



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/15/2018 (EHK 1015)

Detekce CMV-DNA

Praha, červenec 2018

Obsah

1. Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT (Proficiency Testing) 3
2. Celkové vyhodnocení 4 - 11
3. Příloha – individuální vyhodnocení jednotlivých laboratoří

Program zkoušení způsobilosti PT#M/15/2018 byl zaměřen na detekci CMV-DNA. Návrh a realizace PT#M/15/2018 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, 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.

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, PhD. (NRL pro CMV)

Zprávu schválil:

MUDr. Barbora Macková

Dne: 10. 7. 2018

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/15/2018

Identifikace kola/cyklu:	PT#M/15/2018
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:	EHK 1015, PT#M/15 , 27. 3. 2018
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:	30 laboratoří
Termín distribuce vzorků:	27. 3. 2018
Způsob distribuce vzorků:	Osobní odběr v SZÚ Přílohy: formulář pro zápis výsledků a pokyny účastníkům
Předání výsledků:	písemně do 26. 4. 2018 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

2. Celkové vyhodnocení EHK 1015 - CMV DNA

Detaily EHK:

počet přihlášených účastníků	30 laboratoří
počet zúčastněných	29 laboratoří
počet hodnocených panelů	29 (100 %)
počet panelů s kvalitativními výsledky	29 (100 %), 8 (27,6 %) pouze s výsledky kvalitativního stanovení
počet panelů s kvantitativními výsledky	21 (72,4 %)

Tab. č. 1: Panel EHK.

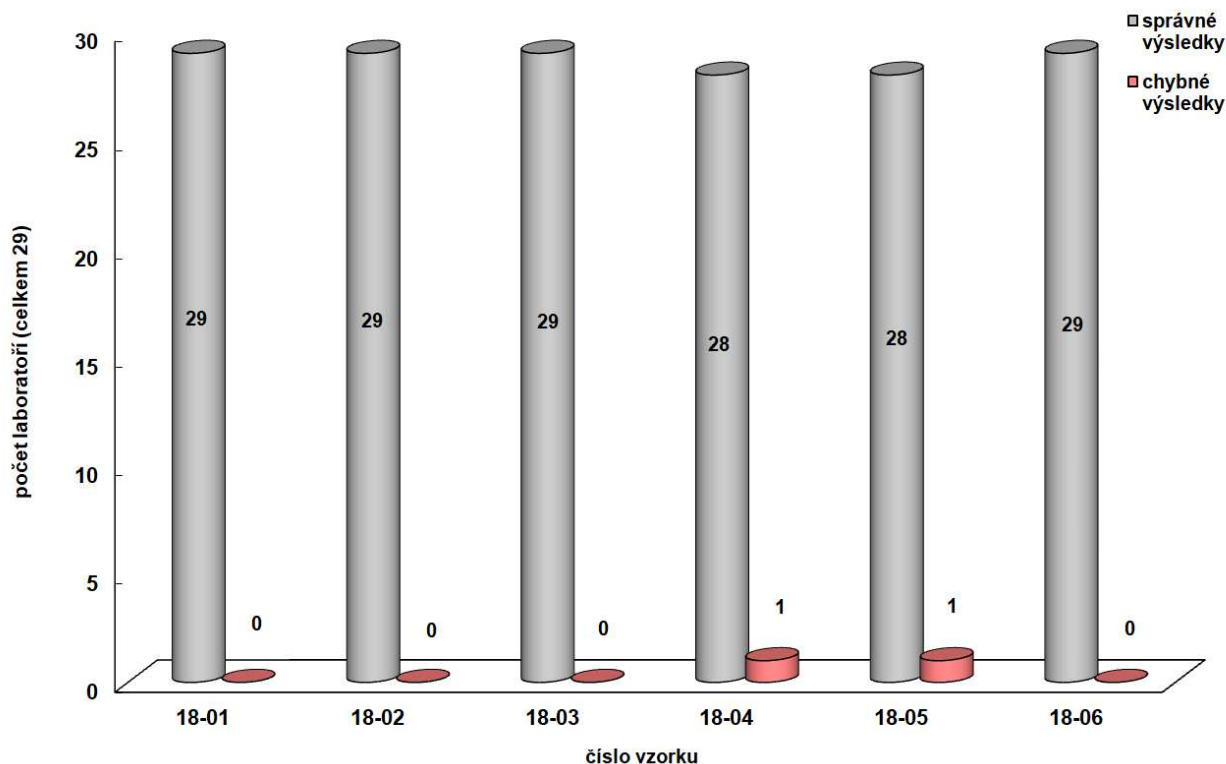
Vzorek	Obsah vzorku ¹	Správný výsledek EHK	
		kvalitativně	kvantitativně (kopie/ml)
NRL CMV 18-01	CMV AD169	pozitivní	7,31.10 ³
NRL CMV 18-02	CMV AD169	pozitivní	8,89.10 ³
NRL CMV 18-03	CMV AD169	silně pozitivní	9,25.10 ⁶
NRL CMV 18-04	CMV AD169	negativní	0
NRL CMV 18-05	CMV AD169	pozitivní	6,76.10 ³
NRL CMV 18-06	CMV AD169	pozitivní	7,89.10 ³

¹Jako matrice vzorku byla u vzorků 18-01 až 18-06 použita testovaná negativní plazma.

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 18-01	pozitivní	2	29/29	100,0 %
NRL CMV 18-02	pozitivní	2	29/29	100,0 %
NRL CMV 18-03	silně pozitivní	3	29/29	100,0 %
NRL CMV 18-04	negativní	3	28/29	96,6 %
NRL CMV 18-05	pozitivní	2	28/29	96,6 %
NRL CMV 18-06	pozitivní	2	29/29	100,0 %



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

Celkem bylo možné získat **14 bodů**, kterých dosáhlo 28 laboratoří (tj. 96,6 %), kvalitativní hodnocení těchto laboratoří bylo **výborné**. Jedna laboratoř (č. laboratoře 710) získala 9 bodů, tj. ztráta pěti bodů (3,4 %) a její kvalitativní zhodnocení bylo pouze **dobré**. Tato laboratoř vydala falešnou pozitivitu u negativního vzorku (NRL CMV 18-04) a falešnou negativitu u pozitivního vzorku (NRL CMV 18-05) – s vysokou pravděpodobností došlo k záměně těchto dvou vzorků během zpracování vzorků nebo během zápisu výsledků.

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 neměly by přesáhnout přibližně 2 řády.

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

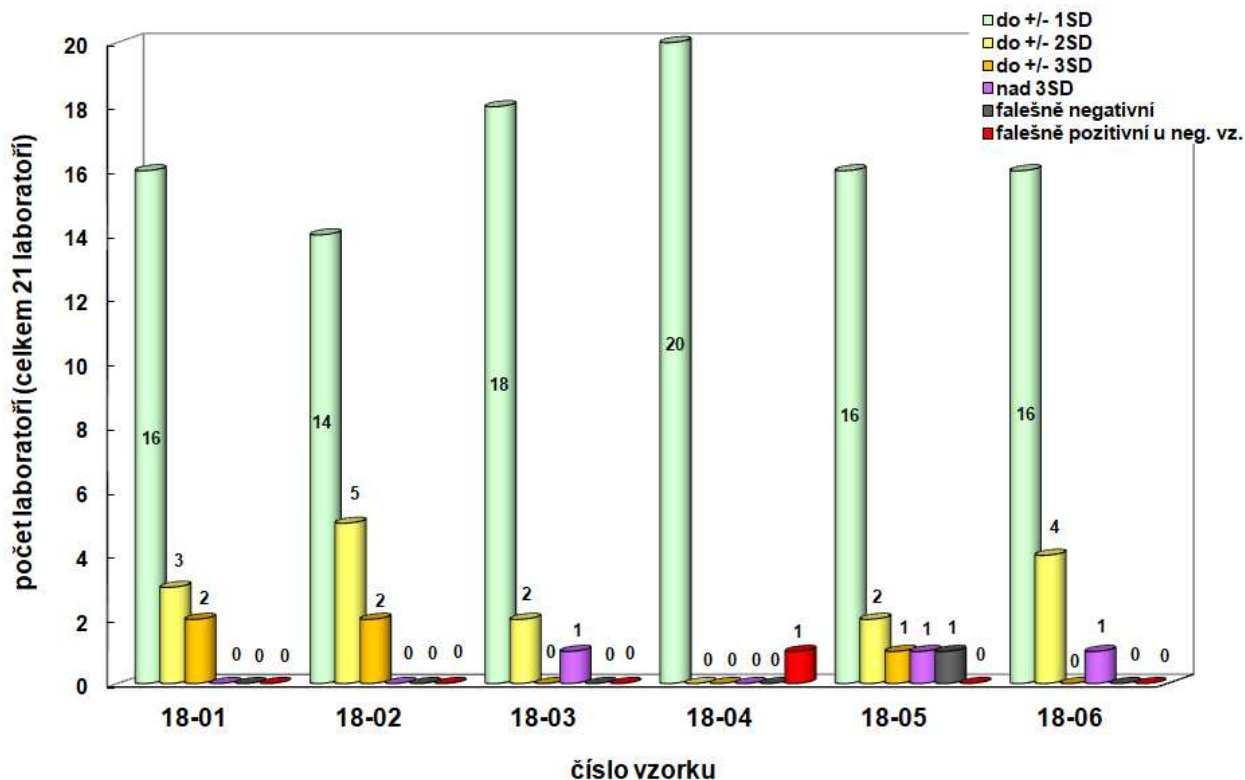
Tab. č. 3: Kvantitativní výsledky vzorků EHK a jednotlivá rozmezí směrodatných odchylek.

Vzorek	Výsledek EHK kopie/ml ¹	Rozmezí		
		+/- 1 SD ² (kopie/ml)	+/- 2 SD ² (kopie/ml)	+/- 3 SD ² (kopie/ml)
NRL CMV 18-01	7,31.10 ³	3,07.10 ³ – 1,74.10 ⁴	1,29.10 ³ – 4,16.10 ⁴	5,39.10 ² – 9,92.10 ⁴
NRL CMV 18-02	8,89.10 ³	3,75.10 ³ – 2,11.10 ⁴	1,58.10 ³ – 5,02.10 ⁴	6,64.10 ² – 1,19.10 ⁵
NRL CMV 18-03	9,25.10 ⁶	1,69.10 ⁶ – 5,07.10 ⁷	3,09.10 ⁵ – 2,77.10 ⁸	5,64.10 ⁴ – 1,52.10 ⁹
NRL CMV 18-04	0	0	0	0
NRL CMV 18-05	6,76.10 ³	2,36.10 ³ – 1,93.10 ⁴	8,26.10 ² – 5,53.10 ⁴	2,89.10 ² – 1,58.10 ⁵
NRL CMV 18-06	7,89.10 ³	2,50.10 ³ – 2,49.10 ⁴	7,95.10 ² – 7,83.10 ⁴	2,52.10 ² – 2,47.10 ⁵

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 18-01	16	3	2	0	0	0
NRL CMV 18-02	14	5	2	0	0	0
NRL CMV 18-03	18	2	0	1	0	0
NRL CMV 18-04	20	0	0	0	0	1
NRL CMV 18-05	16	2	1	1	1	0
NRL CMV 18-06	16	4	0	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.

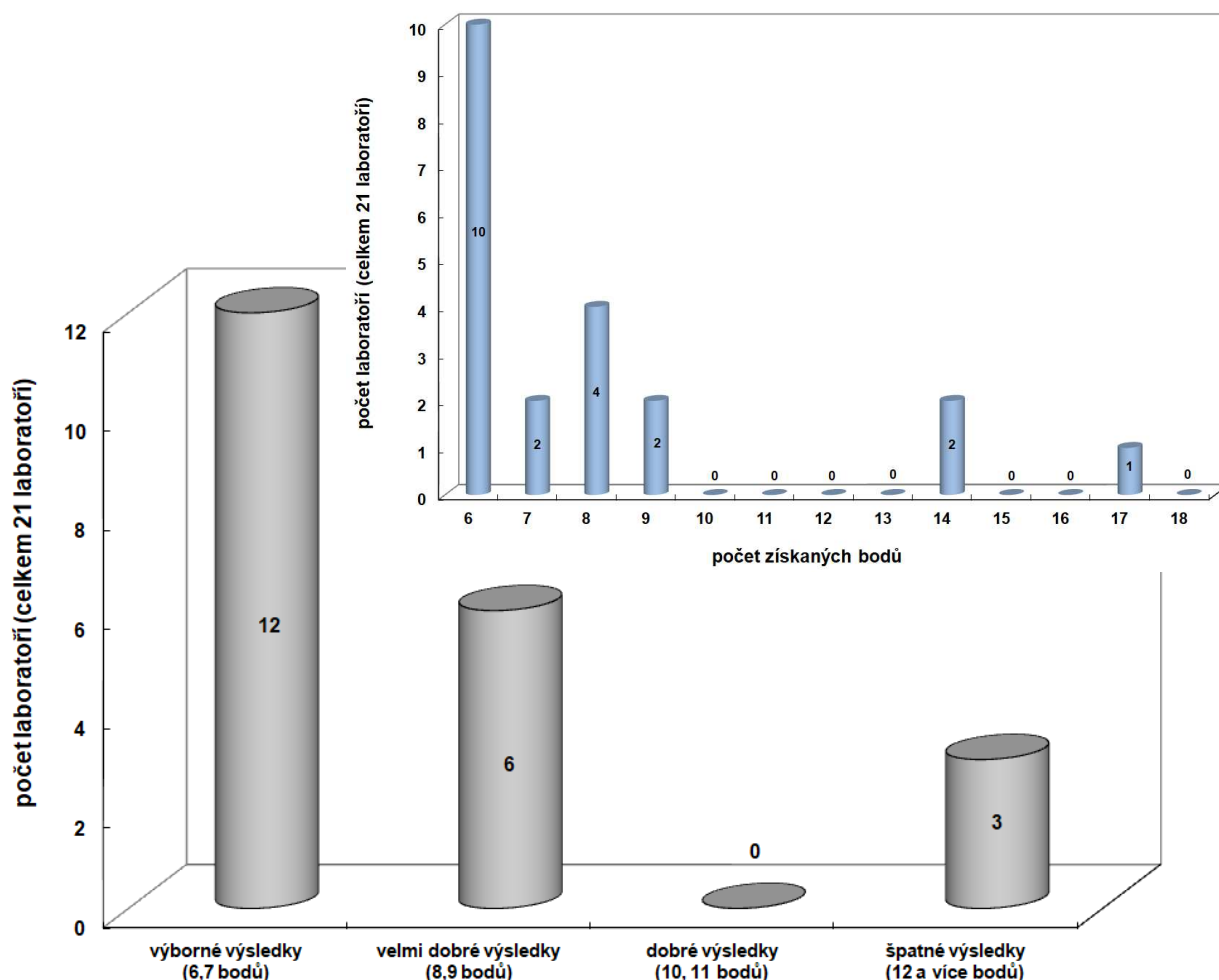
Tab. č. 5: Vyhodnocení laboratoří podle počtu získaných bodů (celkem 21 panelů).

Celkový počet získaných bodů	Počet panelů	Procentuální zastoupení
6 bodů (nejlepší)	10	47,6 %
7 bodů	2	9,5 %
8 bodů	4	19,1 %
9 bodů	2	9,5 %
10 bodů	0	--
11 bodů	0	--
12 bodů	0	--
13 bodů	0	--
14 bodů	2	9,5 %
15 bodů	0	--
16 bodů	0	--
17 bodů	1	4,8 %

Z celkového počtu 21 hodnocených laboratoří mělo všechny kvantitativní výsledky v rozmezí +/- 1 SD (tj. zisk 6 bodů) 10 laboratoří. Nejhorší skóre (nejvyšší počet získaných bodů) - 17 bodů získala jedna laboratoř (č. laboratoře 748). Dvě laboratoře měly výsledek mimo rozmezí tří směrodatných odchylek (laboratoř č. 748 u dvou vzorků a laboratoř č. 316 u jednoho vzorku). Falešně negativní výsledek u pozitivního vzorku (18-05) a falešně pozitivní výsledek u negativního vzorku (18-04) měla rovněž jedna laboratoř (laboratoř č. 710, pravděpodobně záměna těchto dvou vzorků).

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 18 laboratoří. Kvantitativní výsledky neakceptovatelné (nedostatečné) mají laboratoře s 12 a více získanými body, tj. letos se jedná o 3 laboratoře - 2 laboratoře (č. 595 a č. 710) se ziskem 14 bodů a 1 laboratoř (č. 748) se ziskem 17 bodů.

Jedna laboratoř (č. 316) provedla špatný zápis výsledku u vzorku NRL CMV 18-03, u kterého by uvedená „Ct“ hodnota odpovídala kvantitě CMV DNA $10^6 - 10^7$ kopií/ml (správný výsledek), ale do kolonky počet kopií/ml bylo zapsáno $1,79 \cdot 10^4$ kopií/ml (tj. považováno za výsledek mimo +/- 3 SD). Jedna laboratoř (č. 595) systematicky nadhodnocuje výsledky (přibližně o 1 řád) a jedna laboratoř (č. 748) systematicky podhodnocuje výsledky (přibližně o 1 řád).



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 – 19 laboratoří (6 laboratoří s kvalitativním průkazem, 13 s kvantitativním průkazem) - 15× ČIA, 1× SAK, 1× ČIA a SAK, 1× SNAS (obdoba ČIA na Slovensku), 1× nevyplněno
- ne – 10 laboratoří (2 laboratoří s kvalitativním průkazem, 8 s kvantitativním průkazem)

Audit NASKL (není akreditace)

- ano – 10 laboratoří (audit NASKL II)
- ne – 18 laboratoří
- nevyplněno – 1 laboratoř

Izolace

Typ izolace	Počet laboratoří	Izolační kit od firmy	Název izolačního kitu
kolonky	16 laboratoří	<i>GeneProof</i> – 5 laboratoří	Pathogen Free DNA Isolat. Kit (4×) <i>GeneProof</i> DNA Isolation Kit (1×)
		<i>Macherey-Nagel</i> – 1 laboratoř	NucleoSpin Blood (1×)
		<i>QIAGEN</i> – 7 laboratoří	QIAamp DNA Mini Kit (2×)
			QIAamp Blood Mini Kit (3×)
			QIAamp MinElute Virus Spin Kit (1×)
		QIAamp DSP Virus Spin Kit (1×)	
		<i>Roche</i> – 2 laboratoře	High Pure Viral NA Kit (2×)
<i>TAIGEN Bioscience Corporation</i> – 1 laboratoř	VacEZor Virus Mini Kit (1×)		
magnetické partikule	13 laboratoří	<i>ELITech group</i> – 1 laboratoř	ELITe InGenius SP200 (1×)
		<i>EuroClone DIAGNOSTICA</i> – 1 laboratoř	Duplica Prep (1×)
		<i>GeneProof</i> – 1 laboratoř	croBEE 201A Nucleic Acid Extraction Kit (1×)
		<i>QIAGEN</i> – 1 laboratoř	Biorobot EZ1+EZ1 DSP Virus Kit (1×)
		<i>RBCBioscience</i> – 2 laboratoře	MagCore Viral Nucleic Acid Extraction Kit (2×)
			MagNA Pure LC Total Nucleic Acid High Performance Isol. Kit (1×)
			MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isol. Kit (1×)
			MagNA Pure Isolation Kit (1×)
		<i>Roche</i> – 4 laboratoře	COBAS AmpliPrep Total Nucleic Acid (1×)
			<i>Sacace</i> – 3 laboratoře

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	28 laboratoří
	in-house	1 laboratoř

Pozn.:

- všechny laboratoře používají pouze real-time PCR
- všech 8 laboratoří, které provádí kvalitativní stanovení, používají komerční kity
- v případě kvantitativního stanovení 20 laboratoří používá komerční kit a 1 laboratoř in-house real-time PCR

použité komerční kity (28 laboratoří)

- 27 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 její použití)

Firma	Počet laboratoří	Název kitu
kity s CE značkou		
Argene	2 laboratoře	CMV, HHV 6,7,8 Rgene
Diagenode	1 laboratoř	Quantitative Cytomegalovirus REalTime PCR kit
ELITech group	1 laboratoř	CMV ELITe MGB [®] Kit
GeneProof	13 laboratoří	Cytomegalovirus PCR Kit
InterLabService	2 laboratoře	AmpliSens CMV-FRT
QIAGEN	1 laboratoř	artus CMV RG PCR Kit (1×)
		artus CMV LC PCR Kit (2×)
Roche	1 laboratoř	COBAS TaqMan CMV Test
Sacace Biotechnologies	6 laboratoří	CMV Real-TM Quant
kity bez CE značky		
TIB MOLBIOL	1 laboratoř	LightMix Kit human cytomegalovirus

použité přístroje -

Firma	Přístroj	Počet laboratoří	Typ přístroje
Applied Biosystems	ABI PRISM	1 laboratoř	7300 (1×)
BioRad	Bio-Rad CFX	2 laboratoře	CFx96 (2×)
Cepheid	SmartCycler	2 laboratoře	Smart Cycler (I a II) (2×)
ELITech group	ELITe In Genius	1 laboratoř	ELITe In Genius (1×)
GeneProof	croBEE Real-Time PCR System	2 laboratoře	croBEE Real-Time PCR System (2×)
Idaho	Light Scanner	1 laboratoř	Light Scanner 32 (1×)
QIAGEN	Rotor-Gene	10 laboratoří	3000 (1×)
			6000 (4×)
			Q (5×)
			5plex s HRM (1×)
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	1 laboratoř	SLAN Real-time PCR System (1×)

Inhibiční kontrola

- kontrola inhibice je součástí vyšetření CMV DNA u 28 metod, 1 laboratoř (č. 748) používá kit Quantitative Cytomegalovirus REalTime PCR Diagenode a uvádí, že inhibiční kontrola není součástí analýzy. Dle údajů zveřejněných výrobcem je vyšetření IC součástí kitu.
- inhibice nebyla u žádného vzorku:
- o laboratoře 35, 68 v dotazníku zaškrtny inhibice ANO (labor. č. 35 vzorek s inhibicí neoznačila, laboratoř č. 68 inhibice u vzorku NRL CMV 18-04), ale obě laboratoře do výsledkového protokolu inhibici neoznačily a kvalitativní nebo kvantitativní výsledky vydaly??

Pozn.:

EHK pro CMV DNA probíhá od r. 2010 (včetně) – za uplynulých 9 let se každého EHK zúčastnilo pro kvalitativní stanovení 13 laboratoří a pro kvantitativní stanovení 12 laboratoří (1 laboratoř provádí stále pouze kvalitativní stanovení).

V případě reklamací vyhodnocení série prosím postupujte dle reklamačního řádu.

