



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/4-1/2019 (č. 1058)

Sérologie toxoplasmózy

Praha, duben 2019

Obsah

1. Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT (Proficiency Testing) 3
2. Příprava vzorku 4
3. Vyhodnocení 4-8
4. Příloha – výsledkový protokol jednotlivé laboratoře

Program zkoušení způsobilosti PT#M/4/2019 je zaměřen na sérologii toxoplasmózy. Návrh a realizace PT#M/4/2019 byly prováděny podle standardního operačního postupu SOP M/4 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, t.j. ohodnocený výsledkový protokol, je rozesílána poštou.

Koordinátor:

RNDr. Petr Kodym, CSc.

Tel: 267 082 105

Zprávu vypracoval:

RNDr. Petr Kodym, CSc.

Zprávu schválil: RNDr. Petr Kodym, CSc.**Dne:** 30. 4. 2019**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/4-1/2019 - EHK 1058

Identifikace kola/cyklu:	PT # M/4-1/2019,EHK 1058
Název:	Sérologie toxoplasmózy
Poskytovatel:	SZÚ – Centrum epidemiologie a mikrobiologie – ESPT Šrobárova 48, Praha 10, 100 42
Vedoucí ESPT	Ing. Viera Vrbíková
Koordinátor:	RNDr. Petr Kodym, CSc.
Charakteristika materiálu:	Simulace klinického materiálu: směsné vzorky lidských sér
Podstata a účel PT:	Kvalitativní a semikvantitativní stanovení protilátek proti <i>Toxoplasma gondii</i> v kontrolních vzorcích
Kritéria pro účast na PT:	Vyšetření všech 5 vzorků, interpretace výsledků, vyplnění výsledkového formuláře a jeho odeslání na ESPT.
Způsob přípravy:	Séra pacientů vyšetřená v NRL byla smíšena tak, aby směsný vzorek měl požadovaný kvalitativní a semikvantitativní obsah stanovovaných markerů.
Množství připravovaného test. materiálu:	60 ml od každého vzorku
Označení vzorkovnic:	EHK – 1058, PT # M/4-1, č. 1 – 5, 12. 2. 2019
Zabezpečení kvality vzorku:	Přípravou podle standardních metod na akreditovaném pracovišti Vyšetření vzorků na testované markery akreditovanými metodami dle schválených SOP.
Metrologická návaznost:	Klinický materiál
Termín testu homogenity a stability:	12. - 26. 2. 2019
Podmínky distribuce a uchování vzorků:	Distribuce v předepsaném obalu. Uchování vzorků v chladničce při teplotě 2 - 8 °C.
Počet účastníků:	98
Způsob distribuce:	Zasílání kurýrní službou účastnickým laboratořím v AP určeném termínu.
Předání výsledků:	V elektronické podobě přes webové rozhraní SZÚ
Způsob vyhodnocení výsledků:	Kvalitativní a semikvantitativní výsledky a jejich interpretace jsou ohodnoceny 0-12 body/vzorek, (maximum: 60 bodů). Limit úspěšnosti se stanoví takto: od průměrného bodového ohodnocení všech laboratoří se odečtou 2 směrodatné odchylky.
Určení směrodatné odchylky:	Z hodnot bodového ohodnocení jednotlivých účastníků
Určení přijaté vztažené hodnoty:	Výsledky NRL
Termín zveřejnění závěrečné zprávy:	Do 12 týdnů po obdržení výsledků k hodnocení

2. Příprava vzorků

Výchozím materiálem pro přípravu vzorků bylo lidské sérum nebo plasma. Výchozí materiál byl dlouhodobě uskladněn při teplotě $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ a před použitím rozmrazen a skladován při teplotě 2 až 8°C .

Vzorky séra či plasmy pacientů, vyšetřovaných v NRL TOXO, byla skladována v mrazícím boxe při teplotě $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$. Poté, co uplynula lhůta povinného jednoletého skladování pro případ kontroly vyšetření, byly vzorky rozmrazeny a slity, a to tak, aby byly smíseny vždy vzorky, jež mají stejnou kategorii kvalitativního a semikvantitativního obsahu stanovovaných markerů.

Každý vzorek byl rozplněn do lahviček se šroubovacím uzávěrem a předán k rozeslání.

Vzorky byly stabilizovány 0,001% azidu sodného a **vyšetřeny s těmito výsledky:**

Vzorek EHK 1058	KFR Titr	IgG IP	IgA IP	IgM IP	IgE IP
A	Negativní	0,08 Negativní	0,07 Negativní	0,06 Negativní	0,04 Negativní
B	Negativní	0,7 Negativní	0,07 Negativní	0,06 Negativní	0,06 Negativní
C	1:128 Positivní	4,0 Positivní	0,5 Negativní	1,7 Positivní	0,4 Negativní
D	1:1024 Positivní	4,4 Positivní	2,7 Positivní	3,1 Positivní	1,4 Positivní
E	1:512 Positivní	4,4 Positivní	2,5 Positivní	3,2 Positivní	1,2 Positivní

Vzorky byly rozeslány s tímto komentářem:

Vzorky pocházejí od těhotných žen (12.-14. týden) ve věku 19-37 let, u kterých byl při screeningovém vyšetření na toxoplasmózu zjištěn pozitivní nebo hraniční výsledek testu na antitoxoplasmické IgM. O konfirmační vyšetření žádá gynekolog, dg. Z34.9.

3. Vyhodnocení

Vzorky byly rozeslány celkem 99 laboratořím, výsledkové formuláře vyplnilo 98 pracovišť. Nahlášené výsledky byly porovnávány s výsledky ostatních laboratoří a také s výsledky získanými v NRL, přičemž převažující kvalitativní i semikvantitativní výsledky byly v souladu se závěry NRL. Hodnocení bralo v úvahu vedle kvalitativních výsledků stanovení celkových antitoxoplasmických protilátek, IgG a IgM také interpretaci výsledků, a to jak typ antitoxoplasmové protilátkové odpovědi (interpretace I) tak klinické souvislosti (interpretace II). Bylo hodnoceno, zdali byl z nabídky předpřipravených hodnocení vybrán správný komentář, v případě nejasností bylo přihlíženo ke slovním hodnocením napsaným do formuláře. Za 1 vzorek může být uděleno 0-12 bodů.

EHK 1058 nebylo zcela bez problémů, přesto „bezchybných“ 60 nebo 50 bodů získaly více než tři čtvrtiny zúčastněných laboratoří. Pod oficiální hranici úspěšnosti v EHK 1058, stanovenou odečtením dvojnásobku směrodatné odchylky od průměru bodového ohodnocení, se dostala 1 (1 %) laboratoř a další dvě unikly neúspěchu o pouhou desetinu bodu (viz tabulka 1). Získání certifikátu o úspěšné účasti bude záviset na součtu bodového ohodnocení za obě letošní kola.

Tab. 1: Frekvence bodových ohodnocení laboratoří, které se zúčastnily EHK 1058

Bodů	Laboratoří	
	Počet	%
41	1	1,02%
NEUSPĚLO	1	1,02%
43	2	2,04%
45	3	3,06%
46	1	1,02%
47	4	4,08%
49	5	5,1%
50	30	30,61%
54	1	1,02%
55	5	5,1%
56	1	1,02%
57	1	1,02%
60	44	44,9%
USPĚLO	97	98,97 %
CELKEM	98	100 %

HRANICE ÚSPĚŠNOSTI: 42,9 BODU
PRŮMĚR: 54,3 BODU
SMĚRODATNÁ ODCHYLKA: 5,7

Komentáře k jednotlivým vzorkům:

Vzorky A a B neobsahovaly antitoxoplasmické protilátky, (interpretace I = „N“, viz Tab. 2 a 3). Výsledky sérologických testů nesvědčí pro toxoplasmovou infekci, těhotenství tudíž není toxoplasmózou ohroženo (interpretace II = G-). V tomto duchu se nesly i autentické **slovní komentáře laboratoří** (uvedené v uvozovkách kurzívou): „neimunní stav, při podezření na infekci *Toxoplasma gondii* dop. opakovat vyšetření v dalších trimestrech těhotenství“. „...interpretace II mohla být také G-“, tolerována je i „N“.

Vzorek C se ukázal být problematickým. Titr celkových protilátek nevyšel nijak příliš vysoký, hladina IgG byla tomu přiměřená, antitoxoplasmické IgM nízké a IgM negativní. **Slovní komentář:** „odeznívající nákaza, vzhledem k 12. až 14. týdnu těhotenství lze předpokládat, že k nákaze došlo před otěhotněním. Těhotenství není ohroženo, žena je chráněna díky specifické imunitě“ – tedy interpretace „PA“/“G-... „Dle již jen hraničního nálezu IgM protilátek usuzuji, že k infekci došlo ještě před otěhotněním. Také může jít o nespecifický vzestup IgM protilátek v graviditě.“ „U vzorku C se jedná o postakutní toxoplasmózu nebo již jen o anamnestické protilátky s nízkou zbytkovou hladinou antitoxoplasmických IgM“, „primoinfekce je nepravděpodobná“ „... gravidita nejspíše není toxoplasmózou ohrožena...“

Objevily se však i oprávněné pochybnosti: „U vzorku C nelze zcela rozhodnout, zda je gravidita toxoplasmózou ohrožena.“ „Nícméně přítomnost antitoxoplasmických IgM činí výsledek ne zcela jednoznačným a může nabídat k určité opatrnosti.“ „Nelze udělat jednoznačný závěr, těhotenství může být suspektně ovlivněno“. „Myslím, že je inf. během gravidity nepravděpodobná, ale nelze

jednoznačně vyloučit infekci v době krátce před otěhotněním. Tudiž infekci plodu nelze úplně jednoznačně vyloučit."

Některé možnosti, jak si nejednoznačné závěry ověřit, jako je zopakování vyšetření či stanovení avidity antitoxoplasmických IgG, v EHK chybí: „Bylo by vhodné vyžádat další vzorek pro posouzení event. dynamiky protilátek, event. upozornit na možnost vyš. plodové vody metodou PCR". „U reálného vzorku bych se více řídila indexem avidity IgG protilátek." Proto, aby nezavinily přehlédnutí závažného případu, se mnohé laboratoře přiklonily k interpretaci II „G+": „Vzhledem k pozitivní hodnotě Toxo IgM protilátek nelze vyloučit aktivní infekci před třemi měsíci (PA) a gravidita by pak mohla být ohrožena." „Nelze vyloučit primoinfekci těsně před otěhotněním nebo v začátku gravidity, riziko infekce plodu je možné."

A tak, i když je to paradoxní, nezbyvá než v tomto případě tolerovat protichůdné interpretace II jak „G-", tak i „G+“.

Vzorky D a E s vysokými titry celkových antitoxoplasmických protilátek a s jednoznačně pozitivními hladinami IgM a IgA a s pozitivními či alespoň hraničními hodnotami IgE odpovídají akutní toxoplasmóze, (interpretace I=„A“). Primoinfekci v graviditě s rizikem toxoplasmové infekce plodu nelze vyloučit (interpretace II = „G+“).

V tomto duchu se nesou i **slovní komentáře:** „Akutní probíhající nákaza. Doporučuji konzultaci k zajištění léčby na inf.oddělení. Signalizační hlášení infekční nemoci. Zopakovat vyšetření za 2 až 3 týdny. Jedná se o primoinfekci v těhotenství, mohlo by dojít k poškození plodu.“ „Interpretace I: Hodnocení A/PA (vzhledem k již vysoké hodnotě IgG)".

Kvalitativní i semikvantitativní výsledky, které uvádějí zúčastněné laboratoře, jsou shrnuty v tabulkách 2-4.

Tab. 2: Titry KFR, které udávají zúčastněné laboratoře (celkem: 41 pracovišť), u jednotlivých vzorků EHK 1058 a kvalitativní výsledky stanovení IgG (v mezinárodních jednotkách – celkem 80 pracovišť) v okružních vzorcích.

KFR-titr	A	B	C	D	E
neg	97,56 %	97,56 %	2,44%		
1:4	2,44%	2,44%			
1:32			4,88%		
1:64			29,27%		
1:128			34,15%	2,44%	4,88%
1:256			29,27%	17,07%	21,95%
1:512				43,9%	39,02%
1:1024				26,83%	26,83%
1:2048				9,76%	7,32%
IgG-IU/ml					
Minimum	0	0	0,2	2,79	2,73
Medián	0,37	0,3	160	400	382
Průměr	5,4	5,89	2 842,14	6 185,18	5960,7
Maximum	323	361	216 321	418 063	409 186

Tab. 3: Kvalitativní výsledky stanovení markerů toxoplasmové infekce ve vzorcích EHK 1058. „N“ udává počet laboratoří, které daný marker vyšetřují a výsledky do protokolu uvedly.

Marker	Výsledky	A	B	C	D	E
CELKOVÉ PROTILÁTKY N=54	Negativní	100 %	100%	1,85%		
	Hraniční					
	Positivní			98,15%	100 %	100 %
IgG N=98	Negativní	100 %	100%	1,02%		
	Hraniční					
	Positivní			98,98%	100%	100%
IgM N=98	Negativní	100 %	98,98%	9,18%		
	Hraniční		1,02%	17,35%		
	Positivní			73,47%	100 %	100%
IgA N=70	Negativní	92,54%	100 %	91,43%	2,86%	2,86 %
	Hraniční	4,48%		8,57%	1,43 %	1,43%
	Positivní	2,99%			95,71%	95,71 %
IgE N=40	Negativní	100 %	100 %	87,5%		
	Hraniční			12,5%	5%	5%
	Positivní				95%	95%

Tab. 4: Interpretace I a II, které udávají zúčastněné laboratoře (N=98) u jednotlivých vzorků EHK 1058.

		A	B	C	D	E
INTERPRETACE I	N	98,98%	100%	1,02%		
	S			18,37%		
	A	1,02%		14,29%	89,8%	87,78%
	PA			66,33%	10,2%	11,22%
INTERPRETACE II	N	29,59%	29,59%			
	K			1,02 %	1,02%	1,02 %
	L			1,02 %		
	G+	2,04%	1,02 %	42,86%	97,96%	96,94%
	G-	68,37 %	69,39%	55,1 %	1,02%	2,04%
	O+					
	O-					

EHK 1058 nebylo obtížné, ovšem s výjimkou vzorku C. Při interpretaci výsledků vyšetření tohoto skutečně kontroverzního vzorku jsme brali v úvahu omezení, která s sebou oproti reálné diagnostice EHK nese. Stanovení avidity IgG, na které se často při vyšetřování těhotných žen spoléhá, nebylo u směsných vzorků k užítku, neboť vyšlo pokaždé jinak: u vzorku C je hlášena avidita 2x nízká, 1x hraniční a 2x vysoká, u vzorků D a E 1x nízká, 1x hraniční a 3x vysoká. Rovněž není možno sledovat dynamiku protilátek. A „*konfirmasi všech výsledků metodou WB*“ - nemá valný smysl. Pokud laboratoř vyhodnocovala své výsledky logicky s vědomím plné odpovědnosti, bylo bodové ohodnocení maximálně tolerantní. Velice nám při tom pomohlo, když pracovníci vysvětlili svoji interpretaci slovním komentářem.

Skutečně vážných chyb bylo málo. Například bylo s podivem, proč laboratoř, které vyšly výsledky všech sérologických testů víceméně správně, z nich potom vyvodila u skoro všech vzorků zcela nesprávné interpretace. Problém se tu a tam objevil i u séronegativních vzorků: „*U vzorku A bych chtěla kontrolní odběr. Anti IgA se opakovaně pohybuje kolem cut off hodnoty.*“ Zpravidla bylo jasné, že se jedná o nespecifickou reaktivitu testu na IgA, nesprávné interpretace „A“/“G+“ byly zcela ojedinělé.

Překvapivě hodně laboratoří nevidí negativní výsledek u vzorků A a B jako úlevu, ale jako potenciální hrozbu do budoucna: „*Dle současného výsledku gravidita není nyní toxoplasmózou ohrožena, ale pacientka se může ještě během těhotenství nakazit. Vhodné doporučit kontrolu v dalším trimestru.*“ „*Doporučuji preventivně poučit o cestách přenosu toxoplasmózy a ochraně před nákazou.*“ To je v pořádku, pokud se to ovšem s hrozbou nepřezene a pokud nejsou tyto případy interpretovány jako bezprostřední riziko ohrožení těhotenství „G+“.

Nejčastější drobnou a také většinou tolerovanou chybkou byly nepřesné interpretace II, které nepoužívaly G+/G- a nezohledňovaly tak, že se jedná o vyšetření těhotných žen. Při hodnocení interpretace II bereme v úvahu, že mezi „A“ a „PA“ není jednoznačná ostrá hranice.

Výsledky EHK 1058 ukazují, že většině laboratoří při vyšetřování těhotných žen na toxoplasmózu nepůsobí potíže ani zapeklité vzorky.

A na závěr nemůže chybět **aktuální přehled používaných metod:**

V tomto kole 54 (55,1 %) laboratoří stanovuje **celkové antitoxoplasmické protilátky**, z nichž 75,9 % uvádí, že k tomuto účelu používají KFR, 13 % NIFR a 9,3 % latexovou aglutinaci.

IgG stanovují všechna pracoviště, a to s pomocí celkem 14 systémů:

TEST-Line (27,6 %), Diasorin - Liaison (21,4 %), Abbott (18,4 %), Diesse (6,1%), Access a Roche (4,1%), Biorad, Siemens a Novatec (3,1 %) a dalších.

Testy na **IgM** používají rovněž všechna pracoviště (14 systémů): TEST-Line (26,5 %), Liaison (21,4 %), Abbott (19,4 %), Diesse (6,1%), Access a Roche (4,1%), Biorad, Euroimmun, Novatec a Siemens (3,1 %) atd....

IgA stanovuje 70 (71,4 %) pracovišť celkem 9 systémy, z nichž nejpoužívanější jsou TEST-Line (65,7 %), Diesse, Euroimmun a Chorus Line (7,1 %) a NOVATEC (4,3%) zbývající používají vždy jen 1-2 laboratoře.

IgE stanovuje 40 (40,8 %) pracovišť.

3 laboratoře pracují jinými testy.

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