



Státní zdravotní ústav
Expertní skupina pro zkoušení způsobilosti
Poskytovatel 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/6/2017 (č. 960)
Sérologie Epstein-Barróvé viru

Praha, květen 2017

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/6/2017 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/6/2017 byly prováděny podle standardního operačního postupu SOP M/6 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.

Nedílnou součástí závěrečné zprávy je výsledkový protokol jednotlivé laboratoře.

Koordinátor:

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

Zprávu vypracoval:

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

Zprávu schválil: Mgr. Hana Plodková

Dne: 12. 5. 2017

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/6/2017

Identifikace kola/cyklu:	PT#M/6/2017 EHK-960
Název:	Sérologie Epstein - Barrové viru
Poskytovatel:	SZÚ – Centrum epidemiologie a mikrobiologie - 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 1x IgG 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:	115 sad (1 sada á 2 vzorky po 0,3 ml) +10 sad (1 sada á 2 vzorky po 0,5 ml)
Označení vzorkovnic:	ESPT SZÚ PT # M/6/2017 EHK-960
Zabezpečení kvality vzorku:	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 azid sodný ve výsledné koncentraci 0,02% ve vzorku.
Termín testu homogenity a stability:	1. Výchozí materiál je testován na vhodné cílové markery. 2. Finální vzorek je testován na všechny cílové markery před a po rozplněním.
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:	121
Termín distribuce:	28. 2. 2017
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 v této sérii je 80% bodů dosažitelných danou kombinací metod.
Určení maximální směrodatné odchylky:	Neprovádí se
Určení přijaté vztažené hodnoty:	Výsledky získané v NRL
Termín semináře, rozeslání zprávy účastníkům:	3 měsíce po uzavěrce kola (6/2017)

2. Příprava vzorků

Výchozím materiálem pro přípravu vzorků byly lidská séra a plazma, které byly vyšetřeny na přítomnost cílových markerů. Vzorek A byl připraven ze séra jediného dárce a naředěn na cílový objem séronegativní plazmou od jiného jediného dárce. Vzorek B byl připraven ze séra jediného dárce.

Pro zajištění stability byl do výchozího materiálu přidán po rozmražení azid sodný v koncentraci 0,02%.

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

3. Charakteristika vzorků

Série 960 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 imunoblot.

První vzorek (A) byl připraven ze séra 16-letého pacienta se syndromem infekční mononukleózy, odběr byl proveden cca 14 dní od počátku příznaků. Následným testováním v NRL pro herpetické viry byly stanoveny tyto hodnoty: EBNA IgG negativní, VCA IgG pozitivní, VCA IgG avidita – nízkoavidní (9%), VCA IgM pozitivní, VCA IgA pozitivní, EA IgG pozitivní (typ imunofluorescence D), EA IgM hraniční, EBNA IgM negativní.

Jako druhý vzorek (B) bylo použito sérum 38-letého zdravého dárce s anamnestickými protilátkami proti EBV a náhodným záchytem IgM protilátek proti *Borrelia burgdorferi*, viz Tabulka 1: Správné výsledky. Vzorky byly kódovány, vaše individuální kódování je uvedeno na výsledkovém protokolu.

Tabulka 1: Správné výsledky:

	A	B
EBNA IgG	negativní	pozitivní
EBNA IgM	negativní	negativní
VCA IgG	pozitivní	pozitivní
VCA avidita	nízkoavidní	vysokoavidní
VCA IgM	pozitivní	negativní
VCA IgA	pozitivní	negativní
EA IgG	pozitivní / hraniční	negativní
EA IgM	hraniční – vyřazeno z hodnocení	negativní

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 získáním 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 laboratoří 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 960 byl stanoven na 80% bodů dosažitelných zvolenou kombinací metod.

5. Vyhodnocení

Vzorek A: EBV primoinfekce

Marker EBNA 1 IgG – negativní

Marker vyšetřilo 121 laboratoří bez neshodných výsledků.

Marker VCA IgG – pozitivní, nízkoavidní

Metody na bázi EIA: 107x pozitivní, 2x hraniční a 5x negativní.

Neshodné výsledky byly získány soupravami DIESSE CHORUS (6 použití v sérii, 1x pozitivní, 1x hraniční, 4x negativní – 4 různé šarže), BIORAD BIOPLEX (1 použití v sérii – 1x negativní) a VIDIA VIDITEST EBV VCA IgG (4 použití v sérii, 3x pozitivní, 1x hraniční).

Metody na bázi NIF: 6x pozitivní.

Anti-VCA IgG avidita – všech 11 testujících laboratoří shodně hodnotilo vzorek jako nízkoavidní.

Použité soupravy: EUROIMMUN – EBV CA avidity determination; TEST LINE – EIA VCA IgG; VIDIA – ELISA VIDITEST anti-VCA EBV IgG a avidita IgG.

Marker VCA IgM – pozitivní

Metody na bázi EIA: 110x pozitivní, 1x hraniční, 4x negativní.

Neshodné výsledky byly získány soupravami Euroimmun Anti-EBV VCA (IgM; 4 použití v sérii, 4x negativní – 3 různé šarže), TestLine – EIA EBV VCA IgM (33 použití v sérii, 1x hraniční, 32x pozitivní).

Metody na bázi NIF: 5x pozitivní, 1x negativní.

Neshodný výsledek byl získán soupravou Vidia IF Viditest anti-VCA IgM (5 použití v sérii, 1x negativní, 4x pozitivní).

Marker VCA IgA – pozitivní

Marker vyšetřily 4 laboratoře, 3x s pozitivním a 1x s hraničním výsledkem.

Použité soupravy: Test Line – EIA VCA IgA (2x pozitivní); Vidia – ELISA VIDItest anti-VCA EBV IgA (1x pozitivní, 1x hraniční).

Marker EA IgG – pozitivní/ hraniční

Metody na bázi EIA: 11x pozitivní, 31x hraniční, 37x negativní.

Soupravy vykazaly odlišnou citlivost na protilátky k tomuto antigenu, viz Tabulka 2.

Tabulka 2 : Vzorek A – anti-EA IgG metodou EIA i NIF

Výrobce	Souprava	Pozitivní	Hraniční	negativní
Euroimmun	Anti-EBV EA ELISA IgG	0/3*	0/3*	3/3*
Biorad	Bio-plex 220 EBV IgG	0/1	0/1	1/1
Virion – Sermon	EIA EA IgG	1/1	0/1	0/1
Test Line	EIA EBV EA IgG	3/23	3/23	17/23
Diesse	Chorus	1/10	0/10	9/10
Diasorin	Liaison	3/33	27/33	3/33
Vidia	Viditest EBV EA IgG	3/4	1/4	0/4
Vidia	IF- Viditest EA IgG	1/4	1/4	2/4
Vidia	IF- Viditest EA-D IgG	1/1	0/1	0/1

*číslo za lomítkem uvádí počet použití dané soupravy v sérii

Marker EA IgM – hraniční, nehodnocen

Metody na bázi EIA: 3x pozitivní, 1x hraniční, 14x negativní (+ 1x chybí výsledek).

Pro výrazné rozdíly dle použité soupravy jsou výsledky uvedeny formou tabulky (viz Tabulka 3).

Tabulka 3: Vzorek A – anti-EA IgM metody

Výrobce	Souprava	Pozitivní	Hraniční	negativní
Euroimmun	Anti-EBV EA ELISA Ig	2/2*	0/2*	0/2*
Test Line	EIA EBV EA IgM	0/6	0/6	6/6
Diesse	Chorus	0/8	0/8	8/8
Vidia	ELISA Viditest EBV EA IgM	1/2	1/2	0/2

*číslo za lomítkem uvádí počet použití dané soupravy v sérii

Marker EBNA 1 IgM – negativní

Marker vyšetřilo 24 laboratoří, neshodný výsledek měla 1 laboratoř soupravou, kterou neuvedla, a 1 laboratoř nevyplnila výsledek.

Vzorek B: EBV anamnestické protilátky

Vzorek nečinil obtíže a výsledky testů na protilátky třídy IgG (antigeny EBNA, VCA, EA) byly všechny shodné.

Vzorek obsahoval IgM protilátky proti *Borrelia burgdorferi* (pouze IgM, pozitivní metodami EIA i imunoblot), některé laboratoře zachytily IgM protilátky.

Marker VCA IgM – negativní, 1 záchyt, souprava Euroimmun Anti-EBV VCA ELISA (IgM; 4 použití v sérii, 1x pozitivní, 3x negativní – pozitivní výsledek měla jiná šarže než ostatní použité).

Marker EBNA IgM – negativní, 2x pozitivní a 2x hraniční, 22x negativní.

Odlišné výsledky byly získány soupravami Videa ELISA Viditest EBV EBNA 1 IgM (4 použití v sérii, 1x pozitivní, 1x hraniční, 2x negativní) a Test Line EIA EBV EBNA 1-IgM (19 použití v sérii, 1x hraniční, 18x negativní).

Marker EA IgM – negativní, 1x pozitivní, 19x negativní.

Odlišný výsledek byl získán soupravou Euroimmun Anti-EBV EA ELISA (IgM; 3 použití v sérii, 1x pozitivní, 2x negativní).

Výsledky metodou imunoblot (western blot)

Metodu použilo 14 laboratoří, celkové hodnocení vzorků se shodovalo. Neuspěla pouze 1 laboratoř, která přes opakované výzvy dodala výsledky jen pro 1 vzorek. Žádná z laboratoří nevyplnila část formuláře týkající se jednotlivých antigenů, a proto nebylo možné porovnat výsledky jednotlivých souprav.

6. Závěr

Letošní série „Sérologie EBV“ se zúčastnilo 121 laboratoří, z toho 76 laboratoří uspělo bez srážky bodu, 31 laboratoří se srážkou 1 bodu, 9 s vícebodovými srážkami a 5 laboratoří neuspělo. Novinkou bylo zadávání výsledků přes on-line formulář, které se s menšími komplikacemi podařilo zrealizovat. Zřejmě nebyla funkční část formuláře pro vyplňování výsledku imunoblotů dle jednotlivých antigenů, nedorazil ani jeden výsledek.

Nově byla povinnou a vysoce bodově hodnocenou součástí formuláře interpretace výsledků. V předdefinovaných interpretacích jsme se snažili zohlednit přístup jednotlivých laboratoří k hodnocení reaktivace, proto bylo možných pět interpretací. Kódování interpretací bylo součástí průvodního dopisu i nápovědy k programu v rámci elektronického formuláře. Připomínáme, že průvodní dopis k jednotlivým EHK je vždy vyvěšen na webu SZÚ v rubrice „Vyhlášení EHK“.

Letošní vzorky nebyly poolované, pouze vzorek A byl doředen. Ze závažnějších laboratorních chyb se opět objevily negativita anti-VCA IgG u vzorku primoinfekce, patrně problém souprav s nízkoavidními protilátkami. Pokud takovou soupravou vaše laboratoř používá, je důležité o tom vědět při interpretaci výsledků.

Největší neshoda panovala ohledně přítomnosti anti-EA IgG ve vzorku primoinfekce. Marker byl i přes rozporuplné výsledky ponechán v hodnocení, aby si laboratoře ověřily citlivost své metody (bodová ztráta byla minimální a neohrožuje úspěšnost laboratoří v rámci EHK). Zároveň některé laboratoře na základě absence anti-EA IgG nález špatně interpretovaly jako stav po primoinfekci proběhlé v minulosti.

Vzorek B prověřil soupravy na detekci IgM protilátek, obsahoval sérum od pacienta s IgM protilátkami proti *Borrelia burgdorferi*. Objevily se ojedinělé záchyty IgM protilátek proti VCA, EBNA 1 a EA.

Opravné kolo série proběhne v podzimním termínu. O opravné vzorky můžete zažádat **do 14 dnů** od doručení závěrečné zprávy. V případě reklamací vyhodnocení série postupujte, prosím, dle reklamačního řádu.

Děkuji všem za účast v EHK „Sérologie EBV“ v roce 2017 a těším se na další spolupráci.

S pozdravem

MUDr. Klára Labská
NRL pro herpetické viry
koordinátor série 960