovatel:	SZÚ – CEM – ESPT, Šrobárova 48, Praha 10, 100 42
Vedoucí ESPT	Ing. Věra Vrbíková
Koordinátor:	Mgr. Pavel Fritz Národní referenční laboratoř pro virové hepatitidy TEL.: +420 267082484 (2455); email: pavel.fritz@szu.cz
Charakteristika materiálu:	Lidské sérum / plazma
Podstata a účel PT:	Průkaz HBV-DNA (DNA viru hepatitidy B) a HCV-RNA (RNA viru hepatitidy C)
Kritéria pro účast na PT/EHK:	Vyšetření všech vzorků metodou PCR a odeslání výsledků ve stanoveném termínu
Způsob přípravy:	Výchozím materiálem je lidská plazma/sérum, otestovaná na přítomnost cílových markerů. Pozitivní vzorky mohou být použity v ředěném stavu.
Množství připravovaného materiálu:	35 sad pro HBV-DNA a 40 sad pro HCV-RNA (1 sada = 6 vzorků po 1,5 ml)
Označení vzorkovnic:	a) PT#M/13/2018 EHK1013, vzorky 1-6, HBV-DNA b) PT#M/14/2018 EHK1014, vzorky 1-6, HCV-RNA
Zabezpečení kvality vzorku:	1. Obsahuje-li výchozí materiál po rozmrazení viditelné částice organického původu (bílkoviny, tuky), jsou tyto nečistoty odstraněny centrifugací. 2. Pro zajištění stability je do výchozího materiálu přidáván ProClin 950 s antibakteriálními účinky v koncentraci 0,05-0,1%.
Testy homogenity a stability:	1. Výchozí materiál (neředěný nebo v požadovaném ředění) je testován na přítomnost cílového markeru (dle SOP-NRL/VH-16) 2. Finální vzorek je testován na přítomnost cílového markeru (dle SOP-NRL/VH-16)
Podmínky distribuce a uchovávání vzorků:	Vzhledem k přidání antibakteriálního činidla lze vzorky po dobu 1 měsíce (do vypršení termínu pro jejich vyšetření) uchovávat zamražené nebo v chladu (2-8 ⁰ C), krátkodobě rovněž při pokojové teplotě.
Počet účastníků:	34
Datum rozeslání vzorků:	26. 3. - 29. 3. 2018
Způsob distribuce:	Účastníci si vyzvedávají vzorky se suchým ledem v NRL pro virové hepatitidy.
Termín odevzdání výsledků:	26. 4. 2018
Způsob vyhodnocení výsledků:	Nejslabší pozitivní vzorky v obou sériích nejsou hodnoceny (slouží účastníkům k ověření citlivosti používaných metod). U silně reaktivních nebo negativních vzorků znamená každý neshodný výsledek konečné hodnocení „laboratoř neuspěla“.
Určení vztažné hodnoty:	Hodnoty získané v NRL
Rozeslání výsledků účastníkům:	Květen 2018 (poštou)

CHARAKTERISTIKA SÉRIÍ EHK 1013-1014 A ZPŮSOB HODNOCENÍ

Série EHK 1013 byla určena pro stanovení přítomnosti DNA viru hepatitidy B, série EHK 1014 pro stanovení RNA viru hepatitidy C. Obou sérií se zúčastnilo celkem 34 laboratoří, z nichž 5 testovalo pouze HCV-RNA, zbývajících 29 oba markery.

Každou ze sérií tvořilo 6 vzorků, z nichž 3 byly pozitivní a 3 negativní. Objem vzorků činil cca 1,5 ml lidského séra nebo plazmy.

Nejslabší pozitivní vzorky v obou sériích (vzorek č. 6 v sérii EHK 1013 a vzorek č. 5 v sérii EHK 1014) sloužily účastníkům k ověření citlivosti používaných metod a nebyly součástí bodového hodnocení. U zbývajících vzorků znamenal každý neshodný výsledek pro účastníka hodnocení „laboratoř neuspěla“ (netýká se odchylek v kvantifikaci).

Vzorky byly distribuovány v Národní referenční laboratoři pro virové hepatitidy (NRL-VH) od 26. do 29. 3. 2018, konečným termínem pro odevzdání výsledků byl 26. 4. 2018.

KONCENTRACE CÍLOVÝCH MARKERŮ V POZITIVNÍCH VZORCÍCH

V sérii EHK 1013 činily koncentrace HBV-DNA naměřené v NRL-VH $1,5 \times 10^2$ IU/ml (vzorek 6), $1,8 \times 10^3$ (vzorek 1) a $5,2 \times 10^4$ (vzorek 4). V sérii EHK 1014 činily naměřené koncentrace HCV-RNA $7,2 \times 10^1$ IU/ml (vzorek 5), $8,2 \times 10^2$ (vzorek 6) a $6,4 \times 10^3$ (vzorek 2).

Výsledky získané v referenční laboratoři nelze brát jako přesný standard. Při testování nukleových kyselin metodou PCR existuje přirozený rozptyl hodnot v závislosti na typu použité soupravy i specifických podmínkách každého běhu.

V zájmu lepšího zmapování citlivosti používaných testů byl nejslabší pozitivní vzorek v sérii EHK 1014 nastaven s výjimečně nízkou koncentrací HCV-RNA (méně než 100 IU/ml), což představovalo důležitý rozdíl oproti předcházejícím sériím.

Kvantifikace pozitivních výsledků nebyla povinná ani bodově hodnocená, výraznější nepřesnosti se však promítly do komentáře referenční laboratoře. Celkem kvantifikovalo své výsledky 23 laboratoří u markeru HBV-DNA (79%) a 28 u markeru HCV-RNA (82%).

VÝSLEDKY LABORATOŘÍ

Celkové výsledky ukazuje tabulka 1, kvantitativní hodnoty získané účastníky jsou shrnuty v tabulkách 2-3 (Národní referenční laboratoř pro virové hepatitidy figuruje ve všech tabulkách pod pořadovým č. 1). Laboratoře, které testovaly některý z markerů více testy, nebo kvantifikovaly výsledky za použití dvojích jednotek, jsou v tabulkách 2-3 uvedeny ve dvou řádcích.

V sériích EHK 1013-1014 se nevyskytly žádné chyby u bodovaných vzorků. U nebudovaných vzorků (nejslabší pozitivní vzorky v obou sériích) byl zaznamenán jeden neshodný výsledek u markeru HBV-DNA (3,5% z 29 laboratoří) a 13 neshodných výsledků u markeru HCV-RNA (38% z 34 laboratoří). Skutečnost, že v případě hepatitidy typu C vykazala falešnou negativitu u nejslabšího pozitivního vzorku více než třetina účastníků, byla zapříčiněna výjimečně nízkou koncentrací cílového markeru. V předcházejícím roce 2017 se koncentrace HCV-RNA v nejslabším pozitivním vzorku pohybovala mezi 100 a 300 IU/ml (interval do něhož se vešla většina laboratoří), přičemž negativitu vykázal pouze jediný účastník z 36.

Bez větších problémů si účastníci poradili s kvantifikací. Rozptyl hodnot lze studovat v tabulkách 2-3. Například laboratoř č. 35 poněkud nadhodnotila koncentrace v sérii 1013, zatímco laboratoř č. 19 podhodnotila vzorky č. 6 v obou sériích. Laboratoř č. 32 naopak nadhodnotila vzorek č. 6 v sérii 1014. V případě laboratoří, které kvantifikovaly za použití dvojích jednotek, byly hodnoty v kopiích/ml o něco vyšší než v IU/ml, což je odpovídající.

Celkově lze série EHK 1013 a 1014 hodnotit jako úspěšné. Nejvýraznějším prvkem bylo zařazení velmi slabého vzorku 5 v sérii EHK 1014, které se podepsalo na vysokém počtu falešných negativit. Za tímto krokem nestála snaha organizátorů zvýšit chybovost, či někoho „nachytat“ (šlo o nehodnocený vzorek), nýbrž poskytnout účastníkům cenné informace o citlivosti používaných metod. Do budoucna lze podobný postup očekávat i u kontrolních vzorků pro testování HBV-DNA.

Není pochyb, že citlivost používaných metod PCR může hrát v klinické praxi významnou roli. Zmínit lze v současnosti zaznamenané případy tzv. „okultní hepatitidy B“ (OBI), definované negativitou klíčového sérologického markeru HBsAg a velmi nízkou koncentrací HBV-DNA.

Tab.1: souhrnné výsledky v sériích EHK 1013 a 1014 (P = pozitivní, N = negativní)

lab.	HBV-DNA						HCV-RNA					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
	++	N	N	+++	N	+	N	+++	N	N	+	++
1-NRL	P	N	N	P	N	P	N	P	N	N	P	P
2	P	N	N	P	N	P	N	P	N	N	P	P
3	P	N	N	P	N	N	N	P	N	N	N	P
4	P	N	N	P	N	P	N	P	N	N	P	P
5	P	N	N	P	N	P	N	P	N	N	N	P
6	P	N	N	P	N	P	N	P	N	N	P	P
7	P	N	N	P	N	P	N	P	N	N	P	P
8	P	N	N	P	N	P	N	P	N	N	P	P
9	P	N	N	P	N	P	N	P	N	N	P	P
10	P	N	N	P	N	P	N	P	N	N	N	P
11	P	N	N	P	N	P	N	P	N	N	P	P
12	-	-	-	-	-	-	N	P	N	N	P	P
13	P	N	N	P	N	P	N	P	N	N	P	P
14	-	-	-	-	-	-	N	P	N	N	P	P
15	P	N	N	P	N	P	N	P	N	N	P	P
16	P	N	N	P	N	P	N	P	N	N	P	P
17	P	N	N	P	N	P	N	P	N	N	N	P
18	P	N	N	P	N	P	N	P	N	N	P	P
19	P	N	N	P	N	P	N	P	N	N	N	P
20	P	N	N	P	N	P	N	P	N	N	N	P
21	P	N	N	P	N	P	N	P	N	N	P	P
22	P	N	N	P	N	P	N	P	N	N	N	P
23	P	N	N	P	N	P	N	P	N	N	P	P
24	-	-	-	-	-	-	N	P	N	N	P	P
25	P	N	N	P	N	P	N	P	N	N	N	P
26	P	N	N	P	N	P	N	P	N	N	N	P
27	P	N	N	P	N	P	N	P	N	N	P	P
28	P	N	N	P	N	P	N	P	N	N	N	P
29	-	-	-	-	-	-	N	P	N	N	P	P
30	P	N	N	P	N	P	N	P	N	N	P	P
31	P	N	N	P	N	P	N	P	N	N	N	P
32	-	-	-	-	-	-	N	P	N	N	P	P
33	P	N	N	P	N	P	N	P	N	N	N	P
34	P	N	N	P	N	P	N	P	N	N	P	P
35	P	N	N	P	N	P	N	P	N	N	N	P

V záhlaví tabulky je uveden cílový marker, číslo vzorku a správný výsledek (pozitivní vzorky jsou prezentovány jedním až třemi křížky podle koncentrace cílového markeru). Problematické výsledky jsou vybarveny šedě; proškrtnuté pole znamená, že laboratoř marker netestovala. Vzorky nebyly individuálně kódovány, takže jejich čísla v tabulce jsou shodná s čísly, pod kterými je laboratoře vyšetřovaly. Pořadová čísla laboratoří v tabulce nemají souvislost s jejich zavedenými kódy v EHK. NRL pro VH je v tabulce uvedena pod č.1.

Tab. 2: kvantitativní výsledky HBV-DNA v sérii EHK-1013 (P = pozitivní, N = negativní)

poř. č.	1	2	3	4	5	6	jednotky
	++	N	N	+++	N	+	
1-NRL	1,81x10e3	N	N	5,20x10e4	N	1,46x10e2	IU/ml
2	P	N	N	P	N	P	
3	1,04x10e3	N	N	1,80x10e4	N	N	IU/ml
4	2,07x10e3	N	N	5,04x10e4	N	1,43x10e2	IU/ml
5	3,09x10e3	N	N	1,16x10e5	N	4,28x10e2	IU/ml
6	5,30x10e3	N	N	1,41x10e5	N	1,35x10e2	IU/ml
7	P	N	N	P	N	P	
8	P	N	N	P	N	P	
9	7,81x10e3	N	N	1,35x10e5	N	2,14x10e2	IU/ml
10	3,94x10e3	N	N	1,20x10e5	N	7,88x10e1	IU/ml
11	P	N	N	P	N	P	
12							
13	3,97x10e3	N	N	1,28x10e5	N	2,00x10e2	IU/ml
14							
15	2,97x10e3	N	N	8,25x10e4	N	1,25x10e2	IU/ml
16	3,81x10e3	N	N	9,19x10e4	N	1,94x10e2	IU/ml
17	P	N	N	P	N	P	
18	6,62x10e3	N	N	1,44x10e5	N	2,40x10e2	IU/ml
19	7,00x10e3	N	N	2,10x10e5	N	0,36x10e1	IU/ml
20	2,73x10e3	N	N	6,71x10e4	N	1,94x10e2	IU/ml
	1,20x10e3	N	N	3,56x10e4	N	P	
21	3,00x10e3	N	N	5,60x10e4	N	1,08x10e2	IU/ml
22	9,73x10e3	N	N	2,90x10e5	N	1,98x10e2	IU/ml
23	4,84x10e2	N	N	1,08x10e4	N	5,10x10e1	IU/ml
24							
25	5,63x10e3	N	N	1,44x10e5	N	1,50x10e2	IU/ml
26	P	N	N	P	N	P	
27	6,75x10e3	N	N	1,16x10e5	N	1,71x10e2	IU/ml
28	1,03x10e4	N	N	3,68x10e5	N	1,51x10e2	IU/ml
29							
30	2,50x10e3	N	N	7,50x10e4	N	1,20x10e2	IU/ml
31	1,05x10e4	N	N	3,29x10e5	N	2,84x10e2	IU/ml
	7,29x10e4	N	N	1,34x10e6	N	1,16x10e3	cop/ml
32							
33	5,80x10e3	N	N	1,50x10e5	N	2,30x10e2	IU/ml
34	6,80x10e3	N	N	1,80x10e5	N	2,70x10e2	IU/ml
35	2,20x10e4	N	N	2,70x10e5	N	1,34x10e3	IU/ml
	1,06x10e5						cop/ml

Laboratoře, u nichž nejsou uvedeny číselné hodnoty, své výsledky nekvantifikovaly. Laboratoř č. 20 vyšetřovala HBV-DNA dvěma testy; laboratoře č. 31 a 35 kvantifikovaly výsledky za použití dvojích jednotek. Pořadová čísla laboratoří v této tabulce nemají souvislost s jejich zavedenými kódy v EHK (NRL pro VH uvedena pod číslem 1).

Tab.3: kvantitativní výsledky HCV-RNA v sérii EHK-1014 (P = pozitivní, N = negativní)

poř. č.	1	2	3	4	5	6	jednotky
	N	+++	N	N	+	++	
1-NRL	N	6,37x10e3	N	N	7,24x10e1	8,17x10e2	IU/ml
2	N	P	N	N	P	P	
3	N	7,25x10e3	N	N	N	1,98x10e3	IU/ml
4	N	3,71x10e3	N	N	1,60x10e1	3,98x10e2	IU/ml
5	N	5,00x10e3	N	N	N	1,00x10e3	IU/ml
6	N	3,49x10e3	N	N	5,08x10e1	4,71x10e2	IU/ml
	N	3,35x10e3	N	N	1,70x10e1	5,06x10e2	IU/ml
7	N	P	N	N	P	P	
8	N	P	N	N	P	P	
9	N	6,99x10e3	N	N	4,99x10e1	9,28x10e2	IU/ml
10	N	8,00x10e3	N	N	N	5,14x10e2	IU/ml
11	N	P	N	N	P	P	
12	N	3,30x10e3	N	N	4,15x10e1	3,70x10e2	IU/ml
13	N	2,99x10e3	N	N	2,70x10e1	3,12x10e2	IU/ml
14	N	2,38x10e3	N	N	2,00x10e1	3,78x10e2	IU/ml
15	N	6,05x10e3	N	N	1,51x10e1	5,90x10e2	IU/ml
16	N	8,94x10e3	N	N	3,40x10e1	7,15x10e2	IU/ml
17	N	P	N	N	N	P	
18	N	5,84x10e3	N	N	7,70x10e1	9,47x10e2	IU/ml
19	N	6,40x10e3	N	N	N	0,28x10e1	IU/ml
20	N	9,04x10e3	N	N	N	6,69x10e2	IU/ml
21	N	7,58x10e3	N	N	8,79x10e1	1,03x10e3	IU/ml
22	N	6,93x10e3	N	N	N	3,10x10e2	IU/ml
23	N	2,99x10e3	N	N	1,40x10e1	2,45x10e2	IU/ml
24	N	3,01x10e3	N	N	2,90x10e1	2,57x10e2	IU/ml
25	N	3,71x10e3	N	N	N	6,20x10e2	IU/ml
26	N	P	N	N	N	P	
27	N	5,52x10e3	N	N	4,96x10e1	4,05x10e2	IU/ml
28	N	5,38x10e3	N	N	N	2,04x10e2	IU/ml
29	N	1,90x10e3	N	N	1,00x10e1	2,10x10e2	IU/ml
30	N	3,00x10e3	N	N	5,90x10e1	5,20x10e2	IU/ml
31	N	2,12x10e3	N	N	N	1,01x10e2	IU/ml
32	N	3,10x10e3	N	N	1,20x10e2	2,46x10e4	IU/ml
33	N	6,20x10e3	N	N	N	7,50x10e2	IU/ml
34	N	5,10x10e3	N	N	4,40x10e1	8,40x10e2	IU/ml
35	N	1,55x10e3	N	N	N	9,80x10e1	IU/ml

Laboratoře, u nichž nejsou uvedeny číselné hodnoty, své výsledky nekvantifikovaly. Laboratoř č. 6 vyšetřovala HCV-RNA dvěma testy
Pořadová čísla laboratoří v této tabulce nemají souvislost s jejich zavedenými kódy v EHK (NRL pro VH uvedena pod číslem 1).

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

Mgr. Pavel Fritz
NRL pro virové hepatitidy
SZÚ-CEM