



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/4-1/2021 (EHK 1176)

Sérologie toxoplasmózy

Praha, květen 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/4/2021 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 na webových stránkách SZÚ (<http://www.szu.cz/programy-zpusobilosti-pro-mikrobiologicke-laboratore>) po přihlášení kódem a heslem v záložce „Hodnocení sérií“.

Zprávu vypracoval:

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

Zprávu autorizoval:

RNDr. Petr Kodym, CSc.

Tel: 267 082 105

Dne: 13. 5. 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/4-1/2021

Identifikace kola/cyklu:	EHK 1176
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 1176, PT # M/4-1, č. 1 – 5, 2. 2. 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 (jedná se o konkrétní počet přihlášených účastníků včetně nevrácených výsledků)
Termín distribuce:	2. 2. 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:	11. 3. 2021
Termín zveřejnění závěrečné zprávy:	18. 5. 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 materiál

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 1176	KFR Titr	IgG IP	IgA IP	IgM IP	IgE IP	AVIDITA IgG IAv
A	N Negativní	0,18 Negativní	0,05 Negativní	0,10 Negativní	0,08 Negativní	-
B	N Negativní	0,50 Negativní	0,03 Negativní	0,11 Negativní	0,07 Negativní	-
C	1:1024 Positivní	3,70 Positivní	0,13 Negativní	0,45 Negativní	0,14 Negativní	Vysoká
D	1:4096 Positivní	6,11 Positivní	2,45 Positivní	2,91 Positivní	1,52 Positivní	Hraniční
E	1:1024 Positivní	5,45 Positivní	2,92 Positivní	3,17 Positivní	2,23 Positivní	Nízká

Tab. 1: Výsledky vyšetření vzorků EHK 1176 v NRL TOXO.

Vzorky byly rozeslány s tímto komentářem: Vzorky pocházejí od těhotných žen (13.-15. týden) ve věku 21-35 let, klientek gynekologické ambulance, které se svými dětmi již delší dobu pravidelně navštěvují jedno veřejné pískoviště na sídlišti na okraji města. Od té doby, co se rozšířila fáma, že se do tohoto prostoru stahují toulavé kočky, z nichž mnohé jsou nemocné a šíří různé infekce včetně toxoplasmózy, si stěžují na bolesti kloubů, únavu, nepravidelné horečky, migrénu a na zvětšené mízní uzliny. O vyšetření žádá gynekolog, dg. Z34.9.

4. Způsob hodnocení

Vzorky byly rozeslány celkem 102 laboratořím, výsledkové formuláře vyplnilo 101 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

	Laboratoří	
	Počet	%
27	1	0,99%
34	1	0,99%
35	1	0,99%
37	1	0,99%
38	1	0,99%
NEUSPĚLO	5	4,95%
39	1	0,99%
40	1	0,99%
44	2	1,98%
45	1	0,99%
46	2	1,98%
47	2	1,98%
48	1	0,99%
49	5	4,95%
50	34	33,66%
54	1	0,99%
56	1	0,99%
57	2	1,98%
58	4	3,96%
59	1	0,99%
60	38	37,62 %
USPĚLO	96	95,04 %
CELKEM	101	100 %

Tab. 2: Frekvence bodových ohodnocení laboratoří, které se zúčastnily EHK 1176

HRANICE ÚSPĚŠNOSTI: 38,8 BODU
PRŮMĚR: 53 BODY
SMĚRODATNÁ ODCHYLKA: 7,1

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 laboratoří jsou uvedeny v uvozovkách kurzívou.*”

Komentáře k jednotlivým vzorkům:

Vzorky A a B neobsahovaly antitoxoplasmické protilátky (viz Tab. 3 a 4), interpretace I = „N“. Výsledky sérologických testů nesvědčí pro toxoplasmovou infekci, těhotenství tudíž není toxoplasmózou ohroženo, interpretace II = G- (viz Tab. 5). V tomto duchu se nesly i slovní komentáře laboratoří: „*Serologicky negativní, vzhledem ke graviditě doporučeno opakovat vyšetření ve 2. a 3. trimestru.*”

„... interpretace II. možná zároveň N (negativní, momentálně neinfikována T. gondii, při přetrvávajícím podezření na akutní toxoplasmózu, je možno zopakovat vyšetření za 2-3 týdny.“ „U negativních vzoriek A a B doporučujeme kontrolný odber v 3. trimestri.“ „Neimunní stav, žena není toxoplasmózou infikována, není chráněna před případnou infekcí. Doporučuji preventivně poučit o cestách přenosu toxoplasmózy a ochraně před nákazou.“ „Negativní ženy doporučujeme dále sledovat (odběr v každém trimestru).“

U **vzorku C** vycházely střední titry celkových antitoxoplasmických protilátek a hladiny IgG, testy na IgA, IgE i IgM byly negativní (viz Tab. 3 a 4), interpretace I = „S“. Nejedná se o primoinfekci v graviditě, těhotenství není toxoplasmózou ohroženo - interpretace II = G- (viz Tab. 5). Samozřejmě že „u C je interpretace II. možná zároveň L (latentní toxoplasmóza, klinické příznaky nejspíše s toxoplasmózou nesouvisí)“, ale „vzhledem k diagnóze G-“ – názor, zdali je těhotenství toxoplasmózou ohroženo nebo ne, je to hlavní, co zadavatel od vyšetření očekává. Ve slovní podobě například takto: ... „latentní nákaza, anamnestické titry protilátek po prožití infekci. Těhotenství není ohroženo. Žena je chráněna díky specifické imunitě“. Pokud se ojediněle objevila pozitivita IgM, laboratoř si poradila takto: „Toxoplasma

gondii - anamnestický titr protilátek, IgM protilátky zvýšeny pravděpodobně v důsledku nespecifické reakce."

Tab. 3: Titry KFR, které udávají zúčastněné laboratoře (celkem: 36 pracovišť), u jednotlivých vzorků EHK 1176 a kvalitativní výsledky stanovení IgG (v mezinárodních jednotkách – celkem 85 pracovišť) v okružních vzorcích.

KFR - titr	A	B	C	D	E
0	97,14%	97,14%			
1:2	2,86%	2,86%			
1:8			2,78%		
1:16			19,44%		
1:32			61,11%		
1:64			13,89%	2,78%	2,78%
1:128					2,78%
1:256			2,78%	25%	33,33%
1:512				52,78%	44,44%
1:1024				13,89%	16,67%
1:2048				5,56%	
IgG-IU/ml					
Minimum	0	0	0,24	0,24	5,3
Medián	0,67	1,65	58,1	400	371
Průměr	3,71	13,8	1112,59	6527,28	6214,74
Maximum	181	954	87702	468552	458675

Vzorky D a E s vysokými titry celkových antitoxoplasmických protilátek a s jednoznačně pozitivními hladinami IgM a IgA a s pozitivními hodnotami IgE odpovídají akutní toxoplasmóze, (interpretace I=„A“). Primoinfekci v graviditě s rizikem toxoplasmové infekce plodu nelze v obou případech vyloučit (interpretace II = „G+“). Tyto interpretace převažovaly i ve slovní podobě: „Primoinfekce v graviditě s rizikem infekce plodu je možná.“ „Suspekce na akutní fázi v těhotenství, vzorek bychom zaslali na potvrzení do NRL. Doporučili bychom další vyšetření např. PCR a následný odběr za cca tři týdny ke sledování dynamiky tvorby protilátkové odpovědi, vše ve spolupráci s infektologem.“ „Interpretujeme jako akutní toxoplasmózu s rizikem infekce plodu G+.“ Samozřejmě, výsledky nejsou zcela jednoznačné: „V případě znalosti hodnot avidity-pokud by byla vysoká, mohli bychom interpretovat jako PA a G-.“ „IgG >400 IU/ml. Vzhledem k vysokým hladinám IgG protilátek se může jednat i o postakutní fázi infekce „Vzorky D a E mohou podle hladiny celkových protilátek a výsledků avidity odpovídat buď akutní nebo postakutní fázi toxoplasmózy s přetrváváním IgM, IgA a IgE.“ „Vzhledem k vysoké aviditě IgG se s největší pravděpodobností jedná o toxoplasmózu starší 4 měsíců, lze tedy předpokládat počátek infekce ještě před otěhotněním.“ Přesto je správné primoinfekci v graviditě nevyloučit a alespoň do výsledků dalších vyšetření počítat s tou horší variantou: „Interpretace u vzorků D a E může být i PA - aviditu IgG ale u kontrolních vzorků neprovádíme, interpretace II by se tím v zásadě nezměnila.“ „Vzorky D a E i přes hraniční aviditu interpretujeme jako A, G+ z důvodu vysokých hodnot IgE, IgA i IgM.“

Tab. 4: Kvalitativní výsledky stanovení markerů toxoplasmové infekce ve vzorcích EHK 1176. „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 %	2,04%		2,04%
	Hraniční					
	Positivní			97,96 %	100 %	97,96 %
IgG N=101	Negativní	100%	95,05%	0,99%	0,99%	0,99%
	Hraniční		0,99%			
	Positivní		3,96%	99,01%	99,01%	99,01%
IgM N=101	Negativní	100 %	100 %	99,01 %	2,97%	0,99%
	Hraniční			0,99%		0,99%
	Positivní				97,03%	98,02%
IgA N=71	Negativní	100%	100 %	95,65%	1,41%	1,41%
	Hraniční			2,9%	1,41%	2,82%
	Positivní			1,45%	97,18%	95,77 %
IgE N=40	Negativní	100 %	100 %	100%	2,5%	2,5%
	Hraniční					
	Positivní				97,5%	97,5%

Tab. 5: Interpretace I a II, které udávají zúčastněné laboratoře (N=101) u jednotlivých vzorků EHK 1176.

		A	B	C	D	E
INTERPRETACE I	N	100%	96,04%	0,99%	0,99%	0,99%
	S		3,96%	96,04%	0,99%	
	A				82,18%	87,13%
	PA			2,97%	15,84%	11,88%
INTERPRETACE II	N	28,71%	26,73%			0,99%
	K				3,96%	4,95%
	L		0,99%	9,9%	0,99%	
	G+	0,99%	1,98%	1,98%	91,09%	91,09%
	G-	70,3%	70,3%	88,12%	3,96%	2,97%
	O+					
	O-					

Tabulka 6 ukazuje kvalitativní výsledky **stanovení avidity IgG** „mimo soutěž“ ve 41 laboratořích (ne každá z nich stanovovala aviditu u všech vzorků). Je z ní vidět, že zatímco u jednoznačně „neakutního“ vzorku C panuje rámcová shoda na vysoké aviditě, u vzorku D jsou výsledky rovnoměrně rozděleny mezi všechny tři alternativy a u vzorku E nadpoloviční většina laboratoří hlásí nízkou aviditu. Tyto výsledky vyšetření směsných vzorků mají určitou výpovědní hodnotu, ale především u vzorků, kde je i tak jasné, že akutní toxoplasmózu nerepresentují.

Ačkoliv se to zdá nemožné, ojedinělé laboratoře stále stanovují aviditu antitoxoplasmických protilátek třídy IgG u (negativních) vzorků, které antitoxoplasmické IgG neobsahují.

Tab. 6: Výsledná avidita IgG. Aviditu u jednotlivých vzorků stanovovalo 1-41 laboratoří zúčastněných v EHK 1176. V NRL TOXO vyšla avidita vzorku C vysoká, u D hraniční a u vzorku E nízká.

Vzorek	Avidita IgG		
	Nízká	Hraniční	Vysoká
A	100%	0%	0%
B	50%	0%	50%
C	0%	6,06%	93,94%
D	34,15%	34,15%	31,71%
E	60%	17,50%	22,50%

Ani tentokrát nemůže chybět **aktuální přehled používaných metod:**

V tomto kole 48 (47,52%) 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 (28,71%), Diasorin - Liaison (23,76%), Abbott (20,79%), Diesse (4,95%), Access a Roche (3,96%), Biorad a Novatec (2,97%) a dalších.

Testy na **IgM** používají rovněž všechna pracoviště (14 systémů): TEST-Line (28,71%), Liaison (22,77%), Abbott (20,79%), Diesse (5,94%), Access a Roche (3,96%), Biorad a Novatec (2,97%) atd....

IgA stanovuje 71 (70,29%) pracovišť celkem 7 systémy, z nichž nejpoužívanější jsou TEST-Line (71,83%), Diesse (8,45%), Euroimmun a Chorus Line (5,63%) a NOVATEC (4,23%) atd....

IgE stanovuje 40 (39,6 %) pracovišť.

Další testy využívají 1 nebo 2 laboratoře.

6. Závěr

Účastníci EHK 1176 potvrdili, že vyšetřování těhotných žen na toxoplazmózu jim nečiní potíže a v převážné většině získali vysoké bodové ohodnocení. Skutečně vážných chyb bylo opravdu málo, kvalitativní nebo semikvantitativní výsledky jednotlivých sérologických testů zpravidla nejsou problémem. Rovněž interpretace byly převážně správné. Při rozlišování mezi „A“ a „PA“ je třeba mít na paměti, že zatímco při akutní toxoplazmóze v těhotenství může dojít k ohrožení plodu, při postakutní je již nebezpečná fáze překonána. Interpretaci I by měla odpovídat i interpretace II – k „A“ patří „G+“, avšak „PA“ se pojí s „G-“. Při volbě interpretací II je třeba myslet na to, že je vyšetřována těhotná žena a pro lepší výpovědní hodnotu pokud možno upřednostňovat „G+“/„G-“.

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

KONEC ZÁVĚREČNÉ ZPRÁVY