



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/4-2/2019 (č. 1089)
Sérologie toxoplazmózy

Praha, prosinec 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 toxoplazmózy. 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, tj. 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:** 13. 12. 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/4-2/2019 - EHK 1089

Identifikace kola/cyklu:	PT # M/4-2/2019, EHK 1089
Název:	Sérologie toxoplazmózy
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 – 1089, PT # M/4-2, č. 1 – 5, 17. 9. 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:	17.9. - 17. 10. 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. Výchozí materiál byl dlouhodobě uskladněn při teplotě $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ a před použitím rozmražen a skladován při teplotě 2 až 8°C .

Séra 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 lahvíček se šroubovacím uzávěrem a předán k rozeslání.

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

Vzorek EHK 1089	KFR Titr	IgG IP	IgA IP	IgM IP	IgE IP
A	Negativní	0,07 Negativní	0,10 Negativní	0,19 Negativní	0,17 Negativní
B	1:8 Positivní	1,27 Positivní	0,08 Negativní	0,22 Negativní	0,20 Negativní
C	1:16 Positivní	1,51 Positivní	0,14 Negativní	0,40 Negativní	0,19 Negativní
D	1:64 Positivní	2,85 Positivní	0,36 Negativní	0,64 Negativní	0,29 Negativní
E	1:1024 Positivní	3,09 Positivní	2,38 Positivní	3,15 Positivní	1,59 Positivní

Vzorky byly rozeslány s tímto komentářem:

Vzorky pocházejí od mužů ve věku 15-28 let, kteří si stěžují na poruchy zraku - zhoršení vizu, zamžené vidění a bolesti očí. Oftalmologický nález odpovídá ložiskové nekrotizující retinitidě. Oční lékař požaduje sérologické vyšetření na toxoplazmózu (dg. H30.0.).

3. Vyhodnocení

Vzorky byly rozeslány celkem 99 laboratořím, k vyhodnocení v Národní referenční laboratoři pro toxoplazmózu (NRL TOXO) se vrátilo 98 vyplněných dotazníků. 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 i tentokrát přihlíženo ke slovním hodnocením napsaným do formuláře. Za 1 vzorek může být uděleno 0-12 bodů.

Jak je vidět z tabulky 1, „bezchybných“ 60 nebo 50 bodů získalo 40,8 % zúčastněných laboratoří. Pod oficiální hranici úspěšnosti v EHK 1089, stanovenou odečtením dvojnásobku směrodatné odchylky od průměru bodového ohodnocení, se dostaly 4 (4 %) laboratoří (viz tabulka 1).

Certifikát o úspěšné účasti v EHK sérologie toxoplazmózy v roce 2019 dostanou ty laboratoře, které se zúčastnily obou letošních kol a získaly dohromady alespoň 81,7 bodů, což splnily 94 z 97 účastníků EHK 1058+1089. Maximálně možných 120 bodů dosáhlo 32 % a skóre 100 bodů 11,3 % laboratoří, průměrné ohodnocení bylo 106,7 bodu, medián 109 bodů. Naopak získ méně než 99 bodů řadí laboratoř do poslední třetiny a méně než 92 bodů do poslední čtvrtiny. Ohodnocení 89 bodů a nižší znamená, že se laboratoř propadla do poslední osminy. **Celoroční výsledky jsou na bodovacím formuláři dopsány nad ohodnocením v EHK 1089.**

Výsledky, které laboratoře uvádějí, jsou shrnuty v tabulkách 2-4; správné interpretace a komentáře k jednotlivým vzorkům uvádíme v následujícím textu. „Autentické slovní komentáře laboratoří jsou uvedeny v uvozovkách kurzívou.“

Tab. 1: Frekvence bodových ohodnocení laboratoří, které se zúčastnily EHK 1089

Bodů	Laboratoří	
	Počet	%
25	1	1,02 %
32	1	1,02 %
36	2	2,04 %
38	1	1,02 %
39	1	1,02 %
40	4	4,08 %
41	2	2,04 %
42	2	2,04 %
43	2	2,04 %
44	2	2,04 %
45	1	1,02 %
47	3	3,06 %
48	3	3,06 %
49	8	8,16 %
50	16	16,33 %
51	2	2,04 %
52	2	2,04 %
57	1	1,02 %
58	5	5,1 %
60	39	39,8 %
CELKEM	98	100 %

HRANICE ÚSPĚŠNOSTI: 36,1 BODU
SMĚRODATNÁ ODCHYLKA: 8,1
PRŮMĚR: 52,3 BODU

Vzorek A je sérologicky negativní – v celkových antitoxoplasmických protilátkách, IgG, IgM, IgA i IgE. Séronegativita (interpretace I = "N") znamená, že se nejedná o infekci *Toxoplasma gondii*. „V případě negativity IgG není oční f. toxoplazmózy pravděpodobná“ (interpretace II = "O-"), byť i není stoprocentně vyloučená. Pokud byla uvedena interpretace II = "N", bylo to víceméně správně, avšak s ohledem na oční toxoplazmózu lze považovat tuto interpretaci za poněkud nepřesnou.

Ke vzorku A mnoho komentářů nebylo, jeden byl ne zcela jednoznačný: „A - probíhající toxoplazmóza, i když je málo pravděpodobná“.

Vzorky B, C a D obsahovaly antitoxoplasmické protilátky. Positivní výsledek dávaly testy na celkové protilátky a na IgG, zatímco vyšetření na IgM, IgA a IgE vycházela negativní. Tyto výsledky odpovídají toxoplazmóze prodělané před delším (B a C) nebo možná i kratším (vzorek D) časem (interpretace I="S"). Přítomnost protilátek svědčí pro toxoplasmovou infekci, takže případné změny na očním pozadí mohou souviset s toxoplazmózou (interpretace II="O+").

Ačkoliv z hlediska interpretace patřily tyto tři vzorky do stejné kategorie, výrazně se lišily titry celkových protilátek a hladinami IgG (viz tab. 2). Ty byly **u vzorku B** na samé hranici positivity, zatímco u vzorku D dosahovaly poměrně vysokých hodnot. To většinu laboratoří nevyvedlo z míry a své výsledky interpretovaly správně. Laboratoří, kterým vyšel vzorek B jako negativní, bylo poměrně málo. Některé váhaly, ale nakonec rozhodly správně: „IgG vyšetřeno opakovaně, vždy na hranici positivity“; „Nebyly zachyceny celkové protilátky (nižší hraniční fluorescence).“

Doporučuji opakovat odběr pro možnost nescifické positivity IgG protilátek. V případě potvrzení nescifity by hodnocení dalšího vzorku bylo N, O-. „B dle hraniční hodnoty indexu avidity 0,5-0,59 (!?) nelze zcela vyloučit i interpretaci PA, i když dle hodnot IgA a IgM se jeví málo pravděpodobně“; „Vzhledem k nejasnému výsledku KFR, hraničním hodnotám testu ELISA a negativnímu blotu doporučujeme další odběr s časovým odstupem. Souvislost klinických obtíží s toxoplazmózou nelze vyloučit.“ Jedna laboratoř nevěřila pozitivnímu výsledku KFR u vzorku B. Vše ostatní ale vyšlo negativní a na základě těchto výsledků byly obě interpretace špatně.

Naopak **u vzorků C a** ještě více **u D** sváděly vysoké titry k interpretacím I ve smyslu postakutní nebo dokonce akutní toxoplazmózy, aniž by to potvrzovala pozitivita IgM či IgA. Vz. C: „Infekce pravděpod. proběhla před delším časem, i když nelze zcela vyloučit i interpretaci PA“. V každém případě platí, že „souvislost serologického nálezu s klinickými projevy u pacienta je diskutabilní. Vzhledem k všeobecně vysoké seroprevalenci toxoplazmózy je rozhodující oftalmologický nález.“

Tab. 2: Titry KFR, které udávají zúčastněné laboratoře (celkem: 41 pracoviště), u jednotlivých vzorků EHK 1089 a kvalitativní výsledky stanovení IgG (v mezinárodních jednotkách - celkem: 83 pracoviště) zjištěné v okružních vzorcích.

KFR-titr	A	B	C	D	E
0	97,56%	7,5%			
2	2,44%				
4		5%			
8		67,5%	43,9%		
16		17,5%	46,34%	2,44%	
32			4,88%	4,88%	
64			2,44%	43,9%	
128			2,44%	43,9%	2,44%
256		2,5%		2,44%	9,76%
512				2,44%	56,1%
1024					31,71%
IgG-IU/ml					
Minimum	0	1,22	0,61	2,41	5,38
Medián	0,84	9,68	21,4	131	400
Průměr	5,69	13,28	30,14	165,6	486,5
Maximum	318	61,67	140,2	1128	5093

Vzorek E se vyznačoval vysokým titrem celkových protilátek a jednoznačnou pozitivitou antitoxoplasmických IgA, IgG, IgE i IgM (viz tab. 3). Je vcelku nepochybné, že se jedná o toxoplazmózu, možná dokonce akutní (interpretace I=„A“); „vzhledem k vysoké hladině IgG protilátek je možné hodnotit také jako PA.“ „Vzhledem k vysoké hladině IgG a nízké IgM se spíše jedná o postakutní fázi infekce. Může se však jednat i o fázi akutní.“ Namísto je zde interpretace II=„O+“ (viz tab. 4), i když je pravdou, že „v akutním stádiu toxoplasmové infekce by byl nález oční formy spíše vyjíměčný. V postakutním stádiu souvislost s očním postižením nelze vyloučit.“

Tab. 3: Kvalitativní výsledky stanovení markerů toxoplasmové infekce ve vzorcích EHK 1089. „N“ udává počet laboratoří, které daný marker vyšetřují a výsledky do protokolu uvedly.

Marker	Výsledky	A	B	C	D	E
CELKOVÉ PROTILÁTKY N=53, 54	Negativní	98,15%	7,55%		1,85%	
	Hraniční		7,55%	3,7%		
	Positivní	1,85%	84,91%	96,3 %	98,15%	100%
IgG N=98	Negativní	96,94%	7,14%	1,02%	2,04%	
	Hraniční	2,04%	15,31%		1,02%	
	Positivní	1,02%	77,55%	98,98%	96,94%	100%
IgM N=98	Negativní	98,98%	100%	100%	90,82%	
	Hraniční				8,16%	
	Positivní	1,02%			1,02%	100%
IgA N=66, 70	Negativní	100%	100%	98,48%	87,88%	2,86%
	Hraniční					
	Positivní			1,52%	12,12%	97,14%
IgE N=38, 40	Negativní	100 %	100 %	100 %	100 %	
	Hraniční					5%
	Positivní					95%

Aviditu antitoxoplasmických IgG v EHK TOXO nestanovujeme a nevyhodnocujeme, nicméně několik laboratoří nám „mimo soutěž“ výsledky napsalo do komentáře. Vychází to takto:

vzorek B: 3x vysoká, 7x hraniční

vzorek C: 4x vysoká

vzorek D: 3x vysoká, 2x hraniční, 3x nízká

vzorek E: 4x vysoká, 2x hraniční, 2x nízká

Vidíme tedy, že výsledky jsou značně variabilní a mají tudíž nízkou vypovídací hodnotu. Když laboratoř u vzorku D (IgM, IgA měla negativní !) zjistila nízkou aviditu IgG a zvolila interpretaci I „A“, udělala chybu. Záleží též na stanovení mezí vysoké, hraniční a nízké avidity u jednotlivých diagnostických setů, Zarazilo mne, jak vysoko může někdy nízká avidita jít: „67,8% - nízká avidita, 75,5% - šedá zóna“ (!?!). Tu a tam se objevuje i podivuhodná terminologie: namísto označení avidita vysoká/nízká někde používají avidita negativní/positivní! Hlavně že si rozumíme!

Toto kolo EHK bylo o trochu obtížnější než kola předchozí, ale přesto si naprostá většina laboratoří s vyšetřením na oční toxoplazmózu poradila. Problémy nebyly s kvalitativním ani

semikvantitativním stanovením antitoxoplasmických protilátek různých tříd – výsledky byly až na ojedinělé výjimky správné, a to i u těch nejproblematičtějších vzorků B a D. Nepříliš časté potíže mohly nastat při interpretaci výsledků. Některé laboratoře nezaznamenaly, že při diagnostice oční toxoplazmózy platí trochu jiná pravidla, například že se oční toxoplazmóza může projevit u pacientů, kteří akutní toxoplazmózu prodělali už dávno a mají jen nízké hladiny „anamnestických“ protilátek. Vzorkům B, C a někdy i D byla udělena interpretaci II=“O-“, zatímco „O+“ dostal jen vzorek E (nebo ještě i D), což bylo skoro naopak. Tu a tam se stávalo, že ze správných výsledků byla vyvozena nesprávná interpretace – například u IgM-negativních vzorků interpretace I=“A“ nebo „PA“. Rovněž by bylo lepší, kdyby při diagnostice oční toxoplazmózy byly používány „specifické“ interpretace O+/O-, aby byla zřejmá odpověď na otázku, jestli se může nebo nemůže jednat o oční toxoplazmózu. V přinejmenším jednom případě pravděpodobně laboratoř zaměnila vzorky.

Tab. 4: Interpretace I a II, které udávají zúčastněné laboratoře (N=98) u jednotlivých vzorků EHK 1089.

		A	B	C	D	E
INTERPRETACE I	N	97,96%	9,18%	1,02%	1,02%	
	S		88,78%	98,98%	79,59%	1,03%
	A	1,02%	1,02%		4,08%	80,41%
	PA	1,02%	1,02%		15,31%	18,56%
INTERPRETACE II	N	15,31%			1,02%	
	K		1,02%			1,02%
	L		1,02%	2,04%	3,06%	
	G+					
	G-					
	O+	2,04%	73,47%	78,57%	89,8%	98,98%
	O-	82,65%	24,49%	19,39%	6,12%	

A na závěr tradiční **přehled použitých metod:**

V tomto kole 54 (55,1 %) laboratoře stanovuje **celkové antitoxoplasmické protilátky**; z nichž 76 % 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 (14,3 %)+Liaison (9,2 %), Abbott (19,4 %), , Access a Roche (4,1%), Platelia Biorad, Siemens a Novatec (3,1%) a dalších.

Testy na **IgM** používají rovněž všechna pracoviště (13 systémů): TEST-Line (26,5 %), Liaison (23,5%), Abbott (19,4 %), Diesse (5,1%) Access a Roche (4,1%), Biorad, Euroimmun, Novatec, a Siemens (3,1 %) a další.

IgA stanovuje 70 (71,4%) pracovišť celkem 8 systémy, z nichž nejpoužívanější jsou TEST-Line (70 %), Diesse a Chorus Line (7,1 %), Euroimmun a Novatec (4,3 %); zbývající používají vždy jen 1-2 laboratoře.

IgE stanovuje 40 (40,8) % pracovišť.

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