Závěrečná zpráva Zkoušení způsobilosti pro oblast kvantitativního vyšetření buněčného chimerizmu pro rok 2022

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 – X234

dárce – X233

Řádné kolo:

1_2022 – X234/X233 na očekávaných 98 % genotypu příjemce

2_2022 – X234/X233 na očekávaných 5 % genotypu příjemce

3_2022 – X234/X233 na očekávaných 0 % genotypu příjemce

4_2022 – X234/X233 na očekávaných 20 % genotypu příjemce

5_2022 – X234/X233 na očekávaných 25 % genotypu příjemce

6_2022 – X234/X233 na očekávaných 3 % genotypu příjemce

7_2022 – X234/X233 na očekávaných 0.4 % genotypu příjemce

8_2022 – X234/X233 na očekávaných 12 % genotypu příjemce

9_2022 – X234/X233 na očekávaných 37 % genotypu příjemce

10_2022 – X234/X233 na očekávaných 80 % genotypu příjemce

Doplňkové kolo:

11_2022 – X234/X233 na očekávaných 30 % genotypu příjemce

12_2022 – X234/X233 na očekávaných 8 % genotypu příjemce

13_2022 – X234/X233 na očekávaných 0 % genotypu příjemce

14_2022 – X234/X233 na očekávaných 40 % genotypu příjemce

15_2022 – X234/X233 na očekávaných 65 % genotypu příjemce

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**

Problematikou doplňkového kola bylo:

1. Vyšetření informativity (určení referenčních alel) na základě vyšetření vzorků DNA příjemce (vzorek 1P) a dárce (vzorek 2D) – 2 vzorky – **nepovinná část. DNA vzorky jsou stejné jako zaslané v řádném kole (EPT 2022). Nejsou již znovu zasílány.**
2. Kvantitativní vyšetření chimerizmu stejného pacienta - 5 vzorků 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

Zahraniční účastníci:

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

Laboratórium klinickej a molekulovej genetiky, Detska klinika LFUK a NÚDCH, Národný ústav dětských chorôb, Bratislava, Slovenská republika

NZOZ Medigen Diagnostyka Molekularna, Warszawa, Polsko

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

Department of Clinical Immunology, Diagnostic Laboratory of the Department of 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 účastnilo 15 laboratoří (označení účastníků A až O) – 5 v základní variantě, 10 ve variantě rozšířené + organizátor.

Zúčastněné laboratoře – doplňkové kolo:

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

Výsledky:

Nepovinné části, vyšetření informativity, se zúčastnilo celkem 7 laboratoří.

Výsledky byly statisticky v řádném kole vyhodnoceny pomocí mediánu získaných hodnot a směrodatné odchylky, v doplňkovém kole, z důvodu účasti pouze jednoho účastníka, pomocí očekávané hodnoty 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* – řádné kolo, *Tabulce 2* – doplňkové kolo.

Hodnocení na kategorie:

- **výborné** ([z] ≤ 1)
- **dobré** (1 < [z] ≤ 2)
- **akceptovatelné** (2 < [z] ≤ 3)

} správný výsledek

- **pod detekční limit laboratoře** (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.)
- **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*, 5 % v kategorii *Dobré*, 1 % v kategorii *Akceptovatelné*, 4 % v kategorii *Kritické* a 4 % v kategorii *Pod detekční limit laboratoře*.

Jeden účastník nesplnil podmínky úspěšné účasti (dosáhl 70 %), ostatní účastníci splnili podmínky úspěšné účasti (dosažení 80% úspěšnosti)**, dva dosáhli 90 % a ostatních dvanáct dosáhlo 100 %.** Doplňkové kolo bylo všem účastníkům nabídnuto, zájem projevil pouze 1 účastník.

V doplňkovém kole bylo **70 % výsledků v kategorii Výborné, 10 % v kategorii Dobré, 0 % v kategorii Akceptovatelné, 20 % v kategorii Kritické a 0 % v kategorii Pod detekční limit laboratoře.**

Účastník v doplňkovém kole dosáhl 60% úspěšnosti. Nesplnil podmínky úspěšné účasti.

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_2022 až 5_2022) všech účastníků letošního kola, druhý graf pak všech 10 vzorků (1_2022 až 10_2022), ale pouze u laboratoří účastnících se rozšířené varianty. Třetí graf porovnává 5 kvantifikačních vzorků (11_2022 až 15_2022) organizátora a jednoho účastníka doplňkového kola.

Čím má účastník nižší percentil, tím je v porovnání s ostatními laboratořemi úspěšnější. Výsledky jsou uvedeny v *Grafu 1* (základní varianta řádného kola), *Grafu 2* (rozšířená varianta řádného kola), *Grafu 3* (doplňkové kolo).

Přehled použitých metod pro kvantitativní vyšetření buněčného chimerizmu a jejich citlivosti a interpretace jsou uvedené v *Tabulce 3,* přehled používaných kitů v *Tabulce 4.*

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 Čechová

V Praze dne 5.10.2022

02 002 303
Ústav hematologie a krevní transfuze
Oddělení HLA
U Nemocnice 1, 128 20 Praha 2
IČO 00023736
(125)

Porovnání všech účastníků pro EPT 2022

očekávané výsledky	1_2022 (98%)	2_2022 (5%)	3_2022 (0%)	4_2022 (20%)	5_2022 (25%)	6_2022 (3%)	7_2022 (0.4%)	8_2022 (12%)	9_2022 (37%)	10_2022 (80%)
organizátor	97,854	4,558	0,000	18,791	22,713	2,624	0,348	10,652	34,039	83,038
laboratoř A	98,000	6,000	0,000	21,000	27,000					
laboratoř B	96,000	6,000	0,000	17,000	22,000					
laboratoř C	97,300	6,600	0,000	21,800	27,400	4,400	0,000	13,500	38,900	82,200
laboratoř D	100,000	8,600	0,000	35,700	34,400					
laboratoř E	100,000	6,700	0,000	27,400	29,400	3,500	0,400	15,500	29,900	73,500
laboratoř F	100,000	5,000	0,000	17,000	24,000	3,000	0,000	11,000	35,000	79,000
laboratoř G	96,000	6,000	0,000	23,000	29,000	4,000	0,400	14,000	41,000	80,000
laboratoř H	98,300	7,700	0,000	22,300	28,900					
laboratoř I	97,000	8,000	6,000	23,000	29,000	8,000	5,000	15,000	41,000	82,000
laboratoř J	100,000	11,000	0,000	25,000	30,000	10,000	0,000	16,000	42,000	80,000
laboratoř K	98,000	6,000	0,000	26,000	31,000	4,000	0,000	17,000	43,000	80,000
laboratoř L	97,500	5,000	0,000	20,000	23,000	3,000	0,500	11,900	36,000	79,000
laboratoř M	95,700	9,300	0,000	23,600	29,000	7,800	0,000	16,100	39,900	81,000
laboratoř N	98,190	4,060	0,000	18,300	22,080	2,660	0,330	12,020	32,360	82,120
laboratoř O	97,000	5,000	0,000	21,000	26,000					
průměr	**97,928**	**6,595**	**0,375**	**22,556**	**27,181**	**4,817**	**0,634**	**13,879**	**37,554**	**80,169**
medián	**97,93**	**6,00**	**0,00**	**22,05**	**28,15**	**4,00**	**0,33**	**14,00**	**38,90**	**80,00**
standard deviation**	**3,38**	**1,78**	**0,28**	**5,44**	**6,37**	**1,20**	**0,40**	**3,65**	**8,00**	**6,99**

Z score ***	1_2022 (98%)	2_2022 (5%)	3_2022 (0%)	4_2022 (20%)	5_2022 (25%)	6_2022 (3%)	7_2022 (0.4%)	8_2022 (12%)	9_2022 (37%)	10_2022 (80%)
organizátor	-0,02	-0,81	0,00	-0,60	-0,85	-1,15	0,04	-0,92	-0,61	0,43
laboratoř A	0,02	0,00	0,00	-0,19	-0,18					
laboratoř B	-0,57	0,00	0,00	-0,93	-0,97					
laboratoř C	-0,19	0,34	0,00	-0,05	-0,12	0,33	-0,82	-0,14	0,00	0,31
laboratoř D	0,61	1,46	0,00	2,51	0,98					
laboratoř E	0,61	0,39	0,00	0,98	0,20	-0,42	0,17	0,41	-1,12	-0,93
laboratoř F	0,61	-0,56	0,00	-0,93	-0,65	-0,83	-0,82	-0,82	-0,49	-0,14
laboratoř G	-0,57	0,00	0,00	0,17	0,13	0,00	0,17	0,00	0,26	0,00
laboratoř H	0,11	0,95	0,00	0,05	0,12					
laboratoř I	-0,27	1,12	21,81	0,17	0,13	3,34	11,64	0,27	0,26	0,29
laboratoř J	0,61	2,80	0,00	0,54	0,29	5,01	-0,82	0,55	0,39	0,00
laboratoř K	0,02	0,00	0,00	0,73	0,45	0,00	-0,82	0,82	0,51	0,00
laboratoř L	-0,13	-0,56	0,00	-0,38	-0,81	-0,83	0,42	-0,57	-0,36	-0,14
laboratoř M	-0,66	1,85	0,00	0,28	0,13	3,17	-0,82	0,57	0,12	0,14
laboratoř N	0,08	-1,09	0,00	-0,69	-0,95	-1,12	0,00	-0,54	-0,82	0,30
laboratoř O	-0,27	-0,56	0,00	-0,19	-0,34					

|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).**

Tabulka 1

Porovnání všech účastníků pro EPT 2022 - doplňkové kolo

očekávané výsledky*	11_2022 (30%)	12_2022 (8%)	13_2022 (0%)	14_2022 (40%)	15_2022 (65%)
organizátor	28,064	7,737	0,000	37,046	68,915
laboratoř I	39,000	19,000	3,000	48,000	68,000

průměr	33,53	13,37	1,50	42,52	68,46
medián	33,53	13,37	1,50	42,52	68,46
očekávaná hodnota**	30,00	8,00	0,00	40,00	65,00
směrodatná odchylka***	7,15	2,62	0,28	8,28	8,56

Z score ****	11_2022 (30%)	12_2022 (8%)	13_2022 (0%)	14_2022 (40%)	15_2022 (65%)
organizátor	-0,27	-0,10	0,00	-0,36	0,46
laboratoř I	1,26	4,20	10,91	0,97	0,35

|z| <= 1 (výborné)
1 < |z| <= 2 (dobré)
2 < |z| <= 3 (akceptovatelné)
pod detekční limit laboratoře
|z| > 3 (kritické)

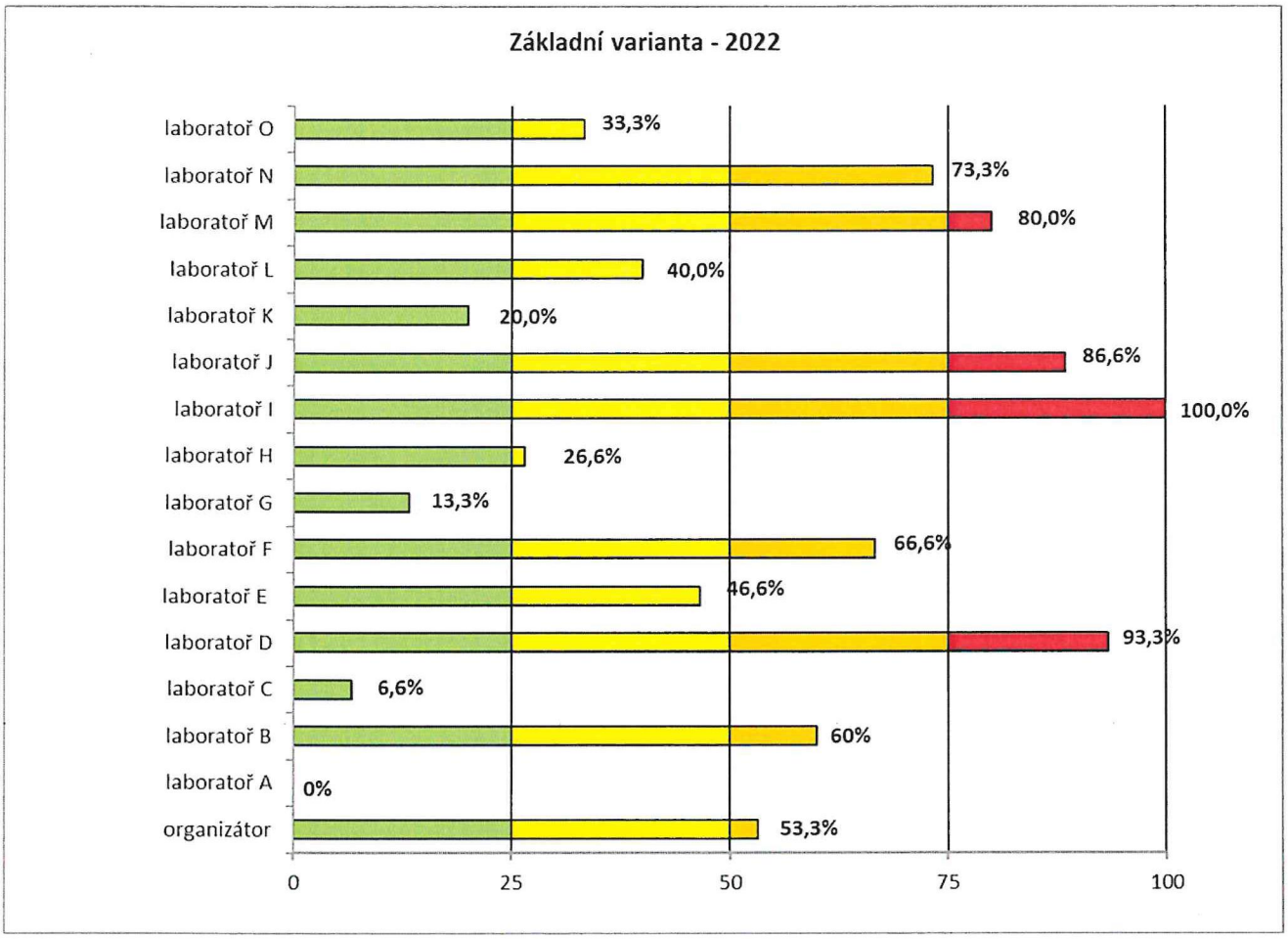
* Očekávané hodnoty jsou uváděné jako % genotypu příjemce.

** Vzhledem k malému počtu účastníků je jako střední hodnota pro výpočet Z score brána očekávaná hodnota.

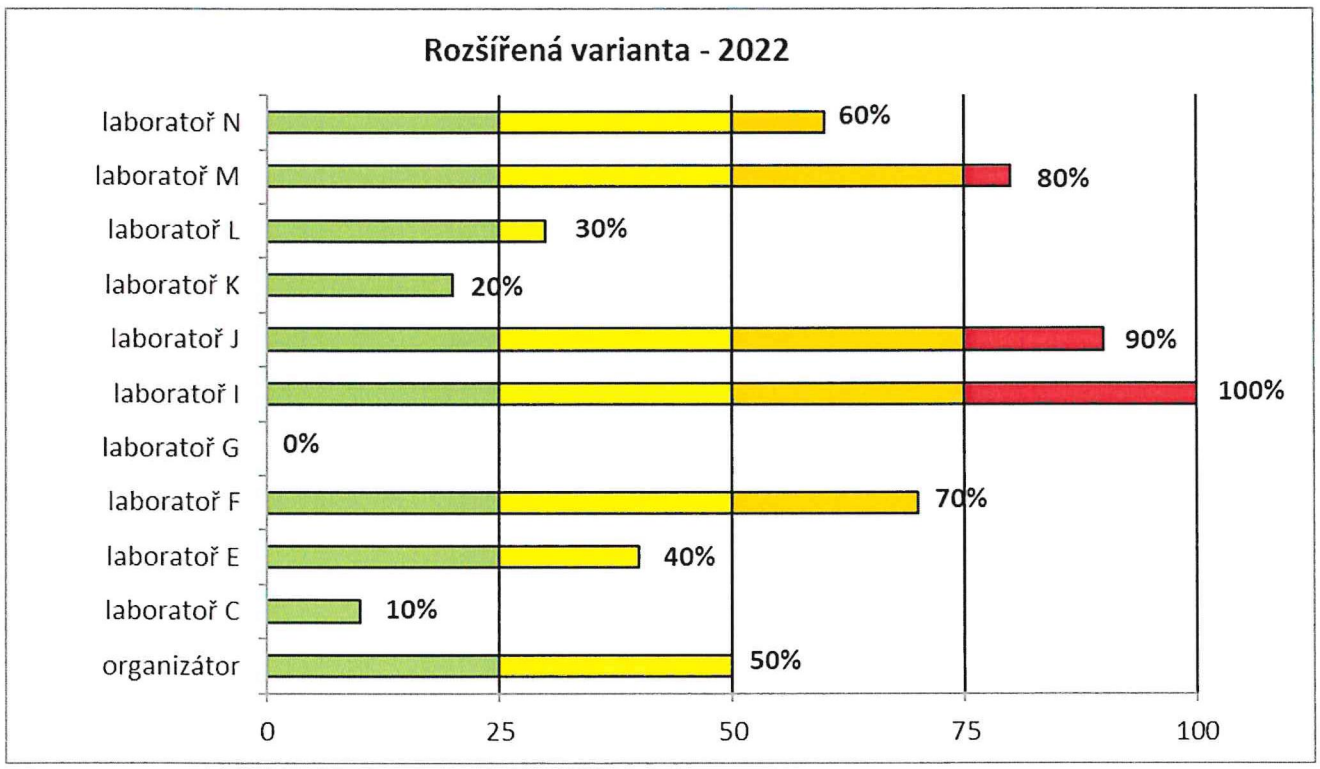
*** Směrodatná odchylka byla určena na základě statistického zpracování výsledků z předchozích let EPT (rozptyl hodnot, regrese).

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

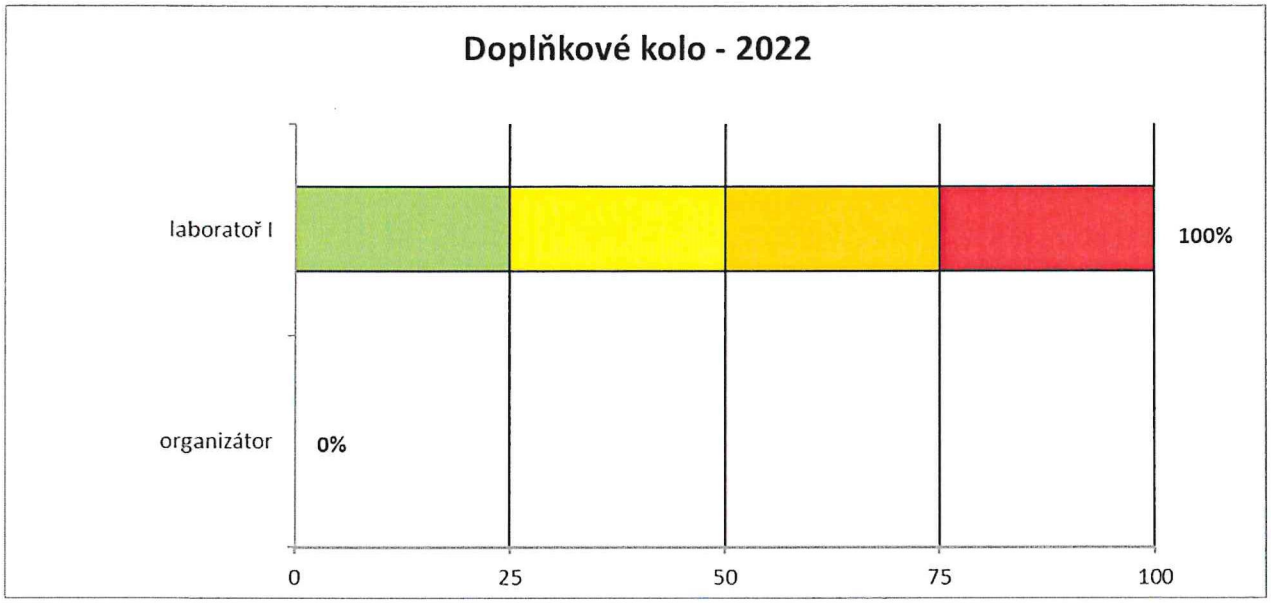
Tabulka 2


Základní varianta - 2022
laboratoř O
laboratoř N
laboratoř M
laboratoř L
laboratoř K
laboratoř J
laboratoř I
laboratoř H
laboratoř G
laboratoř F
laboratoř E
laboratoř D
laboratoř C
laboratoř B
laboratoř A
organizátor
33,3%
73,3%
80,0%
40,0%
20,0%
86,6%
100,0%
26,6%
13,3%
66,6%
46,6%
93,3%
6,6%
60%
0%
53,3%
0
25
50
75
100

Graf 1


Rozšířená varianta - 2022
laboratoř N
laboratoř M
laboratoř L
laboratoř K
laboratoř J
laboratoř I
laboratoř G
laboratoř F
laboratoř E
laboratoř C
organizátor
60%
80%
30%
20%
90%
100%
0%
70%
40%
10%
50%
0
25
50
75
100

Graf 2


Doplňkové kolo - 2022
laboratoř I
organizátor
0%
100%
0
25
50
75
100

Graf 3

Přehled použitých metod všech účastníků - kvantitativní vyšetření buněčného chimerizmu 2022

	organizátor	laboratoř A	laboratoř B	laboratoř C
polymorfizmus	STR, indel	STR	VNTR	STR
metoda	FA a qPCR	FA	FA	STR-PCR a 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

	laboratoř D	laboratoř E	laboratoř F	laboratoř G
polymorfizmus	SNP, indel	indel	VNTR	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 dárce i genotypu příjemce	% genotypu dárce i genotypu příjemce	% genotypu dárce i genotypu příjemce	% genotypu příjemce

	laboratoř H	laboratoř I	laboratoř J	laboratoř K
polymorfizmus	STR, indel	STR	STR	STR
metoda	FA a qPCR	FA	FA	FA
komerční kit	pro FA ano, pro qPCR ne	ano	ano	ano
citlivost	0,1%	5%	5%	1%
interpretace %	% genotypu příjemce	% genotypu dárce i genotypu příjemce	% genotypu dárce i genotypu příjemce	% genotypu dárce i genotypu příjemce

	laboratoř L	laboratoř M	laboratoř N	laboratoř O
polymorfizmus	VNTR, STR	STR	SNP a indel	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 2022

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)	1
Investigator ID Plex Plus Kit (Qiagen)	1
PowerPlex multiplex kits - ESI17FAST, CS7 (Promega)	1
PowerPlex multiplex kits - PP16HS (Promega)	2
PowerPlex monoplex kits (Promega)	1
home-made	3
PowerPlex ESX17	1
neuvedeno	1
indel (qPCR nebo ddPCR) analýza	**počet účastníků**
Mentype DIPscreen (Biotype)	2
Mentype DIPquant (Biotype)	2
HLA-KMR Assay (GenDX)	2
home-made	3

Tabulka 4