



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/4-1/2024 (EHK 1383)

Sérologie toxoplasmózy

Praha, květen 2024

Obsah

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

Program zkoušení způsobilosti PT#M/4-1/2024 je zaměřen na sérologii toxoplasmózy. Návrh a realizace PT#M/4-1/2024 byly prováděny podle standardního operačního postupu koordinátora programu EHK 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: <http://ehk.szu.cz/EHK10/> po přihlášení kódem laboratoře a heslem.

Zprávu vypracoval:

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

Zprávu autorizoval:

RNDr. Petr Kodym, CSc.

Tel: 267 082 105

Dne: 13. 5. 202

Pracoviště 2 ESPT

<https://szu.cz/sluzby/zkouseni-zpusobilosti/zkouseni-zpusobilosti-pro-lekarskou-mikrobiologii/>

e-mail: ehk@szu.cz

1. Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT# M/4-2/2024

Identifikace cyklu:	EHK 1383
Název PT:	Sérologie toxoplasmózy
Koordinátor:	RNDr. Petr Kodym, CSc.
Podstata a účel PT:	Kvalitativní a semikvantitativní stanovení protilátek proti <i>Toxoplasma gondii</i> v kontrolních vzorcích.
Kritéria pro účast na PT:	Znalost a technické vybavení pro vyšetření protilátek proti <i>Toxoplasma gondii</i> . Znalost postupů, interpretace sérologických výsledků.
Charakteristika materiálu:	Viz kapitola 3 závěrečné zprávy
Hodnocené ukazatele:	Pozitivita či negativita sérologických testů.
Způsob přípravy:	Viz kapitola 2 závěrečné zprávy
Počet účastníků:	100
Termín distribuce vzorků:	30. 1. 2024
Informace účastníkům:	viz Informace pro účastníky zaslané spolu se vzorky
Termín pro odeslání výsledků účastníky (stop termín):	20. 02. 2024
Označení vzorkovnic:	EHK 1383, PT#M/4-1, č. 1-5, 30. 1. 2024
Zabezpečení jakosti vzorku včetně testu homogenity a stability:	Viz kapitola 2 závěrečné zprávy
Možné zdroje chyb:	Nedodržení správné laboratorní praxe, nesprávné vyhodnocení testů, nesprávný zápis do formuláře.
Způsob vyhodnocení výsledků:	Viz kapitola 4 závěrečné zprávy
Určení přijaté vztažné hodnoty:	Vztaženou hodnotou jsou výsledky NRL, které byly získané trojitým opakovaným testováním vzorků.
Určení maximální směrodatné odchylky:	Z hodnot bodového ohodnocení jednotlivých účastníků. Aritmetický průměr všech hodnocených laboratoří mínus dvě směrodatné odchylky. Laboratoř úspěšně absolvuje cyklus EHK, pokud dosáhne bodového limitu, který se vypočítává podle vzorce: Limit = aritmetický průměr výsledků všech hodnocených laboratoří mínus dvě směrodatné odchylky. Pokud se v hodnocené skupině vyskytne pracoviště s extrémně nízkým bodovým ziskem (je menší než 50% maximálního bodového zisku), je vyloučeno z výpočtu limitu. Takové pracoviště je automaticky hodnoceno jako neúspěšné.
Termín uveřejnění předběžných výsledků:	1. 3. 2024
Termín uveřejnění závěrečné zprávy:	14. 5. 2024

2. Způsob přípravy vzorků

2.1 Postup přípravy výchozího materiálu

Výchozím materiálem pro přípravu vzorků bylo lidské sérum nebo plasma – pacientské vzorky vyšetřené na obsah protilátek proti *Toxoplasma gondii*. Výchozí materiál byl dlouhodobě uskladněn 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 lahviček se šroubovacím uzávěrem a předán k rozeslání. Vzorky jsou až do rozeslání skladovány při teplotě 4°C .

2.2 Zabezpečení kvality výchozího materiálu, homogenita a stabilita

Zabezpečení homogenity: Homogenita je zajištěna promícháním vzorků před zahájením alikvotování do vzorkovnic. V den distribuce vzorků je testováno libovolných 5 vzorků 3x na přítomnost antitoxoplasmických protilátek.

Zabezpečení stability vzorků: Stabilita je zajištěna vhodným skladováním při teplotě $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ až do rozplnění vzorků. Kontrola stability byla prováděna testováním 5 vzorků 3x na přítomnost antitoxoplasmický protilátek v termínu odeslání výsledků účastníků.

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.

Tab. 1: Výsledky vyšetření vzorků EHK 1383 v NRL TOXO

Vzorek EHK 1383	KFR Titr	IgG IU/ml	IgA IP	IgM IP	IgE IP	AVIDITA IgG IAv
A	1:8 Positivní	7 Positivní	0,2 Negativní	0,3 Negativní	0,1 Negativní	0,6 Vysoká
B	1:64 Positivní	24 Positivní	0,3 Negativní	0,4 Negativní	0,1 Negativní	0,6 Vysoká
C	1:128 Positivní	90 Positivní	0,3 Negativní	0,35 Negativní	0,1 Negativní	0,8 Vysoká
D	1:64 Positivní	78 Positivní	0,3 Negativní	0,35 Negativní	0,2 Negativní	0,8 Vysoká
E	1:1 0254 Positivní	427 Positivní	1,7 Positivní	2,1 Positivní	1 Hraniční	0,6 Vysoká

Vzorky byly rozeslány s tímto komentářem: Vzorky pocházejí od těhotných žen (9.-25. týden) ve věku 19-38 let, obyvatelek obce, ze které bylo v posledních 3 letech hlášeno 7 případů akutní toxoplasmózy. O případném zdroji infekce není nic známo.

Ženy si stěžují na bolesti kloubů, únavu, nepravidelné horečky, migrénu a na zvětšené mízní uzliny. O vyšetření žádá místní praktická lékařka, dg. B58.9.

4. Způsob hodnocení

Nahlášené výsledky byly porovnávány s očekávanými výsledky získanými trojitým opakovaným testováním vzorků v NRL. Při porovnání s výsledky zúčastněných laboratoří se potvrdilo, že 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

Výsledky sérologických testů, které laboratoře uvádějí, jsou shrnuty v tabulkách 2, 3 a 5, jejich interpretace v tabulce 4. Správné interpretace a komentáře k jednotlivým vzorkům uvádíme v následujícím textu. „*Autentické slovní komentáře laboratoří jsou uvedeny v uvozovkách kurzívou.*“

Tab. 2: Titry KFR, které udávají zúčastněné laboratoře (celkem: 14 pracovišť), u jednotlivých vzorků EHK 1383 a (semi)kvantitativní výsledky stanovení IgG (v mezinárodních jednotkách – celkem 83 pracoviště) v okružních vzorcích.

KFR – titr	A	B	C	D	E
0	35,71%	15,38%	7,14%	7,14%	7,14%
4	28,57%				
8	28,57%	30,77%			
10		7,69%			
16	7,14%	30,77%	14,29%	7,14%	
20		7,69%		7,14%	
32		7,69%	28,57%	35,71%	
40			21,43%	14,29%	
64			14,29%	7,14%	
128			7,14%	14,29%	28,57%
160					7,14%
256				7,14%	21,43%
320					14,29%
512			7,14%		14,29%
1024					7,14%
IgG-IU/ml					
Minimum	0,8	1,42	3,08	3,1	3,39
Medián	6,75	19,3	104,5	97,2	214
Průměr	13,19	34,21	138,64	153,78	280,82
Maximum	152,67	209,95	487	1406	1739

Komentáře k jednotlivým vzorkům:

Vzorek A obsahoval velice nízké hladiny antitoxoplasmických protilátek – jak titry celkových protilátek, tak hladiny IgG vykazovaly nízké pozitivní nebo i hraniční hodnoty, testy na IgA, IgE i IgM byly veskrze negativní (viz Tab. 2 a 3): „Ve vzorku krevního séra pacientky nebyly nalezeny markery akutní infekce ve třídách IgM, IgA a IgE; byla prokázána hraniční hodnota protilátek ve třídě IgG.“ I takto nízké hodnoty odpovídají interpretaci I = „S“ a interpretaci II = „G-“, tedy „primoinfekce v graviditě nepravděpodobná, gravidita nejspíše není ohrožena toxoplasmózou...“ Výsledky testů v některých laboratořích vyvolávaly pochybnosti: „Hodnota IgG je jen hraniční. Nelze jednoznačně interpretovat jako negativní nebo jako antitoxoplasmické protilátky po prodělané toxo před delším časem. Doporučili bychom opakovat odběr za 2-3 týdny.“ Někteří účastníci EHK-1383 nemohli uvěřit, že v sérii tentokrát není ani jeden séronegativní vzorek: „I přes hraniční hodnotu IgG se přikláníme k interpretaci N, doporučili bychom odběr opakovat s odstupem, může se jednat o nespecifickou reakci.“

V testech více než ¼ zúčastněných laboratoří vyšlo IgG negativní. Jelikož rozhodující interpretace II byla tak jako tak „G-“ (viz Tab. 4), vážný průsvih v těchto případech naštěstí nenastal. Vzorek A ale byl nejproblematictější vzorkem tohoto kola EHK.

Tab. 3: Kvalitativní výsledky stanovení markerů toxoplasmové infekce ve vzorcích EHK 1383. „N“ udává počet laboratoří, které daný marker vyšetřují a výsledky do protokolu uvedly.

Marker	Výsledky	A	B	C	D	E
CELKOVÉ PROTILÁTKY N=28	Negativní	46,43%	11,11%	3,57%		
	Hraniční	14,29%	7,41%			
	Positivní	39,29%	81,48%	96,43%	100%	100%
IgG N=98	Negativní	28,57%				
	Hraniční	20,41%	1,02%			
	Positivní	51,02%	98,98%	100%	100%	100%
IgM N=98	Negativní	100%	100%	94,9%	81,63%	
	Hraniční			3,06%	11,22%	
	Positivní			2,04%	7,14%	100%
IgA N=66	Negativní	100%	100%	95,24%	93,75%	
	Hraniční			4,76%	6,25%	1,52%
	Positivní					98,48%
IgE N=40	Negativní	100%	100%	100%	100%	15%
	Hraniční					47,5%
	Positivní					37,5%

Vzorky B, C a D reprezentovaly stejnou kategorii, akorát měly vyšší titry celkových antitoxoplasmických protilátek a jim odpovídající hladiny IgG bez obsahu IgA, IgE a IgM (viz Tab. 2 a 3). Prakticky všichni účastníci EHK se shodli s NRL TOXO na interpretaci I = „S“ a na interpretaci II = „G-“. „Pravděpodobně se jedná o anamnestické protilátky, infekci proběhlou před delším časem, bez vlivu na graviditu. Nicméně vzhledem k uváděné délce gravidity, bych doporučila odeslat vzorky do NRL k dovyšetření všech tříd

protilátek, vč. KFR a opakovat vyšetření s odstupem 3 týdnů k posouzení dynamiky." „Vzhledem k faktu vysokého výskytu akutní toxoplasmózy v místě bydliště, doporučujeme monitoraci pacientky i v následujícím trimestru."

Nicméně u vzorku D a semtam i u vzorku C zachytilo několik laboratoří hraniční nebo i níže pozitivní hodnoty IgM, ba dokonce i IgA (viz Tab. 3). Záleželo, jak se laboratoře k nálezu těchto protilátek postavily. Pokud konstatovaly, že „IgM protilátky zvýšeny pravděpodobně v důsledku nespecifické reakce", bylo vše v pořádku. Někteří váhali: „hodnota IgM je velmi nízká, dle výrobce soupravy nutno dovyšetřit, možná také interpretace I: PA a interpretace II: G+“, „Vzhledem k velkému rozsahu uvedené délky těhotenství jsme raději zvolili interpretaci G+. Pokud by se jednalo o časnou fázi těhotenství, tak bychom se v interpretaci II přiklonili spíše k G-."

Jiní byli nadměrně opatrní: „S ohledem na přítomnost hraničních IgM protilátek hodnotím vzorek jako PA, vzhledem k vysoké aviditě by též mohlo být S. Druhý komentář dávám G+. U klinického vzorku by bylo vhodné dohledat pravděpodobný termín infekce vzhledem ke graviditě, pokud by bylo možné nákazu v graviditě zcela vyloučit, bylo by možné psát G-." (kéž by to bylo možné!).

Vzorek E se vyznačoval jednoznačně nejvyšším titrem celkových antitoxoplasmických protilátek jakož i hladinou IgG. Všichni zúčastnění se jednoznačně shodli na pozitivitě IgM a IgA (včetně 1 hraničního výsledku), rovněž IgE vycházelo převážně pozitivní či hraniční. Shoda převažovala i u závěru: „Suspekce na akutní či postakutní fázi onemocnění (interpretace I=„A“, případně i „PA“, interpretace II = „G+“).

Tab. 4: Interpretace I a II, které udávají zúčastněné laboratoře (N=98) u jednotlivých vzorků EHK 1383.

		A	B	C	D	E
INTERPRETACE I	N	36,08%				
	S	63,92%	100%	97,96%	88,78%	1,02%
	A			1,02%	1,02%	79,59%
	PA			1,02%	10,2%	19,39%
INTERPRETACE II	N	4,08%				
	K				1,02%	4,08%
	L	4,08%	5,1%	5,1%	4,08%	
	G+	1,02%		2,04%	7,14%	95,92%
	G-	90,82%	94,9%	92,86%	87,76%	
	O+					
	O-					

Kvalitativní výsledky stanovení avidity IgG ukazuje tabulka 5. Je zřejmé, že shoda výsledků vyšetření směsných vzorků není při použití různých testů příliš velká. Určitý trend je ale patrný: zatímco u „neakutních“ vzorků A-D převažuje vysoká avidita, u „potenciálně akutního“ vzorku E vychází nízká a hraniční avidita u více než 2/3 účastníků.

Tab. 5: Hlášená avidita IgG. Aviditu u jednotlivých vzorků stanovovalo 52 laboratoří zúčastněných v EHK 1383.

Vzorek	Avidita IgG		
	Nízká	Hraniční	Vysoká
A	16%	32%	52%
B		11,36%	88,64%
C	11,11%	33,33%	55,56%
D	10,87%	21,74%	67,39%
E	36,54%	30,77%	32,69%

Přehled používaných sérologických testů:

Z důvodu zavádění IVDR byla zrušena výroba souprav KFR firmou TestLine Clinical Diagnostics s.r.o. a vícero laboratoří hlásí, že celkové protilátky již nevyšetřují. Pokles počtu laboratoří, které stanovují **celkové antitoxoplasmické protilátky**, se zastavil na 28 (28,6%) pracovištích. Někteří si asi uvědomují, že to je chyba, a tak alespoň píší komentáře jako „Vzorky C,D,E bychom poslali k dovyšetření celkových protilátek do centra excellence“. Situaci někde vyřešili změnou výrobce KFR na VIRION/SERION. Za tímto účelem ve výsledkovém formuláři EHK 1383 již nabízíme i výrobcem požadované titry „desítkové“ řady.

Laboratoře, které stále celkové protilátky stanovují, k tomuto účelu používají nejčastěji KFR (50%), dále potom NIFR (28,6%) a latexovou aglutinaci (21,4%).

IgG stanovují všechna pracoviště, a to pomocí celkem 15 systémů: TEST-Line (23,47%), Abbott (23,47%), Diasorin - Liaison (11,22%), Diasorin (11,22%), Roche (7,14%), Euroimmun (5,1%), Diesse (4,08%), Access (4,08%), Cobas (3,06%), Biorad (3,06%) a dalších.

Testy na **IgM** používají rovněž všechna pracoviště (13 systémů): TEST-Line (23,47%), Abbott (23,47%), Liaison (22,45%), Roche (7,14%), Euroimmun (5,1%), Diesse (4,08%), Access (4,08%), Biorad a Cobas (3,06%) atd....

IgA stanovuje 66 (67,34%) pracovišť celkem 8 systémy, z nichž nejpoužívanější jsou TEST-Line (75,76%), Euroimmun (10,61%), Chorus Line (6,06%), Diesse (4,55%), a NOVATEC (1,52%).

IgE stanovuje 40 (41,66%) pracovišť.

Další testy využívají 1 nebo 2 laboratoře.

6. Závěr

PT#M/4-1/2024 (EHK 1383) Sérologie toxoplasmózy se zúčastnilo 100 laboratoří, výsledky nedodaly 2 laboratoře. Uspělo 96 laboratoří, neuspěly 2 laboratoře. Parametry úspěšnosti a výsledky ohodnocení shrnuje Tab. 6. Je z ní patrné, že drtivá většina laboratoří postupy diagnostiky toxoplasmózy u těhotných žen výborně zvládá. Díky tomu skoro polovina všech laboratoří dostala „bezchybné“ hodnocení 60 nebo 50

bodů. Diagnostickým oříškem byl pouze vzorek A s velmi nízkým obsahem antitoxoplasmických IgG; negativní hodnocení tohoto vzorku však naštěstí nezavedlo zúčastněné laboratoře na scestí nesprávné interpretace II. Jinak byla naprostá většina uváděných laboratorních výsledků - kvalitativních nebo semikvantitativních – správná, opravdu závažné chyby jako zcela neadekvátní interpretace byly naprosto ojedinělé. Jako menší chyby bylo klasifikováno použití nepřesných interpretací II, které jsou sice věcně víceméně správné, ale nevyjadřují se k otázce rizika toxoplasmové infekce pro těhotnou ženu.

Tab. 6: Frekvence bodových ohodnocení a parametry úspěšnosti laboratoří v EHK 1383

Počet bodů (MAX=60)	Laboratoří	
	Počet	%
29	1	1,02%
38	1	1,02%
NEUSPĚLO	2	2,04%
40	1	1,02%
42	4	4,08%
43	3	3,06%
44	1	1,02%
45	16	16,33%
46	4	4,08%
47	7	7,14%
48	1	1,02%
49	3	3,06%
50	34	34,69%
51	1	1,02%
53	5	5,1%
55	1	1,02%
56	1	1,02%
60	14	14,29%
USPĚLO	96	97,95 %
CELKEM	98	100 %

HRANICE ÚSPĚŠNOSTI: 39 BODŮ
PRŮMĚR: 49,6 BODU
SMĚRODATNÁ ODCHYLKA: 5,3

Laboratoře, které neuspěly, si mohou objednat edukativní vzorky prostřednictvím webové aplikace SZÚ, a to do 30 dnů po obdržení svých výsledků. Výsledky edukativních vzorků nebudou mít vliv na opravu předchozího neúspěšného výsledku v rámci EHK a slouží pouze jako podklad pro vyřešení případné neshodné práce v laboratoři.

Edukativní vzorky laboratoř obdrží obvyklou cestou v co nejkratším termínu po objednání.

V případě reklamaci vyhodnocení série, prosím, postupujte dle reklamačního řádu. Pro zadání reklamace použijte také webovou aplikaci SZÚ.

Konec závěrečné zprávy