

Závěrečná zpráva Zkoušení způsobilosti pro oblast kvantitativního vyšetření buněčného chimerizmu pro rok 2023

Varianty:

1. **Základní** – obsahuje vzorek DNA příjemce, dárce a 5 kvantifikačních vzorků
2. **Rozšířená** – obsahuje vzorek DNA příjemce, dárce a 10 kvantifikačních vzorků

Materiál:

DNA izolované z buffycoatů dle přílohy č. 01 SOP 01

příjemce – X235

dárce – X252

Řádné kolo:

- 1_2023 – X235/X252 na očekávaných 22 % genotypu příjemce
- 2_2023 – X235/X252 na očekávaných 73 % genotypu příjemce
- 3_2023 – X235/X252 na očekávaných 7 % genotypu příjemce
- 4_2023 – X235/X252 na očekávaných 0 % genotypu příjemce
- 5_2023 – X235/X252 na očekávaných 33 % genotypu příjemce
- 6_2023 – X235/X252 na očekávaných 85 % genotypu příjemce
- 7_2023 – X235/X252 na očekávaných 14 % genotypu příjemce
- 8_2023 – X235/X252 na očekávaných 0.6 % genotypu příjemce
- 9_2023 – X235/X252 na očekávaných 10 % genotypu příjemce
- 10_2023 – X235/X252 na očekávaných 42 % genotypu příjemce

Doplňkové kolo nebylo v roce 2023 organizováno.

Problematikou řádného kola bylo:

1. Vyšetření informativity (určení referenčních alel) na základě vyšetření vzorků DNA příjemce a dárce – 2 vzorky – **nepovinná část**
2. Kvantitativní vyšetření chimerizmu stejného pacienta - 5 vzorků základní varianta (10 vzorků rozšířená varianta) na základě vybraného (ných) DNA polymorfizmu (ů), resp. i sex specifických lokusů včetně interpretace (poměr příjemce/dárce) – **povinná část**

Zúčastněné laboratoře – řádné kolo:

Tuzemští účastníci:

Ústav klinické biochemie a diagnostiky LF UK a FN Hradec Králové

Laboratoř molekulární genetiky, Hematologicko-onkologické oddělení FN Plzeň

Laboratoř molekulární biologie, HOK FN Olomouc

Centrum molekulární biologie a genetiky, IHOK, FN Brno

Oddělení lékařské genetiky, ÚKMPLG, FN Ostrava

Zahraniční účastníci:

Medirex a.s., odd. GENETIKA, Bratislava, Slovenská republika

NZOZ Medigen Diagnostyka Molekularna, Warszawa, Polsko

Pracownia Biologii Molekularnej Zakładu Diagnostyki Hematoonkologicznej Dolnośląskiego Centrum Onkologii, Pulmonologii i Hematologii, Wrocław, Polsko

Laboratory of Hematology and Oncology Diagnostics, Department of Clinical Immunology, University Children's Hospital of Cracow, Cracow, Polsko

Laboratory of Immunogenetics, Department of Hematology, Transplantation and Internal Medicine University Clinical Center of the Medical University of Warsaw, Warsaw, Polsko

Laboratory of Molecular Genetics, Central Hospital of Southern Pest, National Institute of Hematology and Infectious Diseases, Budapest, Maďarsko

Bone Marrow Transplant Unit Laboratory, Aghia Sophia Children's Hospital, Athens, Řecko

Tissue Typing Laboratory, Gayrettepe Florence Nightingale Hospital, Istanbul, Turecko

SBT laboratory, İstanbul Tıp Fakültesi Temel Bilimler Binası, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doku tipleme laboratuvarı, İstanbul, Turecko

Department for Blood Group Serology & Transfusions Medicine, Medical University Vienna, General Hospital Vienna, Vienna, Rakousko

Celkově se účastnilo 15 laboratoří (označení účastníků A až O) – 5 v základní variantě, 10 ve variantě rozšířené + organizátor.

Výsledky:

Nepovinné části, vyšetření informativity, se zúčastnilo celkem 8 laboratoří.

Výsledky byly statisticky v řádném kole vyhodnoceny pomocí mediánu získaných hodnot a směrodatné odchylky.

Směrodatná odchylka byla určena na základě statistického zpracování výsledků z předchozích let EPT (rozptyl hodnot, regrese) a přepočítána na hodnotu Z-score (čím je hodnota blíže nule,

tím je výsledek správnější). Přehled je uveden v *Tabulce 1. Porovnání všech účastníků pro EPT 2023.*

Hodnocení na kategorie:

- **výborné** ($[z] \leq 1$)
 - **dobré** ($1 < [z] \leq 2$)
 - **akceptovatelné** ($2 < [z] \leq 3$)
 - **pod detekční limit laboratoře**
 - **kritické** ($[z] > 3$) - nesprávný výsledek
- } správný výsledek
- (Citlivost používané metody účastníka není schopna zachytit minoritní genotyp – příklad: očekávané procento minoritního genotypu je 0,2 % a účastník s citlivostí 1 % detekuje pouze majoritní genotyp – tento výsledek je považován za správně určený. Ale v případě, že účastník detekuje oba genotypy a kvantifikuje ho, je výsledek hodnocen dle Z-skóre.)

Pro splnění účasti EPT byla nutná minimálně 80% úspěšnost (tzn. 8/10 vzorků v rozšířené variantě, 4/5 vzorků v základní variantě).

V řádném kole bylo **81 % výsledků v kategorii Výborné, 10 % v kategorii Dobré, 4 % v kategorii Akceptovatelné, 2 % v kategorii Kritické a 3 % v kategorii Pod detekční limit laboratoře.**

Všichni účastníci splnili podmínky úspěšné účasti (dosažení 80% úspěšnosti), jeden dosáhl 90 %, jeden dosáhl 80 % a ostatní dosáhli 100 %.

Výsledky jednotlivých účastníků byly také hodnoceny podle percentilů. Graf znázorňující percentily (25%, 50%, 75% a 100%) ukazuje úspěšnost všech účastníků navzájem. Vzhledem k nabídce 2 variant (základní a rozšířená) účastník základní varianty obdržel 1 a rozšířené varianty 2 grafy. První graf porovnává 5 kvantifikačních vzorků (1_2023 až 5_2023) všech účastníků letošního kola, druhý graf pak všech 10 vzorků (1_2023 až 10_2023), ale pouze u laboratoří účastnících se rozšířené varianty.

Čím má účastník nižší percentil, tím je v porovnání s ostatními laboratořemi úspěšnější. Výsledky jsou uvedeny v *Grafu 1. EPT 2023 - základní varianta* a v *Grafu 2. EPT 2023 rozšířená varianta*.

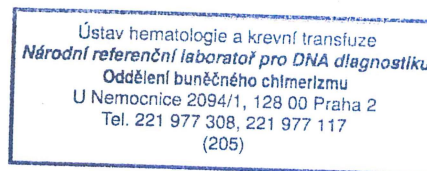
Přehled použitých metod pro kvantitativní vyšetření buněčného chimerizmu a jejich citlivosti a interpretace jsou uvedené v *Tabulce 2*, přehled používaných kitů v *Tabulce 3*.

Nejčastější chyby, eventuelně doporučení:

- Falešná negativita – použití méně citlivých polymorfizmů pro kvantifikaci.
- Falešná pozitivita – detekován smíšený chimerizmus ve vzorku, kde byla přítomná pouze DNA příjemce nebo DNA dárce.
- Nevhodný výběr polymorfizmu pro kvantifikaci (o repetici kratší – tzv. stutter peak).

Zpracovala: Mgr. Hana Čechová
Mgr. Lucie Stefflová

V Praze dne 30.11.2023



Tabulka 1. Porovnání všech účastníků pro EPT 2023

očekávané výsledky	1_2023 (22%)	2_2023 (73%)	3_2023 (7%)	4_2023 (0%)	5_2023 (33%)	6_2023 (85%)	7_2023 (14%)	8_2023(0,6%)	9_2023 (10%)	10_2023 (42%)
organizátor	20,561	78,147	7,043	0,001	31,093	88,523	14,029	0,618	10,077	39,092
laborať A	24,000	78,000	8,000	0,000	37,000					
laborať B	25,000	75,000	8,000	0,000	34,000					
laborať C	22,000	73,900	6,500	0,000	34,100	85,500	15,200	0,000	9,500	42,600
laborať D	22,100	68,800	6,900	0,000	31,800					
laborať E	21,500	80,100	8,500	0,000	32,200	91,200	17,500	0,700	6,300	38,100
laborať F	8,000	58,000	2,000	0,000	25,000	64,000	12,000	0,000	5,000	35,000
laborať G	24,000	75,000	8,000	0,000	36,000	88,000	14,000	0,700	11,000	45,000
laborať H	24,200	86,600	6,900	0,000	44,000					
laborať I	27,000	75,000	12,000	0,000	38,000	86,000	19,000	0,000	14,000	47,000
laborať J	29,000	72,000	15,000	0,000	42,000	84,000	22,000	0,000	18,000	45,000
laborať K	29,000	77,000	13,000	0,000	40,000	85,000	21,000	1,000	13,000	48,000
laborať L	26,000	76,000	9,000	0,000	36,500	87,000	17,500	1,000	13,000	47,000
laborať M	27,300	75,600	11,300	4,400	39,300	85,800	19,300	4,200	16,300	46,800
laborať N	18,530	78,300	5,810	0,000	25,420	87,190	11,040	0,480	9,670	35,750
laborať O	25,000	74,000	9,000	0,000	36,000					
průměr	23,324	75,090	8,560	0,275	35,151	84,747	16,597	0,791	11,622	42,667
medián	24,10	75,30	8,00	0,00	36,00	86,00	17,50	0,62	11,00	45,00
směrodatná odchylka**	5,55	7,08	2,36	0,45	7,10	5,36	4,01	0,63	3,10	7,86

Z score ***	1_2023 (22%)	2_2023 (73%)	3_2023 (7%)	4_2023 (0%)	5_2023 (33%)	6_2023 (85%)	7_2023 (14%)	8_2023(0,6%)	9_2023 (10%)	10_2023 (42%)
organizátor	-0,64	0,40	-0,40	0,00	-0,69	0,47	-0,87	0,00	-0,30	-0,75
laborať A	-0,02	0,38	0,00	0,00	0,14					
laborať B	0,16	-0,04	0,00	0,00	-0,28					
laborať C	-0,38	-0,20	-0,63	0,00	-0,27	-0,09	-0,57	-0,99	-0,48	-0,31
laborať D	-0,36	-0,92	-0,47	0,00	-0,59					
laborať E	-0,47	0,68	0,21	0,00	-0,54	0,97	0,00	0,13	-0,87	-0,88
laborať F	-2,90	-2,44	-2,54	0,00	-1,55	-4,11	-1,37	-0,99	-1,93	-1,27
laborať G	-0,02	-0,04	0,00	0,00	0,00	0,37	-0,87	0,13	0,00	0,00
laborať H	0,02	1,60	-0,47	0,00	1,13					
laborať I	0,52	-0,04	1,69	0,00	0,28	0,00	0,37	-0,99	0,97	0,25
laborať J	0,88	-0,47	2,96	0,00	0,85	-0,37	1,12	-0,99	2,26	0,00
laborať K	0,88	0,24	2,11	0,00	0,56	-0,19	0,87	0,61	0,64	0,38
laborať L	0,34	0,10	0,42	0,00	0,07	0,19	0,00	0,61	0,64	0,25
laborať M	0,58	0,04	1,40	9,73	0,47	-0,04	0,45	5,72	1,71	0,23
laborať N	-1,00	0,42	-0,93	0,00	-1,49	0,22	-1,61	-0,22	-0,43	-1,18
laborať O	0,16	-0,18	0,42	0,00	0,00					

$ z \leq 1$ (výborné)
$1 < z \leq 2$ (dobré)
$2 < z \leq 3$ (akceptovatelné)
pod detekční limit laboratoře
$ z > 3$ (kritické)

* Očekávané hodnoty jsou uváděné jako % genotypu příjemce.

** Směrodatná odchylka byla určena na základě statistického zpracování výsledků z předchozích let EPT (rozptyl hodnot, regrese).

*** Směrodatná odchylka přepočítána na hodnotu Z score (čím je hodnota blíže nule, tím je výsledek správnější).

Tabulka 2. Přehled použitých metod všech účastníků - kvantitativní vyšetření buněčného chimerizmu 2023

	organizátor	laboratoř A	laboratoř B	laboratoř C
polymorfizmus	STR, indel	STR	VNTR	STR
metoda	PCR + FA a qPCR	PCR + FA	PCR + FA	STR-PCR + FA
komerční kit	pro FA ano, pro qPCR jen pro polymorfizmy HLD markery	ano	ne	ne
citlivost	FA 1%; qPCR 0,035%	1%	1%	1%
interpretace %	genotypu příjemce	genotypu dárce	genotypu dárce	genotypu dárce
polymorfizmus	laboratoř D SNP, indel	laboratoř E indel	laboratoř F VNTR	laboratoř G STR, indel
metoda	FA - screening, qPCR - kvantifikace	qPCR	PCR a gelová elektroforéza	FA, ddPCR
komerční kit	ano	ano	ne	pro FA ano, pro ddPCR ne
citlivost	0,05%	0,1%	1%	1% STR; 0,05% indel
interpretace %	genotypu příjemce	genotypu dárce i genotypu příjemce	genotypu dárce i genotypu příjemce	genotypu příjemce
polymorfizmus	laboratoř H STR, indel	laboratoř I STR	laboratoř J STR	laboratoř K STR
metoda	FA a qPCR	FA	FA	FA
komerční kit	ano	ano	ano	ano
citlivost	0,013% - 0,2% dle markeru qPCR; 1% STR	5%	5%	1%
interpretace %	genotypu dárce	genotypu dárce i genotypu příjemce	genotypu dárce i genotypu příjemce	genotypu dárce i genotypu příjemce
polymorfizmus	laboratoř L STR	laboratoř M STR	laboratoř N SNP a indel	laboratoř O STR, indel
metoda	FA	FA	qPCR	FA a qPCR
komerční kit	NA	ano	ano	pro FA ano, pro qPCR ne
citlivost	0,5%	1%	0,066%	FA 1%, qPCR 0,1%
interpretace %	genotypu příjemce	genotypu dárce	genotypu dárce	genotypu příjemce

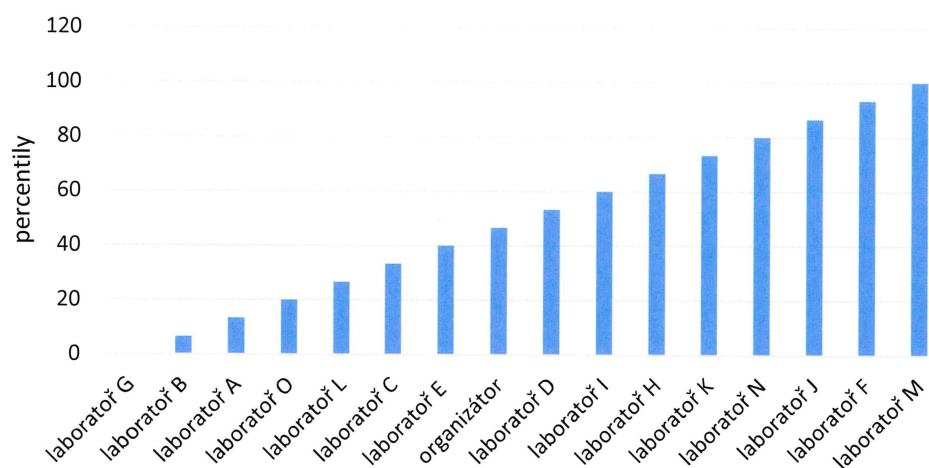
Vysvětlivky:

STR = short tandem repeat
 SNP = single nucleotide polymorphism
 indel = short insertion and deletion
 VNTR = variable number of tandem repeat
 FA = fragmentační analýza na genetickém analyzátoru
 qPCR = kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase
 NA = není k dispozici
 HLD = Human Locus DIP (deletion insertion polymorphisms)
 ddPCR = droplet digital PCR

Tabulka 3. Přehled používaných kitů 2023

STR. ev. VNTR (FA) analýza	počet účastníků
AmpFLSTR™ Identifiler™ PCR Amplification Kit (Applied Biosystems)	4
GenomeLab Human STR Primer Ser (Beckman-Coulter)	1
Mentype Chimera CE-IVD (Biotype)	2
Investigator ID Plex Plus Kit (Qiagen)	1
PowerPlex multiplex kits - ESII7FAST, CS7 (Promega)	1
PowerPlex multiplex kits - PP16HS (Promega)	2
PowerPlex monoplex kits (Promega)	1
home-made	3
neuvedeno	1
indel (qPCR nebo ddPCR) analýza	počet účastníků
Mentype DIPscreen (Biotype)	3
Mentype DIPquant (Biotype)	3
HLA-KMR Assay (GenDX)	2
home-made	3

Graf 1. EPT 2023 - základní varianta



Graf 2. EPT 2023 - rozšířená varianta

