

Závěrečná zpráva Zkoušení způsobilosti pro oblast kvantitativního vyšetření buněčného chimerizmu pro rok 2024

Varianty:

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

Materiál:

DNA izolované z buffy coatů dle přílohy č. 01 SOP 01
příjemce – X253
dárce – X265

Řádné kolo:

- 1_2024 – X253/X265 na očekávaných 12 % genotypu příjemce
- 2_2024 – X253/X265 na očekávaných 0 % genotypu příjemce
- 3_2024 – X253/X265 na očekávaných 30 % genotypu příjemce
- 4_2024 – X253/X265 na očekávaných 30 % genotypu příjemce
- 5_2024 – X253/X265 na očekávaných 95 % genotypu příjemce
- 6_2024 – X253/X265 na očekávaných 100 % genotypu příjemce
- 7_2024 – X253/X265 na očekávaných 25 % genotypu příjemce
- 8_2024 – X253/X265 na očekávaných 3 % genotypu příjemce
- 9_2024 – X253/X265 na očekávaných 0.5 % genotypu příjemce
- 10_2024 – X253/X265 na očekávaných 0 % genotypu příjemce

Doplňkové kolo nebylo v roce 2024 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 vybraných DNA polymorfizmů, 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:

NZOZ Medigen Diagnostyka Molekularna, Wieliszew, 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, Istanbul, Turecko

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

Celkově se zúčastnilo 14 laboratoří (označení účastníků A až N) – 4 v základní variantě, 10 ve variantě rozšířené + organizátor.

Výsledky:

Nepovinné části, vyšetření informativity, se zúčastnilo celkem 7 laboratoří.
Výsledky byly statisticky 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-skóre (čím je hodnota blíže nule, tím je výsledek správnější). Přehled je uveden v *Tabulce 1. Porovnání všech účastníků pro EPT 2024.*

Hodnocení na kategorie:

- **výborné** ($[z] \leq 1$)
 - **dobré** ($1 < [z] \leq 2$)
 - **akceptovatelné** ($2 < [z] \leq 3$)
 - **pod detekční limit laboratoře**
- } 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 je, je výsledek hodnocen dle Z-skóre.)

- **kritické** ($[z] > 3$) - nesprávný výsledek

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 86 % výsledků v kategorii *Výborné*, 11 % v kategorii *Dobré*, 0 % v kategorii *Akceptovatelné*, 0 % v kategorii *Kritické* a 3 % v kategorii *Pod detekční limit laboratoře*. Všichni účastníci splnili podmínky úspěšné účasti a dosáhli 100% úspěšnosti.

Výsledky jednotlivých účastníků byly také hodnoceny podle percentilů. Graf znázorňující percentily ukazuje úspěšnost všech účastníků navzájem. Vzhledem k nabídce dvou variant (základní a rozšířené) obdržel účastník základní varianty pouze jeden graf a účastník rozšířené varianty grafy dva. První graf porovnává úspěšnost účastníků v analýze prvních 5 kvantifikačních vzorků (1_2024 až 5_2024), druhý graf pak porovnává úspěšnost laboratoří účastníci se rozšířené varianty EPT, tedy analyzující všech 10 kvantifikačních vzorků (1_2024 až 10_2024).

Čím má účastník nižší percentil, tím je v porovnání s ostatními laboratořemi úspěšnější. Výsledky jsou uvedeny v *Grafu 1. EPT 2024 - základní varianta* a v *Grafu 2. EPT 2024 - 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*.

Testování reprodukovatelnosti metod:

Zpestřením letošního kola byla možnost otestovat si reprodukovatelnost vlastních metod. Vzorky 3_2024 a 4_2024 byly připraveny jako dva alikvoty z jednoho původního vzorku. Každý účastník obdržel tabulku shrnutí výsledků všech zúčastněných laboratoří a kitů použitých k analýze. Testování dopadlo velmi dobře, většina laboratoří udávala rozdíl mezi dvěma stejnými vzorky 1 % a méně. Maximální udávaný rozdíl v procentuálním zastoupení genotypu příjemce u shodného vzorku byl 2 %.

Shrnutí reprodukovatelnosti použitých kitů

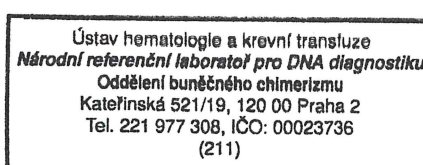
procentuální rozdíl ve vydaném výsledku mezi vzorky 3_2024 a 4_2024	počet laboratoří	použité metody
0	4	PowerPlex 16HS 2x, AmpFLSTR Identifiler 2x
<1	7	NGStrack 2x, KMRtrack 2x, Devyser NGS, AmpFLSTR Identifiler, in-houseSTR
1	4	VNTR, GenomeLab Human STR Primer Set, AmpFLSTR Identifiler, STR not specified
<2	1	Mentype Chimera
2	1	Investigator ID Plex Plus Kit

Závěr:

Letošní kolo bylo mimořádně úspěšné. Všichni účastníci získali certifikát se 100% úspěšností.

Zpracovala: Mgr. Lucie Stefflová

V Praze dne 17.9.2024



Graf 1. EPT 2024 - základní varianta



Graf 2. EPT 2024 - rozšířená varianta



Porovnání všech účastníků pro EPT 2024

očekávané výsledky	1_2024 (12%)	2_2024 (0%)	3_2024 (30%)	4_2024 (30%)	5_2024 (95%)	6_2024 (100%)	7_2024 (25%)	8_2024(3%)	9_2024 (0.5%)	10_2024 (0%)
organizátor	12,000	0,000	31,000	31,000	95,600	100,000	25,000	3,400	0,583	0,000
laborať A	13,000	0,000	30,000	30,000	93,000					
laborať B	14,300	0,000	33,600	33,900	95,800					
laborať C	16,600	0,000	36,600	35,800	94,800	100,000	29,400	5,000	0,000	0,000
laborať D	13,000	0,000	32,000	32,000	95,000					
laborať E	13,200	0,000	41,200	40,600	96,400	100,000	37,600	3,700	0,500	0,000
laborať F	6,000	0,000	24,000	23,000	98,000	100,000	19,000	4,000	0,000	0,000
laborať G	13,000	0,000	32,000	31,000	94,000	100,000	25,000	3,000	0,600	0,000
laborať H	6,200	0,000	23,700	25,100	100,000					
laborať I	12,000	0,000	31,000	32,000	94,000	97,000	24,000	3,000	0,000	0,000
laborať J - STR	12,500	0,000	32,000	34,000	93,000	96,000	24,000	4,000	0,000	0,000
laborať J - NGS	14,500	0,000	34,200	33,600	96,400	98,700	28,900	3,500	0,600	0,000
laborať K - STR	15,000	1,000	34,000	34,000	95,000	100,000	29,000	5,000	1,000	1,000
laborať K - NGS	15,100	0,100	34,400	34,300	95,700	99,800	28,300	3,800	0,700	0,100
laborať L	14,000	0,000	32,000	33,000	94,000	100,000	27,000	4,000	1,000	0,000
laborať M	13,400	0,000	32,500	32,000	91,700	100,000	26,500	3,600	1,200	0,000
laborať N	11,980	0,000	32,530	32,890	90,680	100,000	23,140	2,730	0,470	0,000
průměr	12,693	0,065	32,161	32,246	94,887	99,346	26,680	3,748	0,512	0,085
medián	13,000	0,000	32,000	32,890	95,000	100,000	26,500	3,700	0,580	0,000
směrodatná odchylka**	3,500	0,500	6,570	6,570	3,470	2,310	5,890	1,320	0,640	0,500

Z score ***	1_2024 (12%)	2_2024 (0%)	3_2024 (30%)	4_2024 (30%)	5_2024 (95%)	6_2024 (100%)	7_2024 (25%)	8_2024(3%)	9_2024 (0.5%)	10_2024 (0%)
organizátor	-0,29	0,00	-0,15	-0,29	0,17	0,00	-0,25	-0,23	0,00	0,00
laborať A	0,00	0,00	-0,30	-0,44	-0,58					
laborať B	0,37	0,00	0,24	0,15	0,23					
laborať C	1,03	0,00	0,70	0,44	-0,06	0,00	0,49	0,98	-0,91	0,00
laborať D	0,00	0,00	0,00	-0,14	0,00					
laborať E	0,06	0,00	1,40	1,17	0,40	0,00	1,88	0,00	-0,13	0,00
laborať F	-2,00	0,00	-1,22	-1,50	0,87	0,00	-1,27	0,23	-0,91	0,00
laborať G	0,00	0,00	0,00	-0,29	-0,29	0,00	-0,25	-0,53	0,03	0,00
laborať H	-1,94	0,00	-1,26	-1,19	1,44					
laborať I	-0,29	0,00	-0,15	-0,14	-0,29	-1,30	-0,42	-0,53	-0,91	0,00
laborať J - STR	-0,14	0,00	0,00	0,17	-0,58	-1,73	-0,42	0,23	-0,91	0,00
laborať J - NGS	0,43	0,00	0,33	0,11	0,40	-0,56	0,41	-0,15	0,03	0,00
laborať K - STR	0,57	1,99	0,30	0,17	0,00	0,00	0,42	0,98	0,65	1,99
laborať K - NGS	0,60	0,20	0,37	0,21	0,20	-0,09	0,31	0,08	0,18	0,20
laborať L	0,29	0,00	0,00	0,02	-0,29	0,00	0,08	0,23	0,65	0,00
laborať M	0,11	0,00	0,08	-0,14	-0,95	0,00	0,00	-0,08	0,96	0,00
laborať N	-0,29	0,00	0,08	0,00	-1,25	0,00	-0,57	-0,73	-0,18	0,00

z <= 1 (výborné)
1 < z <= 2 (dobré)
2 < z <= 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).

Přehled použitých metod všech účastníků - kvantitativní vyšetření buněčného chimerizmu 2024

	organizátor	laboratoř A	laboratoř B	laboratoř C
polymorfizmus	STR, indel	STR	indel	STR
metoda	FA, qPCR	FA	NGS	STR-PCR + FA
komerční kit	pro FA ano, pro qPCR jen pro polymorfizmy HLD markery	ano	ano	ne
citlivost	FA 1%; qPCR 0,035%	1%	1%	1%
interpretace %	genotypu příjemce	genotypu dárce	genotypu dárce	genotypu dárce

	laboratoř D	laboratoř E	laboratoř F	laboratoř G
polymorfizmus	SNP, indel	indel	VNTR	STR, indel
metoda	FA, qPCR	qPCR	PCR a gelová elektroforéza	FA, ddPCR
komerční kit	ano	ano	ne	pro FA ano, pro ddPCR ne
citlivost	FA 1%, qPCR 0,1%	0,1%	1%	1% STR; 0,05% indel
interpretace %	genotypu příjemce	genotypu dárce i genotypu příjemce	genotypu dárce i genotypu příjemce	genotypu příjemce

	laboratoř H	laboratoř I	laboratoř J - STR	laboratoř J - NGS
polymorfizmus	STR, indel	STR	STR	indel
metoda	FA, qPCR	FA	FA	NGS
komerční kit	ano	ano	ano	ano
citlivost	0,013% - 0,2% dle markeru qPCR; 1% STR	5%	5%	0,05%
interpretace %	genotypu dárce	genotypu příjemce	genotypu dárce i genotypu příjemce	genotypu dárce i genotypu příjemce

	laboratoř K - STR	laboratoř K - NGS	laboratoř L	laboratoř M
polymorfizmus	STR	indel	STR, VNTR	STR
metoda	FA	NGS	FA	FA
komerční kit	NA	ano	NA	ano
citlivost	0,5%	1%	0,500%	1%
interpretace %	genotypu dárce i genotypu příjemce	genotypu dárce i genotypu příjemce	genotypu příjemce	genotypu dárce

	laboratoř N
polymorfizmus	SNP a indel
metoda	qPCR
komerční kit	ano
citlivost	0,066%
interpretace %	genotypu dárce

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

Přehled používaných kitů 2024

STR. ev. VNTR (FA) analýza	počet účastníků
AmpFLSTR Identifiler (Applied Biosystems)	3
GenomeLab Human STR Primer Set (Beckman-Coulter)	1
Mentype Chimera CE-IVD (Biotype)	2
Investigator ID Plex Plus Kit (Qiagen)	1
PowerPlex 16HS (Promega)	2
home-made	3
neuvedeno	1
indel (qPCR nebo ddPCR) analýza	počet účastníků
Mentype DIPscreen (Biotype)	2
Mentype DIPquant (Biotype)	1
KMRtrack (GenDX)	2
home-made	2
NGS	počet účastníků
NGStrack (GenDx)	2
Devyser chimerism NGS (Devyser)	1