



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/4-2/2021 (EHK 1214)

Sérologie toxoplasmózy

Praha, prosinec 2021

Obsah

1. Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT (Proficiency Testing)	3
2. Způsob přípravy vzorků	4
3. Charakteristika materiálu	4
4. Způsob hodnocení	4
5. Vyhodnocení	5
6. Závěr	8

Příloha – výsledkový protokol jednotlivé laboratoře

Program zkoušení způsobilosti PT#M/4/2021 je zaměřen na sérologii toxoplasmózy. Návrh a realizace PT#M/4-2/2021 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 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: <https://ehk.szu.cz/EHK10/> po přihlášení kódem laboratoře a heslem

Zprávu vypracoval:

RNDr. Petr Kodym, CSc., NRL pro toxoplazmózu, SZÚ Praha

Zprávu autorizoval:

RNDr. Petr Kodym, CSc.

Tel: 267 082 105

Dne: 8.12.2021

Pracoviště 2 ESPT

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

e-mail: ehk@szu.cz

1. Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT# M/4-2/2021

Identifikace kola/cyklu:	EHK 1214
Název:	Sérologie toxoplasmózy
Koordinátor:	RNDr. Petr Kodym, CSc.
Charakteristika materiálu:	Viz kapitola 3
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:	viz kapitola 2
Množství připravovaného testovaného materiálu:	60 ml od každého vzorku
Označení vzorkovnic:	EHK 1214, PT # M/4-2, č. 1 – 5, 21.9.2021
Zabezpečení kvality vzorku:	Garance adekvátního obsahu specifických protilátek: Příprava podle standardních metod na akreditovaném pracovišti, vyšetření vzorků na testované markery akreditovanými metodami dle schválených SOP. Stabilita vzorku: průběžná kontrola, adekvátní skladování, stabilizace 0,001% azidu sodného.
Test homogenity a stability:	Výchozí materiál je testován na příslušné cílové markery. Finální vzorek je opakovaně testován na všechny příslušné cílové markery před i po rozplnění v čase, kdy laboratoře vzorky vyšetřují.
Podmínky distribuce a uchování vzorků:	Distribuce v předepsaném obalu. Krátkodobé uchování vzorků v chladničce při teplotě 2 - 8 °C, dlouhodobě při -18 až -24°C, zamezit opakovanému zamrazování a rozmrazování.
Možné zdroje chyb:	Nedodržení správné laboratorní praxe, lidský faktor.
Počet účastníků:	102
Termín distribuce:	21.9.2021
Způsob distribuce:	Přepravní službou (zajišťuje Koordinační pracoviště ESPT 2)
Předání výsledků:	V elektronické podobě přes webové rozhraní SZÚ za použití aplikace EHK 10
Způsob vyhodnocení výsledků:	Viz kapitola 4. 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 očekávaných výsledků:	14.10.2021
Termín zveřejnění závěrečné zprávy:	Do 4.1.2021

2. Způsob přípravy 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 skladován při teplotě 2 až 8°C .

Vzorky séra či plasmy pacientů, vyšetřovaných v NRL TOXO, byly skladovány v mrazicím 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 stabilizován 0,001% azidu sodného, rozplněn do lahvíček se šroubovacím uzávěrem a předán k rozeslání.

3. Charakteristika materiálu

Simulace klinického materiálu: směsné vzorky lidských sér či plasmy, odpovídající svým kvalitativním i semikvantitativním obsahem jednotlivých tříd antitoxoplasmických protilátek skutečným vzorkům zasílaným k diagnostice toxoplasmózy. Výsledky vyšetření vzorků v NRL TOXO shrnuje tabulka 1.

Vzorek EHK 1214	KFR Titr	IgG IP	IgA IP	IgM IP	IgE IP	AVIDITA IgG IAv
A	N Negativní	0,3 Negativní	0,1 Negativní	0,2 Negativní	0,1 Negativní	-
B	N Negativní	0,25 Negativní	0,1 Negativní	0,1 Negativní	0,1 Negativní	-
C	1:8 Positivní	2,8 Positivní	0,1 Negativní	0,3 Negativní	0,1 Negativní	Vysoká
D	1:32 Positivní	4,5 Positivní	0,3 Negativní	0,6 Negativní	0,3 Negativní	Vysoká
E	1:1024 Positivní	6,6 Positivní	2,3 Positivní	2 Positivní	1,8 Positivní	Vysoká

Tab. 1: Výsledky vyšetření vzorků EHK 1214 v NRL TOXO.

Vzorky byly rozeslány s tímto komentářem: Vzorky pocházejí od pěti mužů ve věku 16-81 let, kteří se v době jarního lockdownu účastnili utajeného večírku spojeného s opékáním divočáka. Vzhledem ke konspiračním podmínkám a amatérskému provedení vyvstaly pochybnosti, zdali bylo maso dostatečně tepelně upravené. Někteří účastníci večírku si poté začali stěžovat na přetrvávající únavnost a bolesti kloubů. Praktická lékařka u nich žádá o vyšetření na toxoplasmózu, dg. B58.9.

4. Způsob hodnocení

Vzorky byly rozeslány celkem 102 laboratořím, výsledkové formuláře vyplnilo 100 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.

5. Vyhodnocení

	Laboratoř	
	Počet	%
29	1	1%
34	1	1%
41	1	1%
NEUSPĚLO	3	3%
42	4	4%
44	3	3%
47	2	2%
48	3	3%
50	37	37%
52	3	3%
55	1	1%
57	1	1%
58	3	3%
60	40	40 %
USPĚLO	97	97 %
CELKEM	100	100 %

Tab. 2: Frekvence bodových ohodnocení laboratoř, které se zúčastnily EHK 1214

HRANICE ÚSPĚŠNOSTI: 41,2 BODU
PRŮMĚR: 53,6 BODU
SMĚRODATNÁ ODCHYLKA: 6,2

Certifikát o úspěšné účasti v EHK sérologie toxoplasmózy v roce 2021 dostanou ty laboratoře, které se zúčastnily obou letošních kol a získaly dohromady alespoň 84 bodů (**hranice úspěšnosti: 80,6 bodu**), což splnilo 98 ze 100 účastníků EHK 1176+1214. Certifikát nedostanou laboratoře, které se zúčastnily pouze jarního (1) kola + 2 laboratoře neúspěšné v obou kolech. Ze 100 laboratoř, které splnily podmínku účasti v obou kolech, dosáhlo maximálně možných 120 bodů 30 % a skóre 100 bodů 26 % laboratoř, **průměrné ohodnocení bylo 106,4 bodu, směrodatná odchylka 12,9 bodu, medián 108 bodů**. Naopak získá 97 a méně bodů řadí laboratoř do poslední pětiny a 91 a méně bodů do poslední desetiny, kde jsou i 4 laboratoře, které neuspěly v alespoň v jednom z letošních kol. 2 laboratoře byly neúspěšné v obou kolech.

Výsledky sérologických testů, které laboratoře uvádějí, jsou shrnuty v tabulkách 3, 4 a 6, jejich interpretace v tabulce 5. Správné interpretace a komentáře k jednotlivým vzorkům uvádíme v následujícím textu. „*Autentické slovní komentáře laboratoř jsou uvedeny v uvozovkách kurzívou.*“

Komentáře k jednotlivým vzorkům:

Vzorky A a B byly sérologicky negativní ve všech parametrech (viz Tab. 3 a 4), interpretace I = „N“. Výsledky sérologických testů nesvědčí pro toxoplasmovou infekci, interpretace II = „N“. Na těchto závěrech se shodli, snad s výjimkou 2 laboratoř, všichni účastníci EHK 1214. Nejistotu z výsledku testů vyjadřují tyto komentáře: „*Hladina Toxo IgG je v neurčité zóně, opakovat test za 3 týdny. V případě akutní toxoplasmózy dojde ke zvýšení koncentrace protilátek.*“ „*U vzorků A a B bychom doporučily odběr s odstupem 3 týdnů. Avidita IgG u těchto vzorků z důvodu nízkých hodnot (negativních) nebyla provedena.*“

U **vzorků C a D** vycházely pozitivní testy jak na celkové antitoxoplasmické protilátky tak na IgG, přičemž testy na IgA, IgE i IgM byly převážně negativní (viz Tab. 3 a 4), interpretace I = „S“. Jedná se tedy o „*latentní nákazu, anamnestické titry protilátek po prožití infekci*“ interpretace II = „L“, případné klinické obtíže zřejmě s toxoplasmózou nesouvisí. **Vzorek C** s nízkými titry celkových protilátek byl bez problémů, pouze výjimečně vycházel jako negativní. Asi dvakrát se u něj objevily protichůdné interpretace: zatímco interpretace I byla hlášena jako "Séropozitivní", interpretace II téhož vzorku byla "Negativní".

U **vzorku D** sice titry celkových protilátek i hladiny antitoxoplasmických IgG vycházely vyšší, ale interpretace byla stejná: „*latentní nákaza, anamnestické titry protilátek po prožití infekci*“. Ani ne čtvrtině

laboratoří, jejichž metody jsou vysoce citlivé, zkomplikoval interpretaci záchyt antitoxoplasmických IgM (viz tab. 4). Většinou se jednalo o hraniční hladiny (ty byly akceptovány bez stržení bodu), které interpretaci výsledků prakticky neovlivnily: „IgM by mohly být i hraniční (Liaison má cutt-off (6,0) nastaven spíše "tvrději", z klinického hlediska to ale nemá praktický význam" „Mohlo by se také jednat jen o nespecifické IgM, pak by interpretace byla S/L." „Pravděpodobně se jedná o dlouhodobě přetrvávající hladiny IgM." „Postakútna toxoplazmóza alebo skôr séropozitívne, toxoplazmóza prekonaná pred dlhším časom, o čom svedčí nižší titer IgG a hraničné IgM."

Přes tento mírně matoucí nálezný je drtivá většina interpretací I i II u vzorku D správných (viz tab. 5). Jen málo laboratoří se nechalo zvíkat: „Při nepřilíš vysokém titru celkových protilátek o by se mohlo jednat i o počínající toxoplazmózu", dokonce i při negativním IgM: „Pozitivita protilátek detekována sice pouze ve třídě IgG, ale markery akutního onemocnění, především IgM jsou těsně pod hraniční hodnotou. Při nepřilíš vysokém titru celkových protilátek o by se mohlo jednat i o počínající toxoplazmózu." Jiné připouštěly i bájnou variantu: „...nebo se může jednat o reaktivaci latentní infekce", nebo byly naprosto bezradné: „Neurčité výsledky. Testovat znovu za 3 týdny. Pokud se bude jednat o akutní toxoplazmózu, dojde k nárůstu titru protilátek."

Tab. 3: Titry KFR, které udávají zúčastněné laboratoře (celkem: 36 pracovišť), u jednotlivých vzorků EHK 1214 a kvalitativní výsledky stanovení IgG (v mezinárodních jednotkách – celkem 85 pracovišť) v okružních vzorcích.

KFR – titr	A	B	C	D	E
0	94,29%	94,29%	8,33%		
1:4	5,71%	5,71%	22,22%		
1:8			55,56%	5,56%	
1:16			8,33%	27,78%	
1:32			5,56%	55,56%	
1:64				11,11%	2,78%
1:128					11,11%
1:256					22,22%
1:512					47,22%
1:1024					16,67%
IgG-IU/ml					
Minimum	0	0	6,7	0,34	100
Medián	1,27	1	21,7	66,56	344
Průměr	1,8	1,72	36,71	85,71	424,83
Maximum	6,42	5,51	156,9	348,7	5718

Vzorek E s vysokými titry celkových antitoxoplasmických protilátek a s jednoznačně pozitivními hladinami IgM a IgA a s pozitivními hodnotami IgE odpovídá „akutní probíhající infekci" (interpretace I=„A"), „Interpretace I možná i jako A, pokud nevěříme aviditě (bloty IgA hr, IgM neg a IgG pozit také svědčí spíše pro PA)"; „U vzorku E nelze vyloučit ani akutní toxoplazmosu (vyšetření avidity ale u EHK vzorků neprovádíme), interpretaci PA jsme upřednostnili vzhledem k poměru hladin protilátek (poměrně nízká hladina IgM při velmi vysoké hladině IgG), každopádně profil protilátek by odpovídal primoinfekci v udané

době (tj. na jaře cca půl roku před odběrem, je-li to tak myšleno)"; „vzhledem k vysoké hladině IgG protilátek nelze vyloučit ani postakutní fázi infekce". Případné klinické obtíže mohou mít souvislost s toxoplasmózou (interpretace II = „K"). Opět bájná varianta: „Vysoká avidita u vz. E může nasvědčovat reaktivaci latentní toxoplasmózy".

Na rozdíl od vzorku D byl vzorek E bezproblémový jak co do výsledků sérologických testů, tak i z hlediska interpretací.

Tab. 4: Kvalitativní výsledky stanovení markerů toxoplasmové infekce ve vzorcích EHK 1214. „N“ udává počet laboratoří, které daný marker vyšetřují a výsledky do protokolu uvedly.

Marker	Výsledky	A	B	C	D	E
CELKOVÉ PROTILÁTKY N=49	Negativní	100 %	100 %	10,2%		
	Hraniční			12,24 %		
	Positivní			77,55 %	100 %	100 %
IgG N=99	Negativní	96,97%	97%			
	Hraniční	2,02%	2%		1%	
	Positivní	1,01%	1%	100%	99%	100%
IgM N=99	Negativní	100 %	100 %	100 %	76,77%	
	Hraniční				16,16%	
	Positivní				7,07%	100%
IgA N=70	Negativní	100%	100 %	97,01%	94,12%	
	Hraniční				5,88%	
	Positivní			2,99%		100 %
IgE N=40	Negativní	100 %	100 %	100%	100%	
	Hraniční					
	Positivní					100%

Tab. 5: Interpretace I a II, které udávají zúčastněné laboratoře (N=100) u jednotlivých vzorků EHK 1214.

		A	B	C	D	E
INTERPRETACE I	N	98%	98%	1%		
	S	1%	1%	98%	85%	
	A				3%	81%
	PA	1%	1%	1%	12%	19%
INTERPRETACE II	N	98%	98%	4%	1%	
	K	1%	1%	1%	9%	99%
	L	1%	1%	95%	90%	1%
	G+					
	G-					
	O+					
	O-					

Tabulka 6 ukazuje kvalitativní výsledky **stanovení avidity IgG** „mimo soutěž“ ve 45 laboratořích (ne každá z nich stanovovala aviditu u všech vzorků). Je z ní vidět, že zatímco u jednoznačně „neakutních“ vzorků C a D panuje převážná shoda na vysoké aviditě, u „potenciálně akutního“ vzorku E jsou výsledky téměř rovnoměrně (mírně převažuje hraniční) rozděleny mezi všechny tři alternativy. Tyto výsledky vyšetření směsných vzorků mají určitou výpovědní hodnotu, ale především u vzorků, kde je i tak jasné, že akutní toxoplasmózu nereprezentují.

Tab. 6: Výsledná avidita IgG. Aviditu u jednotlivých vzorků stanovovalo 45 laboratoří zúčastněných v EHK 1214. V NRL TOXO vyšla avidita vzorku C vysoká, u D vysoká a u vzorku E vysoká.

*) Jediná laboratoř, která stanovila aviditu IgG u séronegativních vzorků A a B, hlásí nízkou aviditu.

Vzorek	Avidita IgG		
	Nízká	Hraniční	Vysoká
A	*		
B	*		
C	2,94%	5,88%	91,18%
D	10%	25%	65%
E	28,89%	37,78%	33,33%

A na závěr obvyklý **aktuální přehled používaných metod:**

V tomto kole 48 (48%) laboratoří stanovuje **celkové antitoxoplasmické protilátky**, z nichž 75% uvádí, že k tomuto účelu používají KFR, 14,58% NIFR a 10,42 % latexovou aglutinaci.

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

TEST-Line (30%), Diasorin - Liaison (21%), Abbott (20%), Diesse (5%), Access a Novatec (4%), Biorad, Cobas a Roche (3%) a dalších.

Testy na **IgM** používají rovněž všechna pracoviště (14 systémů): TEST-Line (30%), Liaison (21%), Abbott (20%), Diesse (5%), Access (4%), Biorad, Cobas, Roche a Novatec (3%) atd....

IgA stanovuje 70 (70%) pracovišť celkem 6 systémy, z nichž nejpoužívanější jsou TEST-Line (72,86%), Diesse (7,14%), Euroimmun a Chorus Line a NOVATEC (5,71%) a Biorad 2,86%).

IgE stanovuje 40 (40 %) pracovišť.

Další testy využívají 1 nebo 2 laboratoře.

6. Závěr

Z výsledků hodnocení (viz Tab.2) je patrné, že EHK 1214 nebylo obtížné a že diagnostika akutní toxoplasmózy nečiní většinu zúčastněných potíže. Díky tomu 77% laboratoří dostalo „bezchybné“ hodnocení 60 nebo 50 bodů.

Skutečně vážných chyb bylo opravdu málo, spíše než s kvalitativními nebo semikvantitativními výsledky mohou tu a tam nastat potíže s interpretacemi. Občasnou chybou bylo, že do formuláře u některých vzorků byly a u jiných nebyly zadány výsledky všech povinných stanovení - jmenovitě IgG a IgM.

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

KONEC ZÁVĚREČNÉ ZPRÁVY