



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/9-1/2019 (č. 1063)
Sérologie lymeské borreliózy

Praha, květen 2019

Obsah

1.	Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT (Proficiency Testing)	3
2.	Příprava vzorků	4
3.	Hodnocení	4
4.	Výsledky vyšetřovaných vzorků	5
5.	Hodnocení podle správnosti výsledků	6-9
6.	Příloha – výsledkový protokol jednotlivých laboratoří	

Program zkoušení způsobilosti PT#M/9-1/2019 byl zaměřen na sérologii lymeské borreliózy. Návrh a realizace PT#M/9-1/2019 byly prováděny podle standardního operačního postupu SOP M/9 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 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:

RNDr. Kateřina Kybicová, Ph.D.

Tel: 267 082 108

Zprávu vypracovala:

RNDr. Kateřina Kybicová, Ph.D.

Dne: 20. 5. 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/9 - 1/2019 EHK - 1063

Identifikace kola/cyklu:	PT#M /9 - 1/2019 EHK - 1063
Název:	Sérologie lymeské borreliózy
Poskytovatel:	SZÚ – Centrum epidemiologie a mikrobiologie - ESPT Šrobárova 48, Praha 10, 100 42 tel.: + 420 267082575, fax.: + 420 267082108
Vedoucí ESPT	Ing. Viera Vrbíková
Koordinátor:	RNDr. Kateřina Kybicová, Ph.D.
Subdodavatel:	-
Charakteristika materiálu:	Sérum/ plasma
Podstata a účel PT/EHK:	Průkaz IgM a IgG protilátek proti <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l., interpretace výsledků sérologických testů
Kritéria pro účast na PT/EHK:	Vyšetření všech 5 vzorků požadovanými metodami, vyplnění elektronického výsledkového formuláře
Způsob přípravy:	Viz Protokol o přípravě vzorků
Množství připravovaného test. materiálu (očekávaný počet účastníků):	5 vzorků po 0,3ml pro 128 laboratoří (pro 15 laboratoří dvojité vzorky, 5 vzorků navíc)
Označení vzorkovnic:	EHK 1-5, viz SOP M/ 9
Zabezpečení kvality vzorku:	1. Testování kontrolních vzorků sérologickými testy ELISA 2. Kontrolní testování vzorků testem WB viz SOP M/9
Metrologická návaznost:	Viz Protokol o přípravě vzorků
Termín testu homogenity a stability:	Před distribucí vzorků po dodání vzorků do laboratoří
Podmínky distribuce a uchování vzorků:	Přeprava a krátkodobé uchování při 4 – 8°C, dlouhodobé uchování při -18 až -26°C chránit před světlem
Možné zdroje chyb:	Nedodržení správné laboratorní praxe, lidský faktor
Počet účastníků:	128 laboratoří
Termín distribuce:	5. 3. 2019
Způsob distribuce:	Rozesílání vzorků s příloženým průvodním dopisem zajišťuje dopravní služba
Předání výsledků:	Elektronicky do 26. 3. 2019 na webovém rozhraní
Způsob vyhodnocení výsledků:	Viz SOP M/9
Určení maximální směrodatné odchylky:	Z hodnot bodového ohodnocení jednotlivých účastníků
Určení přijaté vztažné hodnoty:	Vyhodnocují se kvalitativní výsledky – zařazení do kategorie negativní/hraniční/pozitivní a výběr adekvátní celkové interpretace vzorku
Termín semináře, rozeslání zprávy účastníkům:	Do 12 týdnů po obdržení výsledků k hodnocení

2. Příprava vzorku

Letošního kola EHK (1/2019 - 1063) se zúčastnilo 128 laboratoří. Série obsahovala 5 vzorků pro stanovení protilátek proti *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Výběr vzorků byl uskutečněn cíleně pro zjištění hladiny antiborreliových protilátek ve třídách IgM a IgG.

Všechny vzorky byly diagnostikovány dle SOP - NRL/LB-01, 02, z nichž pak byla vybrána reprezentativní skupina kontrolních vzorků, které se dále testovaly podle postupů SOP č M/9 pro EHK. Pro zajištění stability byl do výchozího materiálu přidán po rozmražení ProClin 950 s antibakteriálními účinky v koncentraci 0,05-0,1%.

3. Hodnocení

Konečné hodnocení bylo provedeno u 127 protokolů, které se do NRL/LB navrátily ke dni 26. 3. 2019. Jedna laboratoř výsledky nedodala.

Tabulky uvádějí výsledky laboratoří a jejich hodnocení.

3.1. Celkové hodnocení IgM a IgG

Za výsledky a slovní hodnocení každého vzorku EHK je možno získat maximálně 6 bodů. Pokud výsledek a interpretace udávaná účastníkem není v souladu s výsledky a interpretacemi získanými v NRL LB, je bodové hodnocení sníženo (hodnocení výsledků viz tabulka, hodnotící komentáře níže). Za jednu sérii EHK je celkový maximální počet 30 bodů. Sečtením bodů udělených účastníkovi za obě série vyšetřené v jednom kalendářním roce se stanoví celoroční součet.

Tabulka: Schéma hodnocení

Vzorek	Výsledky laboratoře - celkové hodnocení		
	Pozitivní	Hraniční	Negativní
IgM negativní	0 bodů	1 bod	2 body
IgM pozitivní	2 body	1 bod	- 2 body
IgG negativní	0 bodů	1 bod	2 body
IgG pozitivní	2 body	1 bod	- 2 body

3.2 Celková interpretace vzorku

Z nabídnutých možností laboratoř vybere vhodný hodnotící komentář:

0 *Sérologický výsledek neukazuje na probíhající ani pozdní fázi borreliové infekce. Časná fáze infekce nemůže být vyloučena. V případě klinických příznaků lymeské borreliózy zopakujte vyšetření po 3-4 týdnech.*

1 *Sérologický výsledek ukazuje na nedávnou či probíhající infekci *Borrelia burgdorferi* s.l. S přihlédnutím ke klinickému stavu výsledek svědčí pro časnou fázi borreliové infekce nebo se může jednat o přetrvávající protilátky.*

2 *Sérologický výsledek ukazuje na proběhlou či probíhající infekci *Borrelia burgdorferi* s.l. S přihlédnutím ke klinickému stavu výsledek svědčí pro pozdní fázi borreliové infekce nebo se může jednat o přetrvávající protilátky.*

Jestliže laboratoř uvede u vzorku správné číslo komentáře, obdrží 2 body.

Pokud je správný komentář 0, laboratoř, která uvedla některý z komentářů 1-2, obdrží 0 bodů.

Pokud je správným komentářem komentář 1 a laboratoř zvolí komentář 0, dostane -2 body, pokud uvede komentář 2, obdrží 0 bodů.

Pokud je správným komentářem komentář 2 a laboratoř zvolí komentář 0, dostane -2 body, pokud uvede komentář 1, obdrží 0 bodů.

V tomto roce došlo ke změně v celkových interpretacích vzorku, byly sloučeny dvě možnosti, viz graf:



K této změně došlo z důvodů sjednocení českých a evropských hodnocení kvality sérologie LB. Klasifikace onemocnění LB zná pouze časnou a pozdní fázi, nezná fázi probíhající. V časně fázi jsou vždy přítomné IgM. Protilátky IgG se mohou začít tvořit již během časně fáze nebo se jedná o přetrvávající IgG protilátky z minulosti.

3. Výsledky vyšetřovaných vzorků

č.vzorku	Protilátky třídy	Metoda	Hodnocení pozitivní hraniční negativní	Celkové hodnocení	Celk. interpretace	Max.počet bodů
A	IgM	EIA	negativní	negativní	0	6
		WB	negativní			
	IgG	EIA	negativní	negativní		
		WB	negativní			
B	IgM	EIA	negativní	negativní	0	6
		WB	negativní			
	IgG	EIA	negativní	negativní		
		WB	negativní			
C	IgM	EIA	negativní	negativní	0	6
		WB	negativní			
	IgG	EIA	negativní	negativní		
		WB	negativní			
D	IgM	EIA	pozitivní	pozitivní	1	6
		WB	pozitivní			
	IgG	EIA	negativní	negativní		
		WB	negativní			
E	IgM	EIA	pozitivní	pozitivní	1	6
		WB	pozitivní			
	IgG	EIA	pozitivní	pozitivní		
		WB	pozitivní			

Vzorky A, B, C jsou séra od zdravých krevních dárců bez známek proběhlé či probíhající lymeské borreliózy. Tato séra neobsahují protilátky proti *Borrelia burgdorferi* sensu lato.

Vzorky D a E pocházejí od pacientů s nespecifickými příznaky lymeské borreliózy. Obě tato séra obsahují IgM protilátky proti *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Vzorek D rovněž obsahuje IgG protilátky proti *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Vzorky D a E odpovídají časně fázi imunitní odpovědi na borreliovou infekci.

Tyto vzorky byly testovány v NRL LB deseti různými sérologickými testy nejčastěji používanými v ČR. Výsledky testů byly shodné.

Hodnocení podle počtu bodů za jednotlivé vzorky

počet bodů	vzorek A	vzorek B	vzorek C	vzorek D	vzorek E
-6	0%	0%	0%	0%	0,8%
-2	0%	0%	0%	0,8%	0%
0	0%	0%	0,8%	0%	3,1%
1	0%	0%	0%	0%	0%
2	0,8%	0%	0%	1,6%	0,8%
3	0%	0%	0%	0%	7,1%
4	0%	0%	0%	1,6%	74%
5	0%	0%	0%	1,6%	0%
6	99,2%	100%	99,2%	94,5%	14,2%

5. Hodnocení podle správnosti výsledků**IgM EIA**

Hodnocení	Vzorek A	Vzorek B	Vzorek C	Vzorek D	Vzorek E
Hraniční		1 (0,8%)		4 (3,2%)	4 (3,2%)
Negativní	125 (99,2%)	125 (99,2%)	125 (99,2%)	1 (0,8%)	15 (12%)
Pozitivní	1 (0,8%)		1 (0,8%)	121 (96%)	107 (84,9%)

CELKEM testovalo: 126 126 126 126 126

Chybné hodnocení IgM vzorku E jako negativní bylo způsobeno použitím pouze jednodruhových celobuněčných ELISA testů, v tomto případě se jednalo především o testy s detekcí protilátek *Borrelia afzelii*. Pro určení pozitivního výsledku vzorku E není tento test vhodný. Ačkoli dochází ke zkřížené reakci i mezi jednodruhovými testy, může se stát, jako v tomto případě, že ač jsou protilátky proti borrelii v séru přítomné, tak jednodruhový test je není schopen zachytit, kdežto rekombinantní či vícedruhový ano.

B.afzelii je sice nejčastěji vyskytující se borrelií způsobující LB na území ČR, ovšem velmi často se vyskytuje i *B.garinii* a další. A v takových případech je potřeba, aby sérologické testy zachytili protilátky i proti těmto dalším genodruhům borrelie.

IgM WB

Hodnocení	Vzorek A	Vzorek B	Vzorek C	Vzorek D	Vzorek E
Hraniční	1 (0,9%)				6 (5,3%)
Negativní	105 (98,2%)	105 (100%)	104 (99%)	1 (1%)	3 (2,6%)
Pozitivní	1 (0,9%)		1 (1%)	113 (99%)	104 (92,1%)

CELKEM testovalo: 107 105 105 114 113

Chybné hodnocení IgM vzorku E jako negativní či hraniční bylo způsobeno použitím především jednodruhových celobuněčných WB testů, ve výjimečných případech se jednalo o WB soupravy rekombinantní. Těmito soupravami však bylo sérum E testováno v NRL LB s pozitivním výsledkem IgM.

IgG EIA

Hodnocení	Vzorek A	Vzorek B	Vzorek C	Vzorek D	Vzorek E
Hraniční				2 (1,6%)	
Negativní	126 (100%)	126 (100%)	125 (99,2%)	123 (97,6%)	2 (1,6%)
Pozitivní			1 (0,8%)	1 (0,8%)	124 (98,4%)

CELKEM testovalo: 126 126 126 126 126

IgG WB

Hodnocení	Vzorek A	Vzorek B	Vzorek C	Vzorek D	Vzorek E
Hraniční				3 (2,8)	
Negativní	107 (100%)	106 (100%)	104 (99%)	98 (90,7%)	2 (1,8%)
Pozitivní			1 (1%)	7 (6,5%)	110 (98,2%)

CELKEM testovalo: 107 106 105 108 112

Chybné hodnocení IgG vzorku D jako pozitivní bylo způsobeno především použitím celobuněčných WB testů. Těmito soupravami však bylo sérum D testováno v NRL LB s negativním výsledkem IgG.

Celkové hodnocení IgM

Hodnocení	Vzorek A	Vzorek B	Vzorek C	Vzorek D	Vzorek E
Hraniční					9 (7,1%)
Negativní	126 (99,2%)	127 (100%)	126 (99,2%)	1 (0,8%)	5 (3,9%)
Pozitivní	1 (0,8%)		1 (0,8%)	126 (99,2%)	113 (89%)

CELKEM testovalo: 127 127 127 127 127

Chybné celkové hodnocení IgM vzorku E jako negativní či hraniční bylo způsobeno především kombinací dvou celobuněčných jednodruhových metod, které na testování tohoto vzorku nejsou vhodné. V několika dalších případech nebyl po negativním výsledku jednodruhového ELISA testu proveden WB.

Celkové hodnocení IgG

Hodnocení	Vzorek A	Vzorek B	Vzorek C	Vzorek D	Vzorek E
Hraniční				2 (1,6%)	
Negativní	127 (100%)	127 (100%)	126 (99,2%)	121 (95,3%)	2 (1,6%)
Pozitivní			1 (0,8%)	4 (3,1%)	125 (98,4%)

CELKEM testovalo: 127 127 127 127 127

Chybné celkové hodnocení IgG vzorku D jako pozitivní či hraniční bylo ve většině případů způsobeno použitím celobuněčného WB testu, ačkoli výsledek primárního ELISA testu byl negativní.

Celková interpretace

Hodnocení	Vzorek A	Vzorek B	Vzorek C	Vzorek D	Vzorek E
0	126 (99,2%)	127 (100%)	126 (99,2%)	1 (0,8%)	1 (0,8%)
1	1 (0,8%)			124 (97,6%)	19 (14,9%)
2			1 (0,8%)	2 (1,6%)	107 (84,3%)

CELKEM testovalo: 127 127 127 127 127

Chybná celková interpretace vzorku E byla u 98 ze 107 laboratoří způsobena zřejmě přehlédnutím změny v celkových interpretacích vzorku v průvodním dopise.

Výsledky nejčastěji vyšetřených antigenů IgM v metodě WB

IgM	Vzorek A		Vzorek B		Vzorek C		Vzorek D		Vzorek E	
	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N
OspC/p25	2	4		6	1	5	111		108	
FlaB/p41		4		5		4	9	3	13	3
BmpA/p39		4		6		5	4	6	1	4
DbpA/p17				1			1	1	2	
VlsE		4		5		4		5		4
p83/p100		1		2		2	1	3		2
OspB/p34							2		1	
OspA/p31		1		2		1	1	3	1	2
OspE/p19				1				2		
p21				1		1		2		1
p30				1				1		

P=pozitivní, N=negativní

Výsledky nejčastěji vyšetřených antigenů IgG v metodě WB

IgG	Vzorek A		Vzorek B		Vzorek C		Vzorek D		Vzorek E	
	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N
VlsE		4		4	1	4	1	4	110	
p83/p100		4		4	1	4	1	4	100	
FlaB/p41	24	1	23	1	24	1	31	1	79	
BmpA/p39		4		4	1	4	1	4	104	1
OspA/p31		2		2		2	1	2	25	1
OspC/p25		3	1	3	1	3	31	1	75	
DbpA/p17		2		2		2	9	2	57	1
OspB/p34	1	1	1	1	1	1	1	1	12	1
OppA/p58		4		4		4		4	59	1
NapA		1		1		1		1	27	
OspE/p19		2		2		2		2	12	1
p21		3		3		3	1	3	13	3
p30		1		1		1		1	10	1

P=pozitivní, N=negativní

Nejčastěji používané diagnostické testy

Metoda Elisa/imunoanalýzátor IgM + IgG		Metoda WB IgM + IgG	
Název	Počet uživatelů	Název	Počet uživatelů
Test - Line	59 (46,8 %)	Test - Line	48 (42,5%)
Liaison, Diasorin	38 (30,2 %)	Euroimmun	40 (35,4 %)
Euroimmun	14 (11,1 %)	Vidia	8 (7,1 %)
Vidia	5 (4%)	Virotech	6 (5,3%)
jiná (Aeskulisa, Biomerieux, Enzygnost, Vidas a další)	10 (7,9%)	Mikrogen	2 (1,8 %)
		Viramed	3 (2,7 %)
		jiná	6 (5,3 %)

EIA n= 126

WB n= 113

Celkové hodnocení 127 laboratoří v PT#M/9-1/2019 (EHK 1063)

	Počet bodů	Počet laboratoří	%
	30	18	14,2 %
	28	89	70,1 %
	27	11	8,7 %
	26	2	1,6 %
	24	5	3,9%
Uspělo		125	98,4 %
	22	1	0,8 %
	0	1	0,8 %
Neuspělo		2	1,6 %

Maximální počet dosažených bodů: 30**LIMIT 24 bodů**

Závěr: Hranice úspěšnosti byla stanovena na 24 bodů. Průměrný počet bodů byl 27,7. **Úspěšně** zpracovalo vzorky **98,4 %** laboratoří, pouze **14,2 %** identifikovalo vzorky **bezchybně. Limit nesplňují 2 laboratoře (1,6%).**

V letošním kole došlo k velké chybovosti a to především díky přehlédnutí změny v celkových interpretacích vzorku v průvodním dopise. Pouze 18 laboratoří ze 127 získalo plný počet bodů. Díky přehlédnutí změny v celkových interpretacích získalo 89 laboratoří o dva body méně. Další bodové srážky byly způsobeny kumulacích chyb, popsanych výše.

Hranice úspěšnosti byla díky těmto chybám stanovena nízko a to na 24 bodů. U dvou laboratoří, které v tomto kole neuspěly, došlo při hodnocení vzorků k hrubým chybám.

Poznámky:

Podmínkou pro získání certifikátu o úspěšné účasti je účast v obou letošních kolech EHK sérologie lymeské borreliózy.

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

Hranici úspěšnosti pro jednotlivé kolo dané série nelze stanovit předem, neboť záleží na míře shody hodnocené laboratoře s NRL LB a zároveň na míře shody mezi zúčastněnými laboratořemi dohromady. Obvykle se hranice úspěšnosti nalézá v rozmezí 80 až 90 % z možného celkového počtu bodů. Účastník úspěšně absolvuje kolo EHK, pokud dosáhne bodového limitu. Pokud obsahují výsledky účastníka jednu nebo více odchylek od výsledků získaných v SZÚ, tento nárok zaniká, přičemž organizátor si vyhrazuje právo ponechat konečné rozhodnutí výhradně na odborném posouzení VŠ pracovníka, odpovědného za příslušný typ EHK. Tento pracovník posuzuje jednak závažnost samotné odchylky, jednak všechny související faktory s touto odchylkou spojené.