



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/6/2020 (č. 1114)
Sérologie Epstein-Barróvé viru

Praha, duben 2020

Obsah

1.	Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT (Proficiency Testing)	3
2.	Příprava vzorků	4
3.	Charakteristika vzorků	4
4.	Způsob hodnocení	5
5.	Vyhodnocení	5-7
6.	Závěr	7
	Příloha – výsledkový protokol jednotlivé laboratoře	

Program zkoušení způsobilosti PT#M/6/2020 je zaměřen na sérologická vyšetření viru EBV, jejich citlivost, specifitu a vyhodnocení. Porovnává způsobilost a dovednosti jednotlivých laboratoří ve vyšetřování a interpretacích sérologických výsledků, ukazuje celkovou úroveň diagnostiky EBV v ČR.

Návrh a realizace PT#M/6/2020 byly prováděny podle standardního operačního postupu SOP M/6 na pracovišti Expertní skupiny pro zkoušení způsobilosti (ESPT) Státního zdravotního ústavu (SZU). 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 rozesílána poštou.

Koordinátor:

MUDr. Klára Labská
Tel: 267 082 247(2476)

Zprávu vypracoval:

MUDr. Klára Labská, NRL pro herpetické viry, SZÚ Praha

Zprávu schválil: Mgr. Markéta Pumánová

Dne: 1. 4. 2020

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/6/2020

Identifikace kola/cyklu:	PT#M/6/2020 EHK-1114
Název:	Sérologie Epstein - Barrové viru
Organizátor:	SZÚ – Centrum laboratorních činností - ESPT Šrobárova 48, Praha 10, 100 42 tel.: + 420 267082575, fax.: + 420 267082271
Vedoucí ESPT	Ing. Věra Vrbíková
Koordinátor:	Dr. Labská
Subdodavatel:	Není
Charakteristika materiálu:	Lidské sérum/plazma
Podstata a účel PT/EHK:	průkaz protilátek třídy IgG a IgM proti různým antigenům viru Epstein - Barrové a souhrnná interpretace provedených testů
Kritéria pro účast na PT/EHK:	Vyšetření obou vzorků imunoanalytickými metodami, minimálně 1x IgM a 1xIgG u každého vzorku, ale doporučeny jsou alespoň 3 markery a odeslání výsledků ve stanoveném termínu
Způsob přípravy:	Výchozím materiálem je lidské sérum/plazma.
Množství připravovaného test. Materiálu:	130 sad (1 sada á 2 vzorky po 0,3 ml)
Označení vzorkovnic:	EHK-1114, PT#M/6, č. 1 – 2, 25. 2. 2020
Zabezpečení kvality vzorku:	<ol style="list-style-type: none"> 1. Obsahuje-li výchozí materiál po rozmrazení viditelné částice organického materiálu (bílkoviny, tuky), je zcentrifugován. 2. Pro zajištění stability je do výchozího materiálu přidáván po rozmražení ProClin ve výsledné koncentraci 0.0095% ve vzorku
Termín testu homogenity a stability:	<ol style="list-style-type: none"> 1. Výchozí materiál je testován na vhodné cílové markery 2. Finální vzorek je testován na všechny cílové markery před a po rozplnění
Podmínky distribuce a uchování vzorků:	Distribuce v předepsaném obalu. Přeprava a krátkodobé uchování vzorků v chladničce při teplotě 2-8°C, dlouhodobé uchování při -18 až -24°C, chránit před světlem, zamezit opakovanému rozmrazování
Možné zdroje chyb:	nedodržení správné laboratorní praxe, lidský faktor
Počet účastníků:	119
Termín distribuce:	25.2.2020
Způsob distribuce:	Přepravní službou v termínu určeném AP CEM (zajišťuje AP CEM)
Předání výsledků:	V elektronické podobě za použití programu EHK Lab
Způsob vyhodnocení výsledků:	<ul style="list-style-type: none"> • Shodný výsledek markerů anti EBNA 1 IgG, anti VCA IgG a anti VCA IgM je hodnocen +2 body/vzorek, částečná neshoda (malá chyba) +1 bod. • Ostatní markery při shodě +1 bod • Správná interpretace výsledku + 4 body (celkem 8 za sérii). Hranice úspěšnosti 80%.
Určení maximální směrodatné odchylky:	Neprovádí se
Určení přijaté vztažné hodnoty:	Výsledky získané v NRL
Termín uveřejnění závěrečné zprávy	Do 12 týdnů po předání výsledků k hodnocení

2. Příprava vzorků

Výchozím materiálem pro přípravu vzorků byla lidská séra a defibrinovaná plazma, které byly vyšetřeny na přítomnost cílových markerů. Vzorek A byl poolovaný a vzorek B byla plazma jediného dárce.

Pro zajištění stability byl do výchozího materiálu přidán po rozmražení ProClin v koncentraci 0.0095%.

Finální (rozplněné) vzorky byly testovány na přítomnost cílových markerů metodami EIA a NIF dle SOP-NRL/HV-01 a -03.

3. Charakteristika vzorků

Série 1114 obsahovala 2 vzorky (á 0,3 ml) k vyšetření sérologických markerů EBV infekce. Výběr konkrétních markerů nebyl stanoven. Požadováno bylo minimálně 1x IgM a 1x IgG, ale jsou doporučeny alespoň 3 markery, protože tři výsledky představují minimum nutné pro interpretaci stádií EBV infekce a stavů organismu s nimi spojených. Suboptimální výběr sledovaných markerů může také vést k nesouhlasné interpretaci charakteru vyšetřovaného vzorku, což se může v EHK projevit sníženým hodnocením. Obvykle jsou používány metody immunoassay a/nebo NIF, informaci navíc může poskytnout také immunoblot.

První vzorek (A) byl připraven z poolu sér selektovaných na základě anti VCA IgM positivity a anti EBNA1 IgG negativity. Ostatní markery byly testovány až po poolování sér. Následným testováním v NRL pro herpetické viry byly stanoveny tyto hodnoty: EBNA1 IgG negativní, VCA IgG pozitivní, VCA IgG avidita – šedá zóna, VCA IgM pozitivní, VCA IgA pozitivní, EA IgG pozitivní (typ imunofluorescence D), EA IgM pozitivní, EBNA IgM pozitivní.

Jako druhý vzorek (B) byla použita defibrinovaná plazma séronegativního zdravého dárce. Vzorky byly kódovány, vaše individuální kódování je uvedeno na výsledkovém protokolu.

Tabulka 1: Správné výsledky:

	A	B
EBNA IgG	negativní	negativní
EBNA IgM	pozitivní	negativní
VCA IgG	pozitivní	negativní
VCA avidita	*šedá zóna	negativní
VCA IgM	pozitivní	negativní
VCA IgA	pozitivní	negativní
EA IgG	pozitivní	negativní
EA IgM	pozitivní	negativní

*nehodnoceno

4. Způsob hodnocení

Metody na bázi immunoassay (EIA, CLIA, NIF a další)

Výsledky zúčastněných laboratoří se porovnávají s výsledky získanými v NRL pro herpetické viry a přihlíží se i k výsledkům ostatních účastníků jako celku. Každý otestovaný marker má hodnotu POZITIVNÍ nebo NEGATIVNÍ, přípustná je také hodnota HRANIČNÍ.

Hodnocení je založeno na ohodnocení každého shodného výsledku sledovaných markerů anti- EBNA IgG, anti-VCA IgG a anti-VCA IgM v každém vzorku přidělením dvou bodů. V případě částečné neshody v těchto markerech (obvykle hraniční výsledek) je přidělen jeden bod.

Ostatní markery (např. anti-EA IgG, anti-EA IgM, anti-VCA IgA, anti-EBNA-1 IgM, anti-ZEBRA IgM a IgG, anti-BZLF-1 IgM a IgG a další) jsou hodnoceny v případě shody získkem 1 bodu za 1 vzorek.

Celková interpretace vzorku je hodnocena 4 body za vzorek. Interpretace musí odpovídat dosaženým výsledkům, pokud jsou výsledky některých testů v rozporu s interpretací, laboratoř musí hodnocení zdůvodnit komentářem. Pro usnadnění komunikace jsou navrženy tyto předdefinované interpretace:

1. séronegativní,
2. stav po primoinfekci proběhlé v minulosti – anamnestické protilátky,
3. stav po primoinfekci proběhlé v minulosti – sérologické známky reaktivace,
4. stav po primoinfekci proběhlé v minulosti (pokud laboratoř nekomentuje reaktivaci)
5. primoinfekce.

Zúčastněné laboratoře mají prostor interpretaci rozšířit v rámci formuláře v poli „Komentář“.

Metody na bázi immunoblot

Zúčastněný do výsledkového formuláře vyplňuje, zda byly přítomny protilátky proti jednotlivým antigenům, ale test se hodnotí jako celek interpretací (viz předdefinované interpretace).

Hranice úspěšnosti se stanovuje v procentech dosažených bodů/maximální bodový zisk při zvolené kombinaci testů. Hranici úspěšnosti pro jednotlivé kolo dané série nelze stanovit předem, neboť záleží na míře shody hodnocené laboratoře s NRL a zároveň na míře shody mezi zúčastněnými laboratořemi dohromady. Proto není ani stanoveno rozmezí, ve kterém je laboratoř úspěšná. Pokud se však výsledky liší od výsledků většiny laboratoř i výsledků stanovených koordinátorem, vyhrazuje si koordinátor právo při hodnocení úspěšnosti laboratoře rozhodnout direktivně. Koordinátor si vyhrazuje právo v případě rozporuplných výsledků určitého testu tento test vyřadit z hodnocení. Koordinátor určí direktivně limit (%), který musí laboratoř dosáhnout. Limit pro sérii 1114 byl stanoven na 80% bodů dosažitelných zvolenou kombinací metod.

5. Vyhodnocení

Vzorek A: EBV primoinfekce – poolovaný vzorek

Marker EBNA 1 IgG – negativní

Marker vyšetřilo 119 laboratoř, 109x negativní, 10x hraniční. Neshodné výsledky byly dosaženy soupravou Liaison Diasorin, Test Line EIA- EBV EBNA1 IgG a Siemens Immulite 2000 EBV-EBNA IgG viz *Tabulka 2*.

Tabulka 2 : Soupravy, které zachytily hraniční anti EBNA 1 IgG ve vzorku A EBV primoinfekce – poolovaný vzorek

výrobce	Název soupravy	Počet pozitivních záchytů/ počet stanovení	Počet hraničních záchytů/ počet stanovení	Počet negativních záchytů/ počet stanovení	poznámka
Diasorin	Liaison	0/39	4/39	35/39	různé šarže
Test Line	EIA- EBV EBNA1 IgG	0/30	5/30	25/30	hraniční výsledky stejná šarže
Siemens	Immunité 2000 EBV-EBNA IgG	0/2	1/2	1/0	

Marker VCA IgG – pozitivní, šedá zóna/vysokoavidní

Metody na bázi EIA: vyšetřilo 115 laboratoř, všichni shodně pozitivní výsledek

Metody na bázi NIF: 6x pozitivní, všichni shodný výsledek

Anti-VCA IgG avidita – vyšetřilo 9 laboratoř, rozmezí hodnot viz *Tabulka 3*.

Tabulka 3: Rozmezí hodnot avidity (%) ve vzorku A EBV primoinfekce – poolovaný vzorek dle souprav.

Výrobce	souprava	Počet stanovení	Rozmezí hodnot medián (min-max)
Euroimmun	EBV CA avidity determination	2	56%
TestLine	EIA EBV VCA IgG	3	97% (97-99)
Vidia	ELISA-VIDITEST anti - VCA EBV IgG a avidita	4	62% (57-83)

Marker VCA IgM – pozitivní

Metody na bázi EIA: 115x pozitivní, všichni shodný výsledek

Metody na bázi NIF: 5x pozitivní, všichni shodný výsledek

Marker VCA IgA – pozitivní

Marker vyšetřilo 7 laboratoří, všichni použili metody na bázi EIA, shodně pozitivní

Marker EA IgG – pozitivní

Metody na bázi EIA: 73x pozitivní, všichni shodný výsledek

Metody na bázi NIF: 4x pozitivní, 1x negativní, neshodný výsledek byl stanoven soupravou Vidia IF-Viditest EA IgG (1 ze 3 stanovení touto soupravou).

Marker EA IgM – pozitivní

Metody na bázi EIA: 18x pozitivní, všichni shodný výsledek

Marker EBNA 1 IgM – pozitivní

Marker vyšetřilo 28 laboratoří, všichni shodný pozitivní výsledek

Vzorek B: EBV séronegativní – jediný dárce

Marker EBNA 1 IgG - negativní

Všech 119 testujících laboratoří shodný negativní výsledek

Marker VCA IgG – negativní

Metody na bázi EIA 114x negativní, 1x pozitivní výsledek, neshodný výsledek získán soupravou Abbott Architect VCA IgG (1 z 20 ti stanovení touto soupravou v sérii, ostatních 19 negativní)

Metody na bázi NIF 6x pozitivní, všichni shodný výsledek

Anti-VCA IgG avidita – séronegativní vzorek, nevyšetřuje se

Marker VCA IgM – negativní

Metody na bázi EIA: 115x negativní, všichni shodný výsledek

Metody na bázi NIF 5x negativní, všichni shodný výsledek

Marker VCA IgA – negativní

Metody na bázi EIA 7x negativní, všichni shodný výsledek

Marker EA IgG – negativní

Metody na bázi EIA: 73x negativní, všichni shodný výsledek

Metody na bázi NIF: 5x negativní, všichni shodný výsledek

Marker EA IgM – negativní

Metody na bázi EIA 18x negativní, všichni shodný výsledek

Marker EBNA 1 IgM – negativní

28x negativní, všichni shodný výsledek

Výsledky metodou imunoblot (western blot)

Metodu použilo 14 laboratoří, celkové hodnocení poolovaného vzorku se lišilo, 1 laboratoř vzhledem k přítomnosti protilátek proti p18 antigenu (součást VCA) vzorek uzavřela jako stav po primoinfekci proběhlé v minulosti – sérologické známky reaktivace.. Výsledky protilátek proti jednotlivým antigenům se lišily i v rámci souprav.

Výsledky vzorku A (primoinfekce) jsou podány v *Tabulce 4*; pro přehlednost souhrnně dle použitých souprav.

Tabulka 4: Výsledky metod na bázi imunoblot vzorek A- primoinfekce

souprava	výrobce	EBNA IgM Pozitivní	VCA IgM Pozitivní	EA IgM Pozitivní	EBNA IgG Pozitivní	VCA IgG Pozitivní	EA IgG Pozitivní
Anti-EBV Westernblot	Euroimmun	**	1/1	**	**	1/1	**
EUROLINE: EBV Profile 2	Euroimmun	3/3*	4/4	2/3*	0/4	4/4	4/4
recomLine	Microgen	nt	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1
ViraStripe	Viramed	nt	1/1	0/1	0/1	1/1	1/1
BLOT-LINE EBV	TestLine	6/9	9/9	4/8*	0/9	9/9	9/9
EBV IgG & IgM LINE Immunoblot	Virotech	nt	0/1	1/1	0/1	1/1	1/1

nt - netestováno/neprovádí se u dané soupravy.

Jako pozitivní výsledek je brán záchyt protilátek proti kterékoliv části výše uvedených antigenů

**1x výsledek chybí*

*** nelze hodnotit, laboratoř uvedla pouze pozitivní výsledky*

6. Závěr

Letošní série „Sérologie EBV“ se zúčastnilo 119 laboratoří, 1 laboratoř neuspěla. Objevily se hraniční záchyty anti EBNA IgG u vzorku primoinfekce, ale všechny laboratoře správně interpretovaly vzorek jako primoinfekci. Anti EBNA1 IgG protilátky v poolovaném vzorku primoinfekce nezachytila žádná laboratoř testující imunoblotem včetně NRL.

Z hodnocení vzorku A byl vyřazen marker anti VCA IgG avidita, která byla kvůli poolování arteficiálně vysoká (vzorek byl poolován na základě anti VCA IgM positivity a anti EBNA IgG negativity, avidita byla testována až u poolu).

Opravné kolo série proběhne v podzimním termínu. O opravné vzorky můžete požádat **do 14 dnů** po obdržení výsledků. V případě reklamaci vyhodnocení série postupujte, prosím, dle reklamačního řádu.