



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/15/2023 (EHK 1340)

Detekce CMV DNA

Praha, červenec 2023

Obsah

1.	Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT (Proficiency Testing)	3
2.	Způsob přípravy vzorků	4
3.	Charakteristika materiálu	4
4.	Způsob hodnocení	5
5.	Vyhodnocení	6
6.	Závěr	12
	Příloha – výsledkový protokol jednotlivé laboratoře	

Program zkoušení způsobilosti PT#M/15/2023 je zaměřen na detekci CMV DNA metodou PCR.

Návrh a realizace PT#M/15/2023 byly prováděny podle standardního operačního postupu koordinátora programu EHK 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: 18. 7. 2023

Pracoviště 2 ESPT

<https://szu.cz/sluzby/zkouseni-zpusobilosti/zkouseni-zpusobilosti-pro-lekarskou-mikrobiologii/>
e-mail: ehk@szu.cz

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

Identifikace cyklu:	EHK 1340
Název PT:	Detekce CMV DNA
Koordinátor:	MUDr. Vlasta Štěpánová, Ph.D.
Podstata a účel PT:	Průkaz DNA lidského cytomegaloviru (CMV DNA) metodou PCR
Kritéria pro účast na PT:	Znalost a technické vybavení pro vyšetření CMV DNA metodou PCR, zajištění laboratorních procesů podle ČSN EN ISO 15189:2013
Charakteristika materiálu:	Viz kapitola 3 závěrečné zprávy
Hodnocené ukazatele:	Kvalitativní a kvantitativní stanovení CMV DNA
Způsob přípravy:	Viz kapitola 2 závěrečné zprávy
Počet účastníků:	31 laboratoří
Termín distribuce vzorků:	27. 3. 2023
Informace účastníkům:	viz Informace pro účastníky zaslané spolu se vzorky
Termín pro odeslání výsledků účastníky (stop termín):	1. 5. 2023
Označení vzorkovnic:	EHK 1340, PT#M/15, č. 1 – č. 6, 27. 3. 2023
Zabezpečení jakosti vzorku včetně testu homogenity a stability:	Viz kapitola 2 závěrečné zprávy
Možné zdroje chyb:	Nedodržení správné laboratorní praxe, lidský faktor
Způsob vyhodnocení výsledků:	Viz kapitola 4 závěrečné zprávy
Určení přijaté vztažné hodnoty:	Za vztažnou hodnotu je považován výsledek získaný průměrem všech výsledků zúčastněných laboratoří
Určení maximální směrodatné odchylky:	Všechny kvantitativní výsledky jsou převedeny do dekadického logaritmu, spočítán jejich průměr a směrodatná odchylka, pomocí kterých jsou vytvořeny intervaly správnosti
Termín uveřejnění předběžných výsledků:	11. 5. 2023
Termín uveřejnění závěrečné zprávy:	Do 24. 7. 2023

2. Způsob přípravy vzorků

6 simulovaných vzorků (6× 1,0 ml plazmy) pro EHK 1340, stanovení CMV DNA, bylo připraveno z laboratorního kmene CMV AD169 a lidské plazmy CMV negativních dárců krve. Jako matrice vzorku byla u vzorků č. 1 až č. 6 použita testovaná negativní plazma. Plazma a laboratorní kmen CMV AD169 byly dlouhodobě uskladněny při -80 °C a poté byly použity pro přípravu kontrolních vzorků o různých koncentracích. Tyto koncentrace byly zjištěny metodou kvantitativní rt-PCR.

Připravené a otestované vzorky (6× 1,0 ml plazmy) byly uchovávány při teplotě -80 °C a distribuovány do SZÚ v přepravce se suchým ledem.

Datum přípravy a testování připravených vzorků: 22. 2. až 21. 3. 2023

Připravené vzorky EHK 1340 byly rozplněny do zkumavek Eppendorf se šroubovacím uzávěrem, označeny etiketou a byly odeslány kurýrem dne 23. 3. 2023 do SZÚ Praha, na pracoviště Expertní skupiny pro zkoušení způsobilosti, ze které byly vzorky dále distribuovány do jednotlivých laboratoří přihlášených k účasti v tomto cyklu EHK.

Tab. 1: Příprava a testování vzorků EHK 1340

	Datum	Provedl
Postupy schválil	22. 2. až 23. 2. 2023	MUDr. Vlasta Štěpánová, Ph.D. Mgr. Radka Bolehovská, Ph.D.
Příprava vzorků pro EHK 1340	23. 2. až 13. 3. 2023	lab. Lenka Kolesová, DiS. Mgr. Radka Bolehovská, Ph.D.
Vyšetření vzorků pro EHK 1340	13. až 17. 3. 2023	lab. Lenka Kolesová, DiS.
Vyšetření vzorků EHK 1340	21. 3. 2023	lab. Lenka Kolesová, DiS. Mgr. Radka Bolehovská, Ph.D.

3. Charakteristika materiálu

Cyklus EHK 1340 obsahoval 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.

Tab. 2: Předpokládané výsledky kvalitativního a kvantitativního stanovení EHK 1340

Vzorek	Předpokládaný kvalitativní výsledek	Předpokládaný kvantitativní výsledek (kopie/ml)
1	pozitivní	6,43.E4
2	negativní	negativní
3	pozitivní	4,03.E3
4	silně pozitivní	2,08.E6
5	negativní	negativní
6	slabě pozitivní	8,13.E2

4. Způsob hodnocení

Kvalitativní, kvantitativní (pokud laboratoř přihlášená do EHK stanovuje kvantitativně virovou nálož).

Vztažnou hodnotou je průměr výsledků všech zúčastněných laboratoří.

Kvalitativní výsledky: za správné stanovení u silně pozitivního vzorku - 3 body, pozitivního - 2 body, slabě pozitivního - 1 bod, negativního - 3 body; maximum = 14 bodů.

U každé laboratoře je vypočtena procentuální úspěšnost, definovaná jako podíl skutečně dosaženého počtu bodů a maximálního dosažitelného počtu bodů - maximální dosažitelný počet bodů při 6 vzorcích v sadě je 14 bodů.

Laboratoř uspěla, pokud získá alespoň 11,2 body, tj. 80 %. Hranice úspěšnosti pro EHK 1340 je stanovena ve shodě s ostatními EHK a deklarovaná pracovištěm ESPT2 na 80 %.

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

Kvantitativní výsledky: za správnou hodnotu při kvantitativním stanovení (kopie/ml) je brán výsledek získaný jako průměr všech hodnot získaných ze zúčastněných laboratoří. Jako předběžné výsledky jsou brány výsledky stanovení NRL pro CMV, které jsou podle plánu uveřejněny pracovištěm ESPT2.

U kvantitativního stanovení: odchylka do +/- 1 SD dekadického logaritmu ke vztažné hodnotě je hodnocena 1 bodem. Odchylka do +/- 2 SD dekadických logaritmů ke vztažné hodnotě je hodnocena 2 body. Odchylka do +/- 3 SD dekadických logaritmů je za 3 body. Odchylka nad +/- 3 SD dekadické logaritmy je za 4 body. Falešně negativní nebo falešně pozitivní vzorek je hodnocen 5 body a falešně negativní výsledek u slabě pozitivního vzorku je hodnocen 3 body.

Nejlepší bodové hodnocení (100 %) je 6 bodů.

5. Vyhodnocení

Tab. 3: Konečné kvalitativní a kvantitativní referenční výsledky – panel EHK 1340

Vzorek	Obsah vzorku	Správný výsledek EHK	
		kvalitativní	kvantitativní (kopie/ml)
1	CMV AD169	pozitivní	1,31.E5
2	CMV DNA negativní (samostatná plazma)	negativní	0
3	CMV AD169	pozitivní	8,55.E3
4	CMV AD169	silně pozitivní	4,15.E6
5	CMV DNA negativní (samostatná plazma)	negativní	0
6	CMV AD169	slabě pozitivní	2,04.E3

Pozn. $1,31.E5 = 1,31.10^5 = 131\ 000$ kopií/ml

a) Vyhodnocení kvalitativních výsledků

Celkem bylo hodnoceno 31 laboratoří (panelů). U kvalitativních výsledků bylo možné získat 14 bodů. Celkem 30 laboratoří (tj. 96,77 %) dosáhlo maximálního počtu 14 bodů a splnilo kritéria kvalitativního stanovení CMV DNA v EHK 1340, kdy jejich výsledky byly v naprosté shodě s výsledky NRL. V kvalitativním stanovení neuspěla 1 laboratoř (č. 302), která stanovila vzorek č. 5 obsahující pouze CMV DNA negativní plazmu jako pozitivní. Získala tedy pouze 11 bodů, čímž nedosáhla 80 % bodového hodnocení. Falešná pozitivita mohla být způsobena chybnou technikou pipetování buď při izolaci CMV DNA, nebo při přípravě PCR (mohlo se jednat o kontaminaci vzorkem č. 4).

Pozn.: Upozorňujeme laboratoře, že je nutné vyplnit u všech vzorků výsledek kvalitativního stanovení - pozitivní nebo negativní (laboratoř 364 u vzorku č. 6 výsledek nevyplnila; vzhledem k uvedení kvantity byla rovněž vyhodnocena se ziskem 1 bodu za tento vzorek).

Tab.4: Vyhodnocení kvalitativních výsledků a přidělené body (celkem 31 panelů)

Vzorek	Výsledek EHK	Počet bodů za správný výsledek	Úspěšnost
1	pozitivní	2	100,0 %
2	negativní	3	100,0 %
3	pozitivní	2	100,0 %
4	silně pozitivní	3	100,0 %
5	negativní	3	96,8 %
6	slabě pozitivní	1	100 %

Tab. 5: Bodové vyhodnocení kvalitativních výsledků EHK 1340 - jednotlivé laboratoře

Lab. kód	Max. bodů	Zisk bodů	Celkové hodnocení	Počet získaných bodů pro jednotlivé vzorky					
				1	2	3	4	5	6
20	14	14	lab. úspěšla	2	3	2	3	3	1
32	14	14	lab. úspěšla	2	3	2	3	3	1
34	14	14	lab. úspěšla	2	3	2	3	3	1
35	14	14	lab. úspěšla	2	3	2	3	3	1
51	14	14	lab. úspěšla	2	3	2	3	3	1
58	14	14	lab. úspěšla	2	3	2	3	3	1
64	14	14	lab. úspěšla	2	3	2	3	3	1
65	14	14	lab. úspěšla	2	3	2	3	3	1
115	14	14	lab. úspěšla	2	3	2	3	3	1
156	14	14	lab. úspěšla	2	3	2	3	3	1
211	14	14	lab. úspěšla	2	3	2	3	3	1
302	14	11	lab. neuspěšla	2	3	2	3	0	1
313	14	14	lab. úspěšla	2	3	2	3	3	1
316	14	14	lab. úspěšla	2	3	2	3	3	1
364	14	14	lab. úspěšla	2	3	2	3	3	1
365	14	14	lab. úspěšla	2	3	2	3	3	1
376	14	14	lab. úspěšla	2	3	2	3	3	1
430	14	14	lab. úspěšla	2	3	2	3	3	1
456	14	14	lab. úspěšla	2	3	2	3	3	1
539	14	14	lab. úspěšla	2	3	2	3	3	1
541	14	14	lab. úspěšla	2	3	2	3	3	1
552	14	14	lab. úspěšla	2	3	2	3	3	1

554	14	14	lab. úspěla	2	3	2	3	3	1
574	14	14	lab. úspěla	2	3	2	3	3	1
595	14	14	lab. úspěla	2	3	2	3	3	1
598	14	14	lab. úspěla	2	3	2	3	3	1
710	14	14	lab. úspěla	2	3	2	3	3	1
742	14	14	lab. úspěla	2	3	2	3	3	1
748	14	14	lab. úspěla	2	3	2	3	3	1
784	14	14	lab. úspěla	2	3	2	3	3	1
786	14	14	lab. úspěla	2	3	2	3	3	1

b) Vyhodnocení kvantitativních výsledků

Výsledky všech laboratoří jsou porovnávány s průměrem hodnot získaných všemi účastníky včetně NRL pro CMV. Do hodnocení je zahrnuto všech 6 vzorků v sadě.

Bodové hodnocení v kvantitativní části EHK neovlivní získání certifikátu, kvantitativní výsledky jsou pro letošní rok hodnoceny pouze individuálním komentářem v hodnotícím protokolu následujícím způsobem:

6 a 7 bodů – výborné výsledky

8 a 9 bodů – velmi dobré výsledky

10 a 11 bodů – dobré výsledky

12 a více bodů – nesprávné výsledky

Všechny kvantitativní výsledky jsou převedeny do dekadického logaritmu, spočítán jejich průměr a směrodatná odchylka, pomocí kterých jsou vytvořeny intervaly správnosti.

Kvantitativní stanovení CMV DNA ve vzorcích EHK 1340 provedlo celkem 23 laboratoří.

Tab. 6: Kvantitativní výsledky EHK 1340 – jednotlivé laboratoře a jejich bodový zisk

kód laboratoře	1	2	3	4	5	6	Bodový zisk
<i>NRL pro CMV*</i>	<i>6,43.E4</i>	<i>0</i>	<i>4,03.E3</i>	<i>2,08.E6</i>	<i>0</i>	<i>8,13.E2</i>	<i>----</i>
20	1,87.E4	0	1,12.E4	3,40.E6	0	3,44.E3	8
51	2,95.E5	0	1,42.E4	6,26.E6	0	2,36.E3	6
58	1,54.E5	0	8,20.E3	3,48.E6	0	1,05.E3	6
65	2,30.E4	0	9,80.E3	2,50.E6	0	1,90.E3	7
115	9,57.E4	0	4,30.E3	2,15.E6	0	6,12.E2	7
156	2,45.E5	0	1,66.E4	5,07.E6	0	6,34.E3	7
211	1,11.E5	0	5,66.E3	4,23.E6	0	1,31.E3	6
302	1,44.E6	0	5,81.E4	4,60.E7	3,10.E3	3,78.E4	20
313	1,32.E5	0	1,07.E4	3,79.E6	0	1,41.E3	6
316	8,04.E4	0	5,10.E3	2,25.E6	0	1,20.E3	6
364	1,01.E5	0	7,03.E3	2,93.E6	0	1,03.E3	6
376	6,49.E5	0	5,98.E4	2,06.E7	0	6,40.E3	12
430	1,40.E5	0	7,01.E3	4,61.E6	0	8,22.E3	7
539	3,38.E5	0	1,54.E4	3,96.E6	0	3,72.E3	7
541	1,21.E5	0	7,93.E3	2,74.E6	0	2,13.E3	6
552	1,12.E5	0	5,58.E3	2,03.E6	0	1,69.E3	6
554	2,10.E5	0	8,90.E3	5,13.E6	0	1,82.E3	6
574	1,81.E5	0	5,81.E3	4,50.E6	0	1,85.E3	6
595	1,56.E5	0	8,29.E3	3,88.E6	0	2,87.E3	6
710	9,43.E4	0	1,06.E4	7,06.E6	0	1,68.E3	6
742	6,70.E4	0	1,50.E3	2,90.E6	0	7,70.E2	9
748	7,04.E4	0	3,40.E3	2,11.E6	0	8,15.E2	7
784	1,10.E5	0	7,70.E3	4,20.E6	0	8,40.E2	6

*jedná se o hodnoty předpokládaných výsledků NRL pro CMV

Tab. 7: Kvantitativní výsledky vzorků EHK a jejich rozmezí

Vzorek	Výsledek EHK kopie/ml ¹	Rozmezí		
		+/- 1 SD ² (kopie/ml)	+/- 2 SD ² (kopie/ml)	+/- 3 SD ² (kopie/ml)
1	1,31.E5	5,21.E4– 3,27.E5	2,08.E4– 8,21.E5	8,29.E3–2,06.E6
2	0	0	0	0
3	8,55.E3	3,87.E3 – 1,89.E4	1,75.E3 – 4,18.E4	7,92.E2– 9,23.E4
4	4,15.E6	2,02.E6 – 8,53.E6	9,84.E5 – 1,75.E7	4,79.E5 – 3,60.E7
5	0	0	0	0
6	2,04.E3	7,96.E2 – 5,22.E3	3,11.E2 – 1,34.E4	1,21.E2 – 3,42.E4

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

Tab. 8: Počty laboratoří v jednotlivých rozmezích a bodový zisk v daném rozmezí (celkem 23 hodnocených laboratoří)

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
1	18	3	2	0	0	0
2	23	0	0	0	0	0
3	19	1	3	0	0	0
4	21	0	1	1	0	0
5	22	0	0	0	0	1
6	17	5	0	1	0	0
Počet přidělených bodů za výsledek v daném intervalu	1	2	3	4	5	5

Tab. 9: Kvantitativní stanovení - vyhodnocení laboratoří podle počtu získaných bodů (celkem 23 laboratoří)

Celkový počet získaných bodů	Počet laboratoří	Slovní hodnocení	Procentuální zastoupení
6 bodů (nejlepší)	13	výborné výsledky	56,5 %
7 bodů	6	výborné výsledky	26,1 %
8 bodů	1	velmi dobré výsledky	4,3 %
9 bodů	1	velmi dobré výsledky	4,3 %
10 bodů	0	dobré výsledky	0 %
11 bodů	0	dobré výsledky	0 %
12 bodů	1	nesprávné výsledky	4,3 %
20 bodů	1	nesprávné výsledky	4,3 %

Z celkového počtu 23 hodnocených laboratoří mělo všechny kvantitativní výsledky v rozmezí +/- 1 SD (tj. zisk 6 bodů) 13 laboratoří. 7 bodů, značících rovněž výborné výsledky, získalo 6 laboratoří (oproti loňskému roku se jedná o zlepšení). Nejhorší skóre (tj. nejvyšší počet získaných bodů), 20 bodů, získala jedna laboratoř (č. laboratoře 302), jejíž kvantitativní výsledky se pohybovaly až v rozmezí 4 směrodatných odchylek. Tato laboratoř navíc u CMV DNA negativního vzorku detekovala falešnou pozitivitu. Tato laboratoř neuspěla současně ani v kvalitativním stanovení. V kvantitativním stanovení neuspěla také laboratoř č. 376, která získala 12 bodů. Celkově mělo výborné výsledky (6,7 bodů) 19 laboratoří (tj. 82,6 %), velmi dobré výsledky (8, 9 bodů) 2 laboratoře (tj. 8,7 %), dobré výsledky neměla žádná laboratoř a nesprávné výsledky měly 2 laboratoře (tj. 8,7 %).

Elektronický formulář:

Protože některé zúčastněné laboratoře v elektronickém formuláři nevyplnily názvy použitých diagnostických souprav, uvádím zde pouze seznam zmíněných dg. kitů a jejich výrobců, tak jak byly uvedeny:

CMV Real-TM CMV a Real-TM Quant., Sacace Biotechnologies; CMV RCR kit, Gene Proof; Elite CMV MGR kit, ELITech Group; CobasTaq Man CMV Test, Roche; Altona Real Star CMV PCR Kit; Alinity m CMV Assay, Abbott; Amplisens CMV Screen Monitor FRT PCR kit, InterLabService; Artus CMV LC RT-PCR kit, Qiagen; ZENA HCMV quant. PCR kit, ADM; metoda in-house.

6. Závěr

EHK 1340 – Detekce CMV DNA se zúčastnilo 31 laboratoří, které zpět poslaly výsledkový protokol. Celkem 30 laboratoří uspělo v kvalitativním stanovení CMV DNA. Kritéria pro úspěšnou účast v kvalitativním stanovení CMV DNA nesplnila 1 laboratoř.

Z celkového počtu 23 laboratoří, které se účastnily kvantitativního stanovení CMV DNA v EHK 1340, uspělo 21 laboratoří. Kritéria pro úspěšnou účast v kvantitativním stanovení nesplnily 2 laboratoře.

Laboratoře, které neuspěly, si mohou objednat edukativní vzorky prostřednictvím webové aplikace SZÚ, a to do 30 dnů po obdržení svých výsledků. Výsledky edukativních vzorků nebudou mít vliv na opravu předchozího neúspěšného výsledku v rámci EHK a slouží pouze jako podklad pro vyřešení případné neshodné práce v laboratoři.

Edukativní vzorky laboratoř obdrží obvyklou cestou v co nejkratším termínu po objednání.

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

Konec závěrečné zprávy