



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/15/2022 (EHK 1265)

Průkaz DNA lidského cytomegaloviru

Praha, červenec 2022

Obsah

1.	Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT (Proficiency Testing)	3
2.	Způsob přípravy vzorků	4
3.	Charakteristika materiálu	5
4.	Způsob hodnocení	5
5.	Vyhodnocení, tabulky a grafy s výsledky	6
6.	Závěr	13
	Příloha - výsledkový protokol jednotlivé laboratoře	

Program zkoušení způsobilosti PT#M/15/2022 byl zaměřen na detekci CMV DNA metodou PCR. Návrh a realizace PT#M/15/2022 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. ohodnocený výsledkový protokol, je pro každou zúčastněnou laboratoř k dispozici ve webové aplikaci SZÚ v odkazu: <http://ehk.szu.cz/EHK10/> po přihlášení kódem laboratoře a heslem.

Zprávu vypracoval:

MUDr. Štěpánová, Ph.D. (NRL pro CMV)

Zprávu autorizoval:

MUDr. Štěpánová, Ph.D. (NRL pro CMV)
Tel. + 420 721 371 297

Dne: 20. 7. 2022

Pracoviště 2 ESPT

ehk@szu.cz

<http://www.szu.cz/programy-zpusobilosti-pro-mikrobiologicke-laboratore>

1. Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT#M/15/2022

Identifikace cyklu:	EHK 1265
Název:	Průkaz DNA lidského cytomegaloviru (CMV DNA)
Koordinátor:	MUDr. Vlasta Štěpánová, Ph.D.
Charakteristika materiálu:	Viz kapitola 3
Podstata a účel PT/EHK:	Průkaz DNA lidského cytomegaloviru (CMV DNA) metodou PCR
Kritéria pro účast na PT/EHK:	Znalost a technické vybavení pro vyšetření CMV DNA metodou PCR, zajištění laboratorních procesů podle ČSN EN ISO 15189:213
Způsob přípravy:	Viz kapitola 2
Množství připravovaného test. materiálu:	cca 36 sad
Označení vzorkovnic:	NRL CMV 22-01 až 22-06
Zabezpečení kvality vzorku:	Je zajištěna manipulacemi za sterilních podmínek, vhodným skladováním, rychlým transportem ke zpracování
Test homogenity a stability:	Výchozí materiál je testován na vhodné cílové markery. Finální vzorek je testován den před distribucí a po termínu jednotného zahájení rozborů všemi účastníky
Podmínky distribuce a uchování vzorků:	Přeprava a krátkodobé uchování při – 70 °C na suchém ledu chránit před světlem, zamezit opakovanému rozmrazování
Možné zdroje chyb:	Nedodržení správné laboratorní praxe, lidský faktor
Počet účastníků:	31
Termín distribuce:	28. 3. 2022
Způsob distribuce:	Rozvoz přepravní službou (zajišťuje Koordinační pracoviště ESPT 2)
Předání výsledků:	V elektronické podobě za použití webové aplikace EHK10
Způsob vyhodnocení výsledků:	Kvalitativní, kvantitativní - Viz kapitola 4
Určení maximální směrodatné odchylky:	Všechny kvantitativní výsledky jsou převedeny do dekadického logaritmu, spočítán jejich průměr a směrodatná odchylka, pomocí kterých jsou vytvořeny intervaly správnosti
Určení přijaté vztažné hodnoty:	Za vztažnou hodnotu je považován výsledek získaný v NRL
Termín uveřejnění očekávaných výsledků:	5. 5. 2022
Termín uveřejnění závěrečné zprávy:	Do 25. 7. 2022

2. Způsob přípravy vzorků

Vzorky byly připraveny na pracovišti FN Hradec Králové, Ústav klinické mikrobiologie, NRL pro CMV, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové.

6 simulovaných vzorků (6× 1,0 ml plazmy) pro EHK 1265, stanovení CMV DNA, bylo připraveno z laboratorního kmene CMV AD169 a lidské plazmy CMV negativních dárců krve. Jako matrice vzorku byla u vzorků 22-01 až 22-06 použita testovaná negativní plazma. Plazma a laboratorní kmen CMV AD169 byly dlouhodobě uskladněny při -80 °C a poté byly připraveny poolováním kontrolní vzorky o různých koncentracích. Tyto koncentrace byly zjištěny metodou kvantitativní rt-PCR (SOP M/15).

Připravené a otestované vzorky (6× 1,0 ml plazmy) byly uchovávány při teplotě -20 °C a distribuovány do SZÚ v přepravce se suchým ledem.

Datum testování připravených vzorků: 9.3. – 19.3. 2022

Připravené vzorky EHK 1256 byly rozplněny do zkumavek Eppendorf se šroubovacím uzávěrem, označeny samolepkou č. 1 až 6 a byly odeslány dne 22. 3. 2022 do SZÚ Praha, na pracoviště Expertní skupiny pro zkoušení způsobilosti, ze kterého byly vzorky dále distribuovány do jednotlivých laboratoří.

NRL pro CMV FN HK ještě pro kontrolu vyšetřuje panel zakódovaných vzorků pro průkaz CMV DNA, které jsou distribuovány do SZÚ Praha a dále jako EHK 1265 do přihlášených laboratoří. Datum tohoto testování 29. 3. 2022.

	Datum	Provedl	Podpis
Postupy schválil	9.3. – 19.3. 2022	MUDr. Vlasta Štěpánová, Ph.D. Mgr. Radka Bolehovská, Ph.D.	
Příprava vzorků EHK 1265	9. 3. 2022	lab. Lenka Kolesová, DiS.	
Vyšetření vzorků EHK 1265	9. – 19. 3. 2022	lab. Lenka Kolesová, DiS.	
Vyšetření vzorků EHK 1265	29.3.2022	lab. Lenka Kolesová, DiS. Mgr. Radka Bolehovská, Ph.D.	

3. Charakteristika materiálu

EHK 1265 obsahovalo 6 vzorků pro stanovení DNA lidského cytomegaloviru metodou PCR. Výchozím materiálem pro přípravu vzorků je laboratorní kmen CMV AD169 a lidská plazma CMV negativních dárců krve. Plazma a laboratorní kmen CMV AD169 byly před zpracováním dlouhodobě uskladněny při -80 °C.

EHK 1265 - předpokládané výsledky kvalitativního a kvantitativního stanovení CMV DNA:

Vzorek č.	Předpokládaný kvalitativní výsledek	Předpokládaný kvantitativní výsledek (kopie/ml)
NRL CMV 22-01	pozitivní	1,03.E3
NRL CMV 22-02	pozitivní	2,66.E3
NRL CMV 22-03	pozitivní	8,65.E2
NRL CMV 22-04	pozitivní	1,52.E5
NRL CMV 22-05	negativní	negativní
NRL CMV 22-06	pozitivní	7,75.E3

4. Způsob hodnocení

Vztažnou hodnotou jsou očekávané výsledky NRL. Za správnou hodnotu při kvantitativním stanovení (kopie/ml) je brán výsledek získaný jako průměr všech hodnot získaných ze zúčastněných laboratoří. 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).

Pro udělení certifikátu je nezbytná úspěšná účast v kvalitativní části EHK.

5. Vyhodnocení

Tabulka konečných kvalitativních a kvantitativních referenčních výsledků – panel EHK 1265

Vzorek	Obsah vzorku ¹	Správný výsledek EHK	
		kvalitativní	kvantitativní (kopie/ml)
NRL CMV 22-01	CMV AD169	pozitivní	1,35.10 ³
NRL CMV 22-02	CMV AD169	pozitivní	2,56.10 ³
NRL CMV 22-03	CMV AD169	slabě pozitivní	8,49.10 ²
NRL CMV 22-04	CMV AD169	silně pozitivní	2,04.10 ⁵
NRL CMV 22-05	CMV DNA negativní plasma	negativní	0
NRL CMV 22-06	CMV AD169	pozitivní	8,66.10 ³

a) Vyhodnocení kvalitativních výsledků

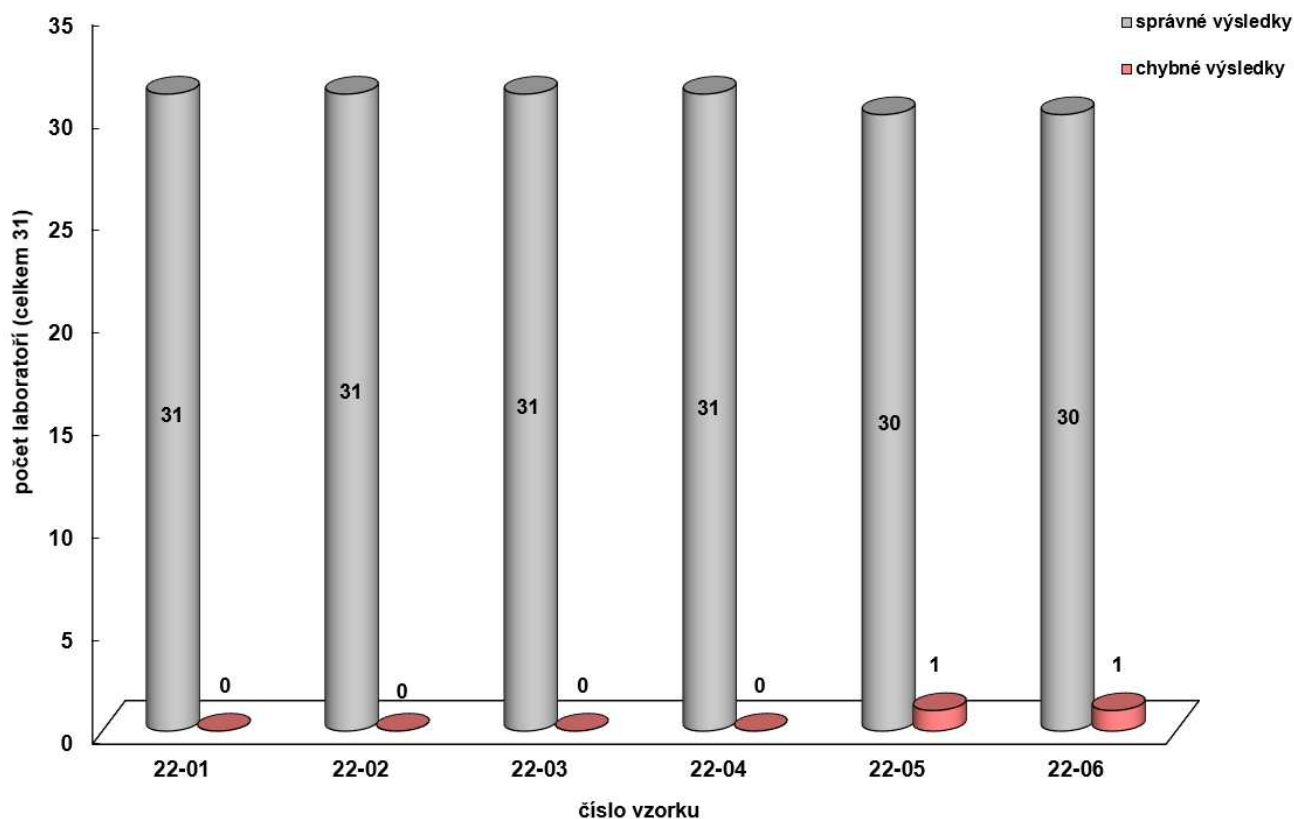
Bylo hodnoceno celkem 31 laboratoří (panelů). 10 laboratoří (32,26 %) má pouze výsledky kvalitativního stanovení, 21 laboratoří (67,74 %) provedlo kvantitativní stanovení CMV DNA.

Tabulka dosažených výsledků a přidělených bodů

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

Vzorek	Výsledek EHK	Získaný počet bodů za správný výsledek	Počet výsledků správných/celkem	Úspěšnost
NRL CMV 22-01	pozitivní	2	31/31	100,0 %
NRL CMV 22-02	pozitivní	2	31/31	100,0 %
NRL CMV 22-03	slabě pozitivní	1	31/31	100,0 %
NRL CMV 22-04	silně pozitivní	3	31/31	100,0 %
NRL CMV 22-05	negativní	3	30/31	96,8 %
NRL CMV 22-06	pozitivní	2	30/31	96,8 %

Vyhodnocení kvalitativních výsledků – jednotlivé laboratoře							
kód laboratoře	číslo vzorku a výsledek						celkové body
	22-01	22-02	22-03	22-04	22-05	22-06	
20	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní	negativní	pozitivní	13
32	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní	negativní	pozitivní	13
34	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní	negativní	pozitivní	13
35	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní	negativní	pozitivní	13
51	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní	negativní	pozitivní	13
58	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní	negativní	pozitivní	13
65	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní	negativní	pozitivní	13
70	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní	10
115	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní	negativní	pozitivní	13
192	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní	negativní	pozitivní	13
208	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní	negativní	pozitivní	13
211	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní	negativní	pozitivní	13
214	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní	negativní	pozitivní	13
302	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní	negativní	pozitivní	13
316	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní	negativní	pozitivní	13
364	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní	negativní	pozitivní	13
365	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní	negativní	pozitivní	13
456	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní	negativní	pozitivní	13
539	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní	negativní	pozitivní	13
541	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní	negativní	negativní	11
552	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní	negativní	pozitivní	13
554	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní	negativní	pozitivní	13
574	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní	negativní	pozitivní	13
595	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní	negativní	pozitivní	13
598	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní	negativní	pozitivní	13
708	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní	negativní	pozitivní	13
710	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní	negativní	pozitivní	13
742	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní	negativní	pozitivní	13
748	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní	negativní	pozitivní	13
784	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní	negativní	pozitivní	13
786	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní	negativní	pozitivní	13



Graf: Vyhodnocení kvalitativních výsledků u jednotlivých vzorků

Celkem bylo možné získat **13 bodů**, kterých dosáhlo 29 laboratoří (tj. 93,5 %), kvalitativní hodnocení těchto laboratoří bylo **výborné (laboratoře uspěly v kvalitativním hodnocení)**. **Hranice úspěšnosti v kvalitativním hodnocení bylo 12 dosažených bodů.**

Jedna laboratoř (č. laboratoře 70) vydala **falešnou pozitivitu u vzorku NRL CMV 22-05** a získala celkově v kvalitativním hodnocení 10 bodů. Falešná pozitivita byla způsobena chybnou technikou pipetování buď při izolaci CMV DNA, nebo při přípravě PCR (jednalo se pravděpodobně o kontaminaci

od vzorku NRL CMV 22-04). Jedna laboratoř (č. laboratoře 541) vydala **falešnou negativitu u vzorku NRL CMV 22-06** (koncentrace CMV DNA $8,66 \cdot 10^3$ kopií/ml), a získala tak celkově v kvalitativním hodnocení 11 bodů. **Tyto dvě laboratoře neuspěly v kvalitativním hodnocení.**

b) Vyhodnocení kvantitativních výsledků

Tab.: 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 22-01	1,35.10 ³	5,22.10 ² – 3,51.10 ³	2,01.10 ² – 9,10.10 ³	7,75.10 ¹ –2,36.10 ⁴
NRL CMV 22-02	2,56.10 ³	1,04.10 ³ – 6,34.10 ³	4,20.10 ² – 1,57.10 ⁴	1,70.10 ² – 3,87.10 ⁴
NRL CMV 22-03	8,49.10 ²	3,30.10 ² – 2,18.10 ³	1,28.10 ² – 5,62.10 ³	5,00.10 ¹ – 1,44.10 ⁴
NRL CMV 22-04	2,04.10 ⁵	1,16.10 ⁵ – 3,60.10 ⁵	6,56.10 ⁴ – 6,34.10 ⁵	3,72.10 ⁴ – 1,12.10 ⁶
NRL CMV 22-05	0	0	0	0
NRL CMV 22-06	8,66.10 ³	4,36.10 ³ – 1,72.10 ⁴	2,20.10 ³ – 3,41.10 ⁴	1,11.10 ³ – 6,77.10 ⁴

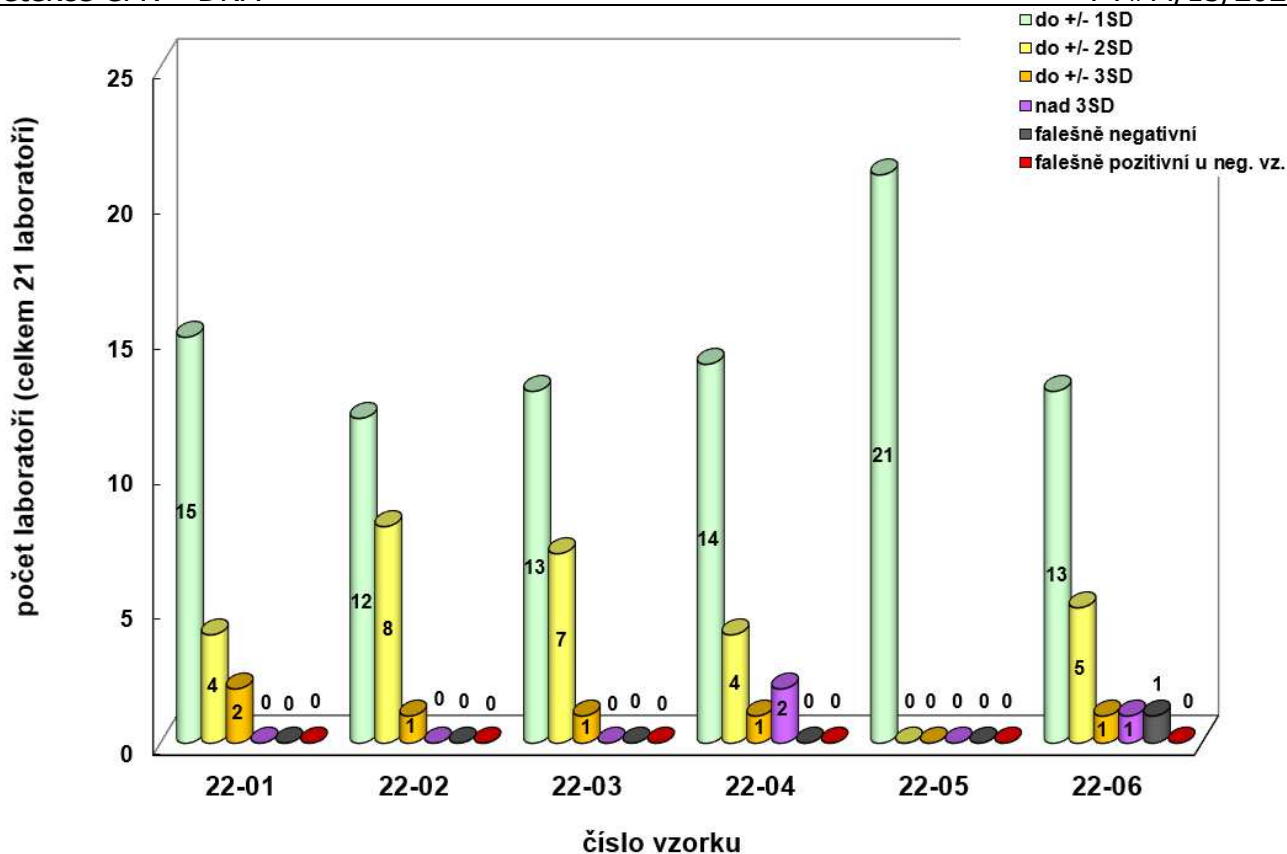
Pozn: ¹Průměr hodnot všech laboratoří u jednotlivých vzorků. ²SD – směrodatná odchylka

Vyhodnocení kvantitativních výsledků – jednotlivé laboratoře							
kód laboratoře referenční panel	číslo vzorku a výsledky						celkové skóre
	22-01	22-02	22-03	22-04	22-05	22-06	
	pozitivní 1,35E+03	pozitivní 2,56E+03	pozitivní 8,49E+02	pozitivní 2,04E+05	negativní	pozitivní 8,66E+03	
20	2,70E+03	2,03E+03	1,79E+03	3,16E+05	0,00E+00	3,19E+04	7
51	8,06E+02	1,99E+03	8,30E+02	1,53E+05	0,00E+00	1,01E+04	6
58	7,55E+02	1,83E+03	6,43E+02	1,41E+05	0,00E+00	4,96E+03	6
65	4,57E+02	7,59E+02	3,28E+02	1,15E+05	0,00E+00	4,46E+03	10
115	5,50E+02	7,55E+02	6,10E+02	1,08E+05	0,00E+00	4,09E+03	9
208	7,30E+03	2,06E+04	4,90E+03	2,04E+06	0,00E+00	6,70E+03	13
211	4,88E+02	1,73E+03	7,52E+02	1,52E+05	0,00E+00	6,98E+03	7
214	7,41E+02	2,12E+03	4,16E+02	1,21E+05	0,00E+00	6,33E+03	6
302	2,79E+03	7,21E+03	3,03E+03	4,39E+05	0,00E+00	1,87E+04	10
316	6,00E+02	2,10E+03	3,00E+02	1,81E+05	0,00E+00	7,80E+03	7
364	1,86E+02	7,29E+02	8,74E+02	1,01E+05	0,00E+00	4,62E+03	10

539	2,51E+03	2,77E+03	6,30E+02	2,02E+05	0,00E+00	9,24E+03	6
541	2,45E+03	4,81E+03	2,50E+03	3,30E+05	0,00E+00	0,00E+00	11
552	3,62E+03	9,71E+03	1,76E+03	1,01E+06	0,00E+00	4,97E+04	12
554	2,14E+03	1,02E+03	9,03E+01	2,03E+05	0,00E+00	3,92E+03	10
574	1,33E+03	3,23E+03	9,70E+02	2,19E+05	0,00E+00	9,27E+03	6
595	6,00E+02	3,00E+03	8,67E+02	2,95E+05	0,00E+00	8,21E+03	6
710	2,09E+03	4,00E+03	1,51E+03	3,21E+05	0,00E+00	1,45E+04	6
742	1,40E+03	8,80E+02	1,70E+02	1,20E+05	0,00E+00	4,30E+03	9
748	9,34E+03	1,15E+04	2,31E+03	3,63E+06	0,00E+00	2,14E+05	16
784	1,90E+03	2,00E+03	1,00E+03	2,40E+05	0,00E+00	1,40E+04	6

Tab.: 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 22-01	15	4	2	0	0	0
NRL CMV 22-02	12	8	1	0	0	0
NRL CMV 22-03	13	7	1	0	0	0
NRL CMV 22-04	14	4	1	2	0	0
NRL CMV 22-05	21	0	0	0	0	0
NRL CMV 22-06	13	5	1	1	1	0
Počet přidělených bodů za výsledek v daném intervalu	1	2	3	4	5	5



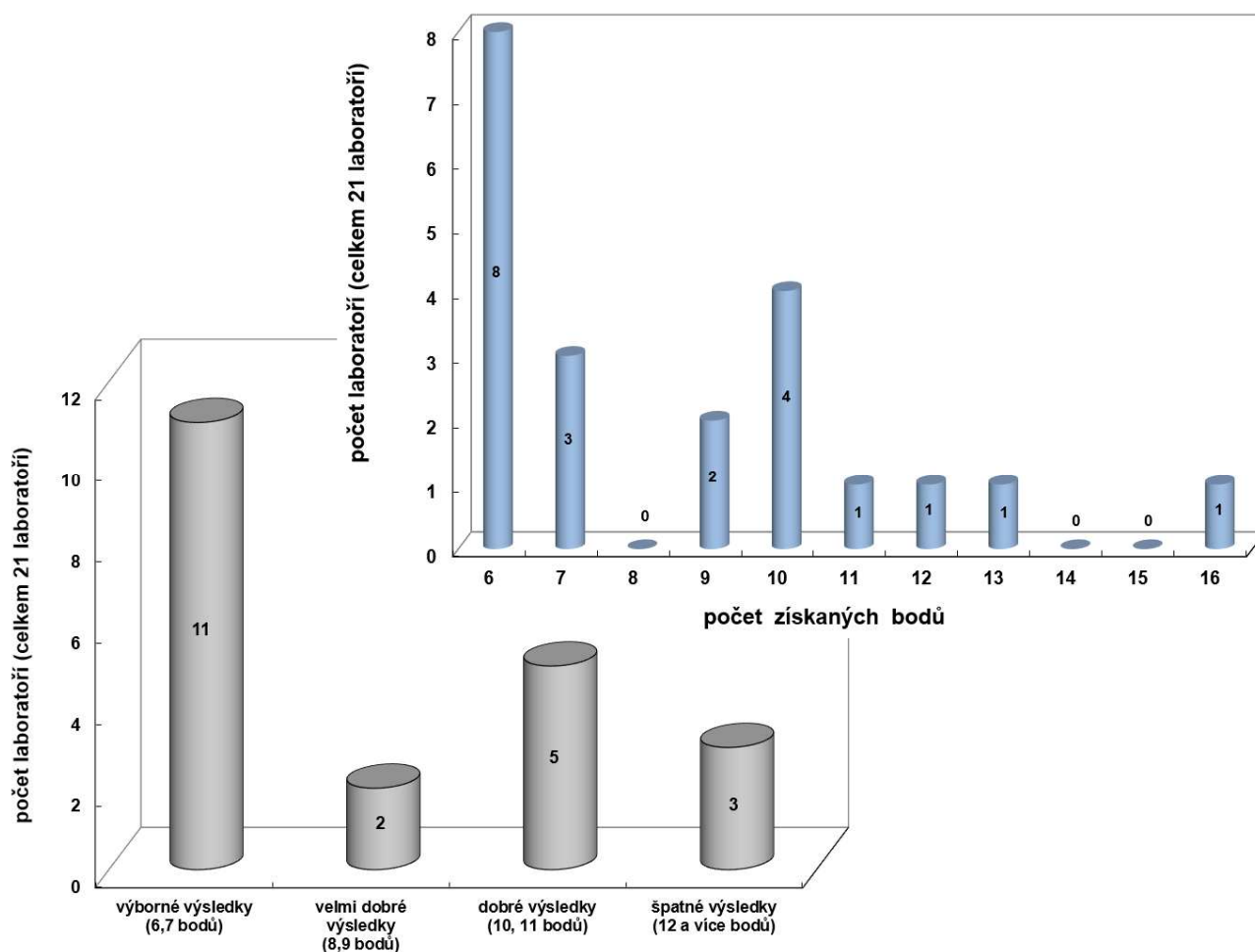
Graf: Vyhodnocení kvantitativních výsledků u jednotlivých vzorků
Tab.: Vyhodnocení laboratoří podle počtu získaných bodů (celkem 21 panelů)

Celkový počet získaných bodů	Počet panelů	Procentuální zastoupení
6 bodů (nejlepší)	8	38,1 %
7 bodů	3	14,3 %
8 bodů	0	--
9 bodů	2	9,5 %
10 bodů	4	19,0 %
11 bodů	1	4,8 %
12 bodů	1	4,8 %
13 bodů	1	4,8 %
14 bodů	0	--
15 bodů	0	--
16 bodů	1	4,8 %

Hranice úspěšnosti v kvantitativním hodnocení bylo maximálně 11 dosažených bodů.

Z celkového počtu 21 hodnocených laboratoří mělo všechny kvantitativní výsledky v rozmezí +/- 1 SD (tj. zisk 6 bodů) 8 laboratoří (oproti loňskému roku se jedná o pokles). Nejhorší skóre (nejvyšší počet získaných bodů) - 16 bodů získala laboratoř, která výsledky systematicky nadhodnocovala (celkově hodnoceno jako špatné kvantitativní výsledky).

Celkové zhodnocení kvantitativních výsledků je v grafu č. 3. Laboratoře, které získaly 6 až 11 bodů, mají akceptovatelné kvantitativní výsledky (laboratoře uspěly v kvantitativním hodnocení) – v letošním roce se jedná o 18 laboratoří. Neakceptovatelné, resp. špatné kvantitativní výsledky se v letošním roce objevily u 3 laboratoří.



Graf: Celkové zhodnocení kvantitativních výsledků všech laboratoří

6. Závěr

EHK 1265 – Průkaz DNA lidského CMV bylo rozesláno 31 laboratořím. Výsledkový protokol poslalo zpět 31 laboratoří. Dvě laboratoře nesplnily kritéria pro udělení certifikátu za úspěšnou účast v EHK a mají možnost objednat si opravnou sérii EHK přes webovou aplikaci SZÚ: <https://ehk.szu.cz/EHK10/>, viz informace o změnách v objednávání opravných sérií a zadávání reklamací na webových stránkách SZÚ: <http://www.szu.cz/programy-zpusobilosti-pro-mikrobiologicke-laboratore>.

V případě reklamací vyhodnocení série, prosím, postupujte dle reklamačního řádu. Pro zadání reklamace použijte také webovou aplikaci SZÚ.

Konec závěrečné zprávy