

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra genetiky a mikrobiologie



Bakalářská práce

**Kontrola kvality molekulárně-biologických
metod v transplantační medicíně**

Jiří Kotrbatý

Školitel: Mgr. Libor Kolesár

Praha 2012

Prohlášení:

Prohlašuji tímto, že jsem bakalářskou práci na téma „Kontrola kvality molekulárně-biologických metod v transplantační medicíně“ vypracoval samostatně s použitím odborné literatury a pramenů uvedených v seznamu užití literatury.

V Praze, dne 27.8.2012

Jiří Kotrbatý

Poděkování:

Touto cestou bych rád poděkoval svému školiteli, Mgr. Liborovi Kolesárovi, za cenné připomínky a rady při vypracování bakalářské práce.

Obsah

Seznam užitých zkratk	5
Abstrakt	7
2. HLA komplex	9
2.1. HLA I. třídy	10
2.2. HLA II. třídy	10
2.3. HLA III. třídy	11
2.4. Uplatnění HLA antigenů v transplantační medicíně	11
3. Molekulárně-biologické metody stanovení HLA komplexu	12
3.1. PCR se sekvenčně specifickými primery (PCR-SSP)	13
3.2. PCR se sekvenčně specifickými oligonukleotidovými sondami (PCR-SSOP)	14
3.3. Metoda přímého sekvenování – SBT	15
4. Validace a verifikace	16
4.1. Vzorky vhodné pro validaci (verifikaci)	17
4.2. Rozsah validace a verifikace	18
4.3. Přesnost („accuracy“)	18
4.3.1. Citlivost (Sensitivity)	20
4.3.2. Specifičnost (Specificity)	21
4.4. Preciznost	21
4.5. Robustnost	22
4.6. Meze zobrazení („reportable range“) a referenční rozmezí	23
4.7. Interference	23
4.7.1. Vliv interferující látky	23
4.7.2. Přenos mezi vzorky („carryover“, „cross-contamination“)	24
4.8. Mez detekce	24
5. Interní kontrola kvality	24
5.1. Kontrola amplifikace	25
5.2. Interní kontrola kvality u PCR-SSOP	26
5.3. Interní kontrola kvality u SBT	26
6. Externí hodnocení kvality (EHK)	27
7. Závěr	28
8. Literatura	29

Seznam užitých zkratek

AP	average	aritmetický průměr
APC	Antigen Presenting Cells	Antigen prezentující buňky
ASHI	The American Society for Histocompatibility and Immunogenetics	Americká společnost pro histokompatibilitu a imunogenetiku
CRM	Certified Reference Material	certifikovaný referenční materiál
CV	coefficient of variation	variační koeficient
ČIA		Český institut pro akreditaci, o.p.s.
ČSN		Česká státní norma
ddNTP	dideoxynucleotide triphosphate	dideoxynukleotidtrifosfát
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynucleotide triphosphate	deoxynukleotidtrifosfátů
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	kyselina ethylendiamintetraoctová
EFI	European Federation for Immunogenetics	Evropská federace pro imunogenetiku
EHK		externí hodnocení kvality
EN		Evropská norma
GvHD	Graft versus Host Disease	Reakce štěpu proti hostiteli
HLA	Human Leukocyte Antigen	lidské leukocytární antigeny
HR	high resolution	vysoké rozlišení
HvGD	Host versus Graft Disease	Reakce hostitele proti štěpu
IKK		interní kontrola kvality
IR	intermediate resolution	střední rozlišení
IRMM	Institute for Reference Materials and Measurements	
ISO	International Organization for Standardization	Mezinárodní organizace pro standardizaci
LR	low resolution	nízké rozlišení
NGRL	National Genetics Reference Laboratory Manchester	
NGT	Next-generation DNA sequencing,	další generace sekvenování DNA
NIBSC	National Institute of Biological Standards and Controls	

NIST	National Institutes for Standards and Technology	
NPV	Negative predictive value	negativní prediktivní hodnota
PCR	Polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce
PE	Probability Error	pravděpodobnost chyby
PQV	Phred Quality Value	hodnota kvality Phred
PPV	Positive predictive value	pozitivní prediktivní hodnota
QV	Quality Value	hodnota kvality
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism	Polymorfismus délky restričních fragmentů
SBT	Sequence Based Typing	metoda přímého sekvenování
SD	standard deviation	směrodatná odchylka
SNP	single nucleotide polymorphism	jednonukleotidový polymorfismus
SRM	Standart Reference Material	standardní referenční materiál
SSOP	Sequence Specific Oligonucleotide Probes	sekvenčně specifické oligonukleotidové sondy
SSP	Sequence Specific Primers	sekvenčně specifické primery

Abstrakt

Tato práce je zaměřena na popis zajištění kontroly kvality molekulárně-biologických metod používaných v transplantační medicíně, tedy metod HLA typizace. Kontrola kvality je součástí systému řízení kvality. Skládá se z několika prvků: validace, verifikace, interní kontrola kvality a externí hodnocení kvality. Každá zdravotnická laboratoř, včetně laboratoří zabývajících se HLA typizací, musí mít tyto prvky aplikovány do svého rutinního provozu. Validace se provádí před zavedením metody a ověřuje, zda je metoda vhodná pro zamýšlené použití. Verifikace je ověření, že validovanou metodu používáme správně v podmínkách laboratoře. Vnitřní kontrola kvality spočívá v analýze známých pozitivních a negativních vzorků a hodnotí přesnost a preciznost celého analytického procesu. V rámci externího hodnocení kvality se analyzují různé laboratoře stejný vzorek a jejich výsledky jsou vůči sobě porovnávány.

Klíčová slova: HLA typizace, validace, verifikace, interní kontrola kvality, externí hodnocení kvality

Abstract

This work is focused on the description of quality control of molecular-biological methods used in transplant medicine, ie methods of HLA typing. Quality control is part of the quality management system. It consists of several components: validation, verification, internal quality control and external quality assessment. Each medical laboratory, including laboratories engaged in HLA typing, these elements must be applied to its routine operation. Validation is done before the introduction of methods and verifies whether the method is correct for the intended use. Verification is to verify that the validated method is used correctly in laboratory conditions. Internal quality control is based on an analysis of known positive and negative samples and evaluate the accuracy and precision of the whole analytical process. The external evaluation of the quality of the different laboratories analyze the same sample and the results are compared to each other.

Key words: HLA typing, validation, verification, internal quality control, external quality assessment

1. Úvod

Jedním z faktorů, který zásadně ovlivňuje úspěšnost transplantace je míra shody v HLA (Human Leukocyte Antigens) fenotypu mezi dárce tkáně a jejím příjemcem. HLA fenotyp je určován genovým komplexem HLA. Produkty těchto genových komplexů, HLA antigeny, hrají hlavní roli v aktivaci T-lymfocytů, která ústí v akutní nebo chronickou rejekci transplantované tkáně. Studie ukazují, že poločas životnosti transplantované tkáně je závislý na míře HLA shody mezi dárce a příjemcem a je tím menší, čím menší je shoda v komplexu HLA (Erlich H.A., Opelz G. et al. 2001). Validně posoudit HLA shodu mezi dárce a příjemcem je možné pouze na základě správných a precizních výsledcích stanovení HLA fenotypu. Tyto výsledky může poskytovat pouze metoda, která je náležitě validována, verifikována v podmínkách laboratoře a pravidelně kontrolována systémem interní kontroly kvality (IKK) a externím hodnocení kvality (EHK). Geny HLA komplexu studuje imunogenetika, specializovaný obor, který je na hranici mezi genetikou a imunologií. Studium HLA genů se uplatňuje také v kriminalistice, při vylučování otcovství nebo při odhadu rizika onemocnění některými chorobami. Vzhledem k tomu, že DNA diagnostika (do které se řadí i HLA typizace molekulárně-biologickými metodami) je obvykle prováděna jen jednou během života pacienta, jsou pochopitelné nároky na používání velmi přesných metod v laboratořích, které mají zavedený funkční systém řízení kvality, v ideálním případě potvrzený i nějakou formou akreditace udělenou nezávislou agenturou.

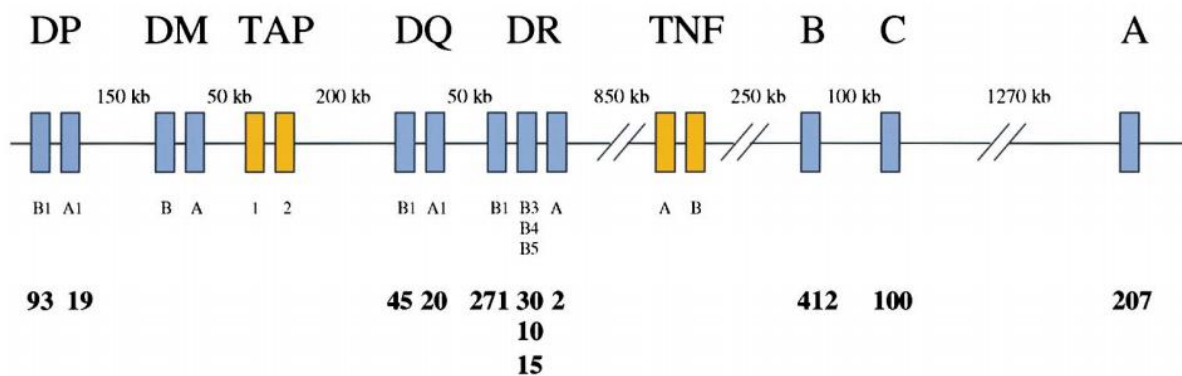
Systém řízení kvality představuje veškeré činnosti laboratoře, které vedou k validnímu výsledku. Základní pravidla pro systém řízení kvality představuje mezinárodní norma ČSN EN ISO 9001 Systémy managementu kvality - Požadavky. Jedná se o normu obecnou, kterou lze aplikovat do jakéhokoliv oboru služeb. Specifičtější normou, určenou výlučně pro zdravotnické laboratoře, je norma ČSN EN ISO 15189 Zdravotnické laboratoře - Zvláštní požadavky na kvalitu a způsobilost. Na základě § 28 zákona 373/2011 Sb. musí být všechny laboratoře, které vyšetřují lidský genom, akreditovány podle této normy. V České republice jako jediný udílí tuto akreditaci Český institut pro akreditaci, o.p.s. (ČIA). Všechny imunogenetické laboratoře však musí být navíc ještě akreditovány podle specifických požadavků mezinárodních společností. Pro evropské státy tyto požadavky určuje Evropská federace pro imunogenetiku (EFI, European Federation for Immunogenetics) ve svých EFI standardech. Pro americké státy definuje tyto standardy Americká společnost pro histokompatibilitu a imunogenetiku (ASHI, The American Society for Histocompatibility and Immunogenetics). Obecně je možné říct, že do systému řízení kvality (ISO 2007) patří zajištění:

- kvalifikovaného personálu laboratoře
- odpovídajících prostor a prostředí laboratoře
- odpovídajícího zařízení (přístrojů, referenčních materiálů, spotřebních materiálů, reagensů, software) včetně jejich údržby a servisu
- preanalytické fáze (odběr, transport a příjem vzorku)
- analytické fáze (používání vhodných postupů, dokumentování všech pracovních postupů a vedení záznamů zařízení a reagensie)
- kontroly kvality (validace a verifikace postupů, interní kontrola kvality a externí hodnocení kvality)
- zajištění postanalytické fáze (likvidace vzorků a odpadů, postupy pro vydávání výsledků, komunikace se zákazníky)

Cílem této práce je popsat souhrn postupů zajištění kontroly kvality, tedy postupů validace, verifikace, interní kontroly kvality a externího hodnocení kvality molekulárně-biologických metod používaných v HLA typizaci. Oblast HLA typizace jsem zvolil vzhledem k mému zaměstnání v Institutu klinické a experimentální medicíny, který je zaměřen na transplantační medicínu.

2. HLA komplex

Oblast HLA genů se nachází na krátkém raménku 6. chromozomu v oblasti 6p21.31 a představuje oblast o velikosti cca 4 Mb, viz obr. 1. Bylo v ní identifikováno 224 genových lokusů, u 128 z nich se předpokládá nějaká funkce. HLA geny kódují molekuly HLA, které jsou exprimované na membránách všech jaderných buněk. Dělí se do tří tříd, které jsou strukturně a funkčně rozdílné.



Obr. 1 Oblast HLA genů na krátkém raménku 6. chromozomu. Geny molekul HLA I. a II. třídy jsou zobrazeny modře. Čísla pod lokusy představují počty alel. Převzato z (Erlich H.A., Opelz G. et al. 2001)

2.1. HLA I. třídy

Oblast genů HLA I. třídy se pro potřeby transplantační medicíny dělí do tří skupin:

- a) klasické transplantační geny, jejichž produkty jsou primárně zodpovědné za rozpoznávání tkáně – lokusy A, B a C
- b) neklasické transplantační geny – lokusy E, F a G
- c) nefunkční pseudogeny – lokusy H, J, K, a L (Kolesár 2009).

Produkty těchto genů (tzv. antigeny HLA I. třídy) jsou v lidském organismu exprimovány na všech jaderných buňkách. Skládají se z jednoho těžkého řetězce α a jednoho lehkého řetězce β . Řetězec α je transmembránový glykoprotein typu I (N-konec v extracelulární oblasti) o velikosti 45 kDa. Rozeznávají se v něm tři extracelulární domény podobné imunoglobulinovým doménám. Domény $\alpha 1$ a $\alpha 2$ směřují k N-konci proteinu a vytváří vazebnou kapsu pro peptidový fragment. Doména $\alpha 3$ směřuje k C-konci a asociuje s β řetězcem. Řetězec β (jinak také $\beta 2$ -mikroglobulin) je protein o velikosti 12 kDa a je kódován genem nacházejícím se na 15. chromozómu (15q21-15q22). Tento protein pravděpodobně odpovídá za expresi HLA antigenů v buněčné membráně a zabezpečení správné prostorové orientace kompletní molekuly. Geny antigenů HLA I. třídy se skládají ze sedmi exonů. Exon 1 kóduje 5' vedoucí sekvenci, která odpovídá za zakotvení řetězce α do buněčné membrány. Exony 2 a 3 vykazují největší polymorfismy a kódují domény $\alpha 1$ a $\alpha 2$. Doménu $\alpha 3$ kóduje exon 4. Exon 5 kóduje transmembránovou část molekuly HLA a exony 6 a 7 kódují cytoplazmatickou část molekuly. (Kolesár 2009)

2.2. HLA II. třídy

Oblast genů HLA II. třídy se označuje jako HLA-D a nachází se centromericky od lokusu B. Je velká asi 1 Mb a skládá se z několika podoblastí: DM, DO, DQ, DP a DR. Pro potřeby transplantační medicíny jsou nejdůležitějšími lokusy HLA-DR, -DQ a -DP. Geny antigenů HLA II. třídy se skládají ze šesti exonů. Produkty těchto genů patří k transmembránovým glykoproteinům typu I. Skládají se ze dvou nekovalentně asociovaných podjednotek: α (velikost 34 kDa) a β (velikost 29 kDa). Každá z těchto podjednotek se dělí na 2 domény: $\alpha 1$, $\alpha 2$ a $\beta 1$, $\beta 2$. Domény $\alpha 1$ a $\beta 1$ tvoří vazebnou kapsu pro peptidový fragment, který je prezentován imunokompetentním buňkám. Tato vazebná kapsa zůstává otevřená, na rozdíl od

molekul HLA I. třídy. Díky tomu mohou HLA molekuly II. třídy prezentovat fragmenty peptidů o velikosti 15 – 35 aminokyselin (molekuly HLA I. třídy exprimují fragmenty o velikosti 8 – 10 aminokyselin). Molekuly HLA II. třídy jsou za fyziologických podmínek exprimovány jen na antigen prezentujících buňkách, tzv. APC (z angl. Antigen Presenting Cells): dendritické buňky, monocyty, B lymfocyty, aktivované T lymfocyty a thymové epiteliální buňky. (Kolesár 2009)

2.3. HLA III. třídy

Geny HLA III. třídy se nachází uvnitř centrální oblasti HLA. Bylo zde lokalizováno přibližně 40 genů s důležitými imunologickými funkcemi. Nachází se zde některé složky komplementového systému, C2, Bf a C4, proteiny membránového transportu (TAP), lymfotoxin (LT α a β), tumor-nekrotizující faktor (TNF), geny pro proteiny tepelného šoku HSP70, gen B144, 1C7, AIF-1, I κ BL a SKI2W (Kolesár 2009).

2.4. Uplatnění HLA antigenů v transplantaci medicíně

Pro potřeby transplantaci medicíny se typizuje HLA fenotyp I. a II. třídy v lokusech HLA-A, -B, -C, -DRB1 a -DQB1, které vykazují největší polymorfismus. Tento polymorfismus se nachází v hypervariabilních oblastech exonů, jejichž produkty tvoří vazebné kapsy peptidů. U genů HLA I. třídy (HLA-A, -B, a -C) bývají typizovány exony 2 a 3, v případě přítomnosti nulové alely nebo jiných nejednoznačností i exon 4. Z genů HLA II. třídy je typizován exon 2 lokusů HLA-DRB1 a -DQB1, při nejednoznačné kombinaci alel i exon 3 (Kolesár 2009). HLA III. třídy se v současné době pro potřeby transplantaci medicíny nepoužívá.

Jak již bylo řečeno, poločas životnosti transplantované tkáně je závislý na míře HLA shody mezi dárcem a příjemcem a je tím menší, čím menší je shoda v komplexu HLA (Erlich H.A., Opelz G. et al. 2001). Větší požadavek na shodu v HLA antigenech než u orgánových transplantací je kladen u transplantací krvetvorných buněk. Štěp krvetvorných buněk totiž tvoří imunologicky kompetentní tkáň, tudíž díky obousměrnému imunitnímu rozeznávání tkání může v případě neshody hrozit jak reakce štěpu proti hostiteli (Graft versus Host Disease, GvHD), ale zároveň také reakce hostitele proti štěpu (Host versus Graft Disease HvGD, u orgánových transplantací rejekce štěpu). Nejnižší riziko potransplantačních komplikací u transplantací krvetvorných buněk mají pacienti se shodou ve všech hodnocených alelách, tj. v lokusech HLA-A, -B, -C, -DRB1 a -DQB1 (tzv. shoda „10/10“). Jedinou tolerovanou neshodou je v tomto případě neshoda v -C lokusu (Kolesár 2009). Z toho jednoznačně vyplývá oprávněnost požadavku na správné a precizní stanovení HLA fenotypu.

3. Molekulárně-biologické metody stanovení HLA komplexu

HLA fenotyp byl původně stanovován tzv. sérologickými metodami. Tyto reakce využívají alloantiséra o známé reaktivitě proti HLA antigenům a buňky testovaného jedince. Vzhledem k rostoucímu množství nově objevených alel se od tohoto testování postupně opouští a od 90. let, kdy dochází k rozvoji PCR (Polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce) metod v rutinním používání, je nahrazováno tzv. molekulárně-biologickými technikami. Původní molekulárně-biologickou technikou byla RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, polymorfismus délky restrikčních fragmentů). Jedná se o restrikční analýzu využívající restrikčních endonukleáz. Restrikční endonukleázy jsou enzymy, které štěpí DNA na základě rozpoznání více či méně specifické palindromatické sekvence v DNA řetězci. Tato metoda však nedokáže rozlišit všechny existující HLA alely a proto byla nahrazena metodami PCR-SSP (Sequence Specific Primers, sekvenčně specifické primery), PCR-SSOP (Sequence Specific Oligonucleotide Probes, sekvenčně specifické oligonukleotidové sondy), SBT (Sequence Based Typing, metoda přímého sekvenování) a nově i NGT (Next-generation DNA sequencing, další generace sekvenování DNA).

Diskutované metody jsou založeny na určování tzv. SNP (single nucleotide polymorphism, jednonukleotidový polymorfismus), kterými se jednotlivé alely od sebe liší. Dají se rozdělit podle dvou hledisek (Kolesár 2009):

a) podle principu detekce polymorfismu

- 1) jednoduchá PCR
- 2) hybridizace DNA se sondou
- 3) sekvenování každého nukleotidu DNA fragmentu

b) podle úrovně rozlišení polymorfismu

- 1) low resolution (LR, nízké rozlišení) systémy – rozlišují HLA molekuly na úrovni alelických rodin (např. HLA-A*01, HLA-B*07),
- 2) intermediate resolution (IR, střední rozlišení) systémy – rozlišují užší skupinu alel v rámci alelické rodiny (např. HLA-A*0101/02/03),
- 3) high resolution (HR, vysoké rozlišení) systémy – rozlišují jednotlivé alely lišící se i jen jedním nukleotidem (např. HLA-A*0101).

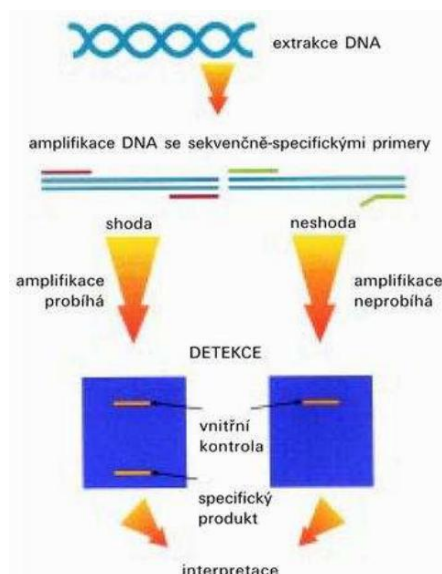
Použití úrovně rozlišení polymorfismu se liší podle účelu. Registry dárců krvetvorných buněk využívají při screeningu a nábore dárců metody, které jsou levné a poskytují IR rozlišení. Pro

vyhledání shody mezi dárcem a příjemcem se obvykle typizují HLA antigeny lokusů -A, -B a -DRB1. Pro závěrečné hodnocení shody mezi dárcem a příjemcem se používají metody s HR rozlišením a typizují se obvykle HLA antigeny lokusů -A, -B, -C, -DRB1 a -DQB1. U orgánových transplantací je požadavek na metodu rychlou, poskytující LR, případně IR rozlišení HLA antigenů lokusů -A, -B a -DRB1 (Erlich H.A., Opelz G. et al. 2001; Kolesár 2009). Bez zajímavosti určitě je, že žádná z metod není nadřazená ostatním, vyšetřovací strategie se mohou mezi laboratořemi lišit. Často se také jednotlivé metody vzájemně doplňují a kombinují. V zásadě jsou 2 způsoby, kterými lze dojít k výsledku HR typizace: první začíná vstupní LR typizací následovaná HR typizací pomocí PCR-SSP nebo PCR-SSOP. Druhý způsob spočívá ve výběru SBT jako primární metody, která je následována PCR-SSP nebo PCR-SSOP k rozlišení nejednoznačností (Gabriel Ch. 2011).

Všechny používané molekulárně-biologické metody jsou metodami kvalitativními. Výstupem (a zároveň výsledkem celé analýzy) je průkaz určitého HLA fenotypu.

3.1. PCR se sekvenčně specifickými primery (PCR-SSP)

PCR-SSP patří mezi jednu z primárních metod pro HLA typizaci. Je jednoduchá, reprodukovatelná a umožňuje LR i HR rozlišení. Jednotlivé alely v HLA lokusu se odlišují pomocí různého počtu specifických primerů, které jsou navrženy tak, aby na svém posledním nukleotidu na 3'konci překrývaly testované polymorfni místo (SNP). Kompatibilita na 3'konci primeru rozhoduje o tom, jestli za primer nasedne DNA-polymeráza a bude prodlužovat nově syntetizovaný řetězec DNA nebo ne. K tomu dochází pouze v případě úplné kompatibility primeru. Výsledné produkty PCR jsou podle své velikosti elektroforeticky rozděleny v agarózovém gelu, vizualizovány pod UV světlem a vyfotografovány. Na fotografii se hodnotí přítomnost / nepřítomnost produktu odpovídající přítomnosti / nepřítomnosti SNP v genomické DNA testovaného vzorku, viz obr. 2. Směsi specifických primerů jsou navrženy tak, aby s co nejmenším množstvím primerů pokryly všechny alely a umožnili je jednoznačně od sebe odlišit. Při LR rozlišení se používají 3 směsi s 24 primery (pro HLA-A, -C, -DRB1), s 48 primery (pro HLA-B) a s 8 primery (pro HLA-DQB1). Při HR rozlišení se používají směsi s různým počtem primerů, který se odvíjí od polymorfnosti antigenu. V praxi se používají směsi s 3 až 96 primery (Kolesár 2009).



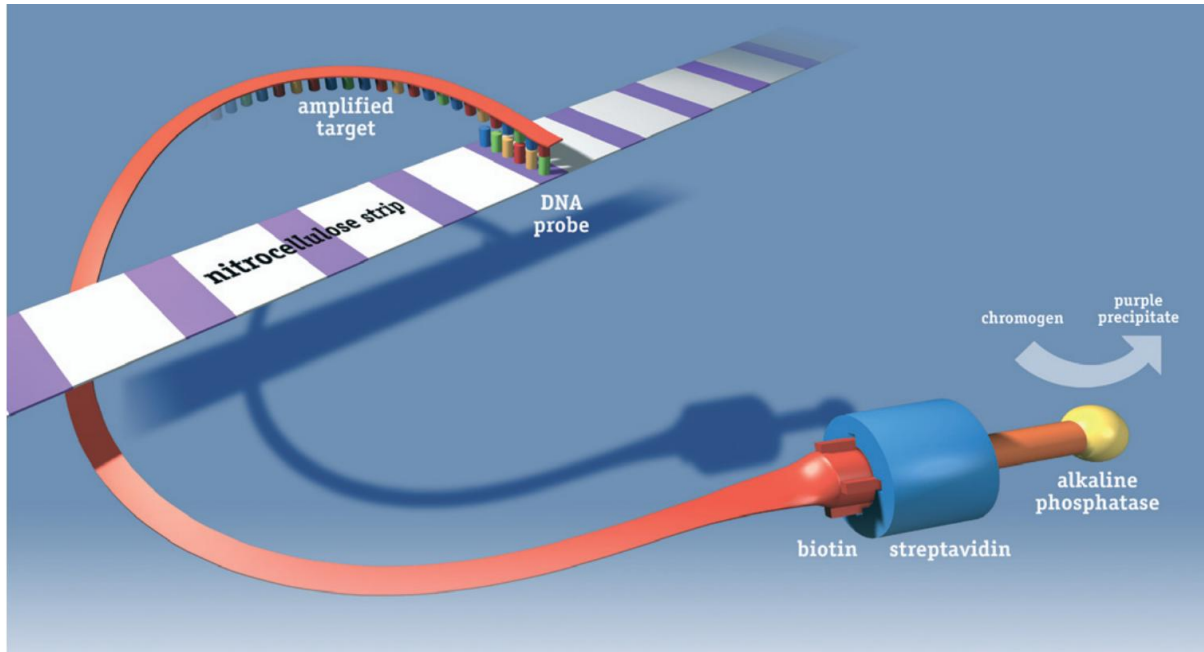
Obr. 2 Princip PCR-SSP, převzato z (Petřek 2000).

3.2. PCR se sekvenčně specifickými oligonukleotidovými sondami (PCR-SSOP)

Použití metody PCR-SSOP v HLA typizaci poprvé popsali (Allen 1994), před tím však s touto metodou pracoval již (Saiki 1986). S lokus-specifickým párem primerů, modifikovaným zpravidla biotinovou značkou, se nechá amplifikovat celý polymorfní úsek PCR produktu. V dalším kroku se biotinylovaný DNA fragment nechá chemicky denaturovat. Za přísně kontrolované teploty se značené jednovláknové řetězce PCR produktu nechají hybridizovat se sekvenčně specifickými oligonukleotidovými sondami. K vazbě PCR produktu na sondy dochází na základě DNA komplementarity. Hybridizace může probíhat ve dvou uspořádání. Při tzv. forward uspořádání jsou PCR fragmenty ukotveny na pevném nosiči a hybridizují na ně sondy obsažené v kapalně fázi. V praxi se však častěji používá tzv. reverzní uspořádání, kdy jsou sondy ukotveny na pevném nosiči. Pevnou fází může být jamka ELISA destičky, nitrocelulosaová membrána nebo polystyrenová kulička. Jednovláknové řetězce PCR produktu mohou být značeny např. streptavidinem značenou křenovou peroxidázou, alkalickou fosfatázou, nebo digoxigeninem (Erlich H.A., Opelz G. et al. 2001). Pro vizualizaci navázaných fragmentů se používá chromogenní reakce nebo detekce fluorescence. Podobně jako u PCR-SSP metody se vizualizací získá kombinace pozitivních a negativních oligonukleotidových sond, která odpovídá určité kombinaci alel HLA.

Nespornou výhodou této metody oproti PCR-SSP je možnost automatizace procesu hybridizace. Tím se jednak eliminují kroky, během nichž by mohla být způsobena chyba lidským faktorem, a jednak umožňuje zpracování velkého množství vzorků. Také vstupní množství testované DNA je u metody PCR-SSOP menší (100 ng genomické DNA na 48

SNP) než u metody PCR-SSP (15 – 30 ng genomické DNA na 1 SNP) (Kolesár 2009). HR systémy používají 57 immobilizovaných sond při typizaci HLA-A, pro HLA-B pak 83 sond pro exony 2 a 3 (Erlich H.A., Opelz G. et al. 2001).

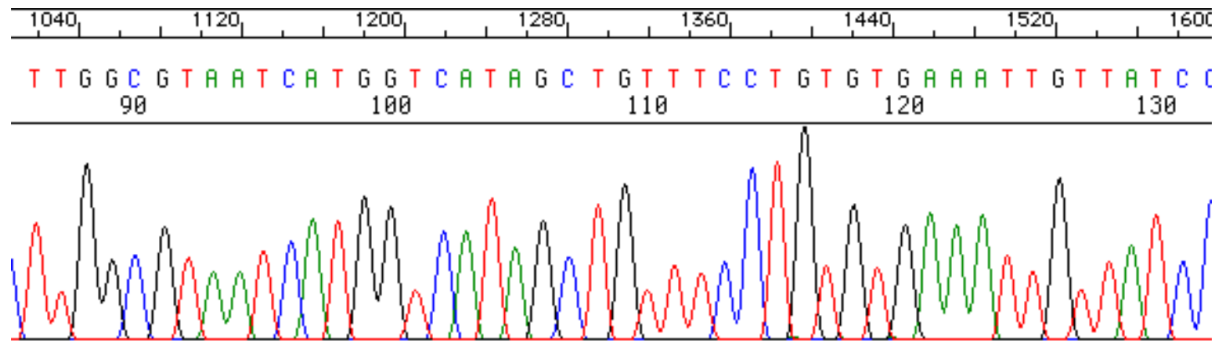


Obr. 3 Se sekvenčně specifickou oligonukleotidovou sondou (SSOP), ukotvenou na nitrocelulosové membráně, se hybridizuje naamplifikovaný úsek. Hibridizovaný komplex je vizualizován systémem enzym-substrát konjugovaný přes systém streptavidin-biotin. Převzato z (Kolesár 2009)

3.3. Metoda přímého sekvenování – SBT

Za „zlatý standard“ při HLA typizaci je považována metoda přímého sekvenování (SBT – Sequence Based Typing) (Sayer D.C. 2004). Na rozdíl od předchozích metod totiž poskytuje přesnou informaci o každém nukleotidu ve zkoumaném řetězci DNA a není omezena na předem známé polymorfismy. K sekvenování se využívá tzv. Sangerova metoda sekvenování, ve které je přečištěný PCR produkt amplifikován následnou PCR reakcí. V té hraje hlavní roli směs deoxynukleotidtrifosfátů (dNTP) s fluorescenčně značenými dideoxynukleotidtrifosfáty (ddNTP). Využívá se nemožnosti DNA polymerázy kovalentně navázat za ddNTP další dNTP díky přítomnosti –H na 3' uhlíku (dNTP mají na 3' uhlíku –OH). Tím syntéza nového řetězce končí. Díky správnému poměru dNTP a ddNTP získáváme směs různě dlouhých fragmentů zakončených ddNTP. Po přečištění od nespotebovaných ddNTP a primerů se směs různě dlouhých fragmentů rozděluje v sekvenátoru principem kapilární elektroforézy za využití speciálního polymeru s rozlišovací schopností 1 nukleotid. Laserovým zařízením, které je

součástí sekvenátoru, je poté detekována fluorescence jednotlivých fluorescenčně značených fragmentů DNA. Měřené signály jsou softwarově převedeny do elektroforeogramu umožňujícího přečíst nukleotidovou sekvenci, viz obr. 4. Nevýhodou této metody jsou finanční nároky (Erlich H.A., Opelz G. et al. 2001) a potřeba složitého technického vybavení.



Obr. 4 Ukázka výsledného elektroforeogramu při SBT. Převzato z (Kolesár 2009)

4. Validace a verifikace

Slovník managementu kvality (ISO 2006) definuje validaci jako potvrzení získané prostřednictvím poskytnutí objektivních důkazů, že požadavky na specifické zamýšlené použití nebo specifickou aplikaci byly splněny. Jinými slovy validace potvrzuje, že používaná metoda je schopna splnit naše požadavky a že poskytuje dostatečnou úroveň měření. Validace se provádí ověřením všech analytických znaků metody, které jsou relevantní vzhledem k metodě a obvykle ji provádí výrobce metody. Laboratoř metodu validuje pouze v případě, že postup od výrobce modifikuje (použitím jiných restriktáz, polymeráz, změnou reakčních podmínek apod.) a/nebo v případě, že sama svou metodu vyvine (tzv. in house metoda).

Verifikace je oproti validaci definována jako potvrzení získané prostřednictvím poskytnutí objektivních důkazů, že specifikované požadavky byly splněny (ISO 2006). Obě definice jsou si velice blízké. Validace představuje ověření, zda používáme správnou metodu, verifikace pak, zda tuto metodu používáme správně a zda je plně funkční v konkrétní laboratoři (Jennings 2009). V klinické laboratoři to představuje ověření způsobilosti personálu laboratoře, zařízení a prostředí dosahovat deklarované výkonnosti metody.

Validace (resp. verifikace) se provádí:

- před zavedením nové metody
- před aplikací nového analytického měřicího systému do laboratoře
- před zavedením nového (jiného) diagnostického kitu

- pokud se rozšíří použití stávající metody o další účel (např. zpracování jiného druhu biologického materiálu)
- ukazuje-li kontrola kvality přetrvávající problém
- při převzetí metody (typu in house) z jiné laboratoře nebo z publikace
- pokud laboratoř modifikuje výrobcem doporučený postup
- při významné změně instrumentace
- dle validačního plánu

(Friedecký 2010). Zásadní pravidlo však je, že než se začnou vydávat výsledky patientských vzorků, musí se metoda validovat nebo alespoň verifikovat (AMP 2009).

4.1. Vzorky vhodné pro validaci (verifikaci)

Jako vzorky pro validaci (verifikaci) se v ideálním případě používají certifikované referenční materiály (tzv. CRM) nebo standardní referenční materiály (tzv. SRM) s přiřazenou referenční hodnotou. Tyto referenční materiály nabízí mnoho institucí, např. National Institutes for Standards and Technology (NIST, USA), National Genetics Reference Laboratory Manchester (NGRL, Velká Británie), World Health Organization-International Reference Materials, Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM, Belgie), National Institute of Biological Standards and Controls (NIBSC, Velká Británie) (AMP 2009). V současné době však pro oblast HLA typizace žádný CRM (SRM) neexistuje. V těchto případech se referenční vzorky nahrazují:

- a) vzorky, které byly validovány v rámci mezilaboratorního porovnání (viz kap. 5. Externí hodnocení kvality),
- b) firemními kontrolními materiály,
- c) vzorky analyzovanými referenční metodou („zlatým standardem“) nebo
- d) vzorky analyzovanými již zavedenou validovanou metodou.

(Brdička 2007; AMP 2009). Použité vzorky by měly být co nejpodobnější vzorkům používaným při běžném testování. Pozitivním vzorkem je vzorek nesoucí známý HLA fenotyp. Negativním vzorkem je vzorek bez genomové DNA nebo vzorek nesoucí jiný než hledaný HLA fenotyp.

Počet vzorků, které mají být při validaci nebo verifikaci metody analyzovány je plně v kompetenci vedoucího laboratoře (Mattocks 2010). Mělo by být však ve shodě s doporučením odborné společnosti, pokud existuje. Vždy je také nutné vzít do úvahy jak a k jakému účelu bude metoda používána (Jennings 2009). Pro představu rozptylu počtu použitých vzorků uvádím validaci typizace HLA-A a -B metodou PCR-SSP, kterou provedl

(Schaffer 2001) za použití 514 vzorků a validaci typizace HLA-DR metodou PCR-SSP, kterou provedl (Adib M. 2004) na 55 vzorcích. Obě validace byly provedeny srovnáním se standardní, na komplementu závislou, mikrolymfocytotoxickou technikou. (Voorter Ch. 2006) validovala stanovení DQA1 metodou SBT za pomoci 21 známých vzorků, které byly použity při EHK, které organizuje University of California, Los Angeles.

4.2. Rozsah validace a verifikace

Primárním cílem validace metody je prokázat správnost vydávaných výsledků. K dosažení tohoto cíle, musí být každý krok pečlivě hodnocen a monitorován, aby se dokumentovala vhodnost metody pro dané vyšetření. Rozsah validace a verifikace záleží na typu metody (AMP 2009). U metod, které se uplatňují v HLA diagnostice, se musí vzít do úvahy jejich charakteristika a účel použití. Vzhledem k tomu, že účelem použití je stanovení HLA fenotypu (identifikace daného HLA znaku), jedná se o metody kvalitativní. Další podstatnou vlastností je, že u těchto metod obvykle není možné ověřit analytické znaky na všech prokazovaných HLA fenotypech.

Validace se v obecných doporučení dělí na validaci analytickou a validaci klinickou. Zatímco analytická validace se zaměřuje na stanovení (v tomto případě identifikaci) daného analytu (HLA fenotypu), klinická validace prověřuje vztah mezi stanovovaným analytem a onemocněním (Jennings 2009). Při HLA typizaci je možné uplatnit pouze validaci analytickou. Mezi ověřované analytické znaky kvalitativních metod patří:

- přesnost (citlivost a senzitivita),
- preciznost (opakovatelnost a mezilehlá preciznost),
- robustnost,
- meze zobrazení a referenční rozmezí,
- interference a
- mez detekce (Jennings 2009).

V případě verifikace jsou nároky na ověření metody nižší a obvykle se ve zkráceném režimu ověřuje pouze přesnost a preciznost.

Pozn.: V této práci zachovávám terminologii danou mezinárodním metrologickým slovníkem (ÚNMZ 2010).

4.3. Přesnost („accuracy“)

Podle metrologického slovníku je přesnost „těsnost shody mezi naměřenou hodnotou veličiny a pravou hodnotou veličiny měřené veličiny“ (ÚNMZ 2010). V molekulární biologii

představuje přesnost velikost shody mezi informací získanou hodnocenou metodou a referenčním standardem (nejlepší dostupná metoda pro stanovení přítomnosti nebo nepřítomnosti předmětu zájmu). U kvalitativních metod se přesnost skládá z těchto parametrů:

- citlivost („Sensitivity“),
- specifická („Specificity“),
- pozitivní prediktivní hodnota („Positive predictive value“, PPV),
- negativní prediktivní hodnota („Negative predictive value“, NPV),
- poměr falešných pozitivit („False-positive rate“) a
- poměr falešných negativit („False-negative rate“) (AMP 2009).

Vzájemný vztah mezi jednotlivými prvky je shrnut v následující tabulce č. 1:

	Prokazovaný HLA znak		
Výsledek testu	Přítomen	Nepřítomen	Celkem
Pozitivní	a	b	e (= a + b)
Negativní	c	d	f (= c + d)
Celkem	g (= a + c)	h (= b + d)	

	Výpočet	Poznámka
Citlivost	a / g	
Specifická	d / h	
PPV	a / e	Uplatňuje se především u klinické validace
NPV	d / f	Uplatňuje se především u klinické validace
Poměr falešných pozitivit	$(a / g) / (b / h)$	
Poměr falešných negativit	$(c / g) / (d / h)$	

Tab. č. 1 Popis vzájemného vztahu mezi jednotlivými prvky přesnosti. Převzato a upraveno z (Jennings 2009).

Jak již bylo výše řečeno, v rámci validace a verifikace metod HLA typizace je vhodné řešit pouze parametry analytické, v případě přesnosti, tedy především citlivost a specifická. Výsledek citlivosti i specifickosti je vydáván v % a ideálně odpovídá 100 %. U sekvenčních metod dosahuje citlivost a specifická obvykle hodnot vyšších než 99 % (Pont-Kingdon 2012). Získané výsledky jsou srovnávány s výsledky získanými „zlatým standardem“ referenční metodou nebo jinou validovanou metodou používanou v laboratoři (AMP 2009).

Problematickou se může jevit validace / verifikace metody SBT, která je sama považována za „zlatý standard“ a je tedy obtížné zvolit srovnávací referenční metodu. V této situaci se doporučuje ověřit, že sekvenace probíhá na požadované úrovni. Faktory, které by měly být u SBT vzaty do úvahy, jsou, zda je nový test schopný zacílit se na oblast zájmu, zda jsou obě alely spolehlivě amplifikovány (např. že se ve vazebných místech primerů nenachází žádná SNP) a že sekvenací získané údaje jsou trvale v odpovídající kvalitě v celé oblasti zájmu (např. sledování PHRED skóre v celé oblasti zájmu, viz kap. 5.3.) (Mattocks 2010).

Podle EFI musí být každá šarže a dodávka činidel testována na citlivost a specifčnost souběžně s alespoň jedním známým vzorkem DNA (EFI 2009). Požadavek amerického akreditačního orgánu je přísnější rozlišuje podmínky ověření nové šarže a nové dodávky činidel. Nová šarže činidel musí být ověřena analýzou referenčního materiálu nebo pomocí paralelního testování s předchozí šarží. Nová dodávka musí prokázat, že činidla nebyla ovlivněna během přepravy analýzou alespoň jednoho již předtím otestovaného nebo bezproblémového vzorku (ASHI 2011). U laboratoří vyvinutých souprav (tzv. in-house nebo home-made metody) musí být každá šarže testována s referenční DNA tak, aby každá sonda byla testována na citlivost a specifčnost alespoň jednou.

Mezi citlivostí a specifčností je inverzní vztah. Při použití přísného cut-off se snižuje počet falešně pozitivních výsledků (zvyšuje se specifčnost) a zvyšuje se pravděpodobnost falešně negativních výsledků (Mattocks 2010).

4.3.1. Citlivost (Sensitivity)

Citlivost je definována jako „podíl změny indikace měřicího systému a odpovídající změny hodnoty veličiny, která je měřena“ (ÚNMZ 2010). U kvalitativních testů v molekulární biologii je analytická citlivost vyjadřována jako schopnost testu detekovat mutaci, když mutace je přítomná. Měla by být získána měřením vzorků nesoucích danou mutaci v replikátech za různých podmínek (např. různý čas, různí operátoři). (AMP 2009). U HLA typizací to znamená schopnost testu prokázat daný HLA fenotyp:

$$\text{Citlivost} = \frac{\text{Skutečně pozitivní}}{(\text{Skutečně pozitivní} + \text{Falešně negativní})}$$

Za „skutečně pozitivní“ vzorek je považován vzorek se správně určeným známým HLA fenotypem nebo sekvenací správně určenou sekvencí ve srovnání s referenční sekvencí. Za „falešně negativní“ je považován vzorek, u něhož nebyl nalezen analyzovaný PCR produkt. K

falešně negativnímu výsledku může dojít v důsledku inhibice reakce nebo přítomnosti varianty uvnitř primeru (buď PCR primeru nebo sekvenačního primeru), která způsobí nenasednutí primeru, preferenční amplifikaci jedné alely nad druhou, nebo rozsáhlou delecí, která není zjištěna sekvenačním testem (Pont-Kingdon 2012).

4.3.2. Specifičnost (Specificity)

Specifičnost udává schopnost metody rozlišit cílovou sekvenci nebo alelu od dalších sekvencí a alel v genomu. Udává také schopnost testu detekovat mutaci bez zkřížené reakce s geneticky podobnými mutacemi (AMP 2009). Vypočítá se podle vzorce:

$$\text{Specifičnost} = \frac{\text{Skutečně negativní}}{(\text{Skutečně negativní} + \text{Falešně pozitivní})}$$

Skutečně negativními vzorky se prověřuje homologie k dalším genům nebo pseudogenům, které mohou interferovat nebo kompetovat s primery. U metody PCR-SSP je skutečně negativním vzorkem vzorek, který obsahuje na 3'konci naamplifikovaného produktu SNP, který znemožňuje nasednutí primeru. Falešná pozitivita může vzniknout díky přítomnosti a analýze pseudogenu obsahujícího variantní sekvenci (Pont-Kingdon 2012).

4.4. Preciznost

Preciznost vyjadřuje těsnost shody mezi naměřenými výsledky získanými opakovanými měřeními stejného vzorku za specifikovaných podmínek, tedy schopnost metody poskytovat stále stejné výsledky. Specifikované podmínky uvádí tabulka č. 2:

Podmínka	Popis (ÚNMZ 2010)	Doporučený počet opakování (Brdička 2007)
Opakovatelnost	Opakování měření stejného vzorku stejným postupem měření, stejnými pracovníky, na stejném měřicím systému, za stejných pracovních podmínek, na stejném místě v krátkém časovém úseku. Dalším názvem je „intra-assay (within-run) opakovatelnost“.	Validace: nejméně 10krát pro 1 vzorek Verifikace: nejméně 6krát pro 1 vzorek
Mezilehlá	Opakování měření stejného vzorku stejným	Validace:

preciznost	postupem měření na stejném místě v různém čase. Možné jsou i další změněné podmínky (jiní pracovníci, jiná šarže reagensů apod.). Dalším názvem je „inter-assay (between-run) opakovatelnost“.	nejméně 10krát pro 1 vzorek Verifikace: nejméně 6krát pro 1 vzorek
Reprodukovatelnost	Opakování měření stejného vzorku na různých místech, různými pracovníky, různými měřicími systémy. Reprodukovatelnost obvykle není možné v podmínkách běžné laboratoře zjistit.	

Tab. č. 2 Specifikované podmínky preciznosti

U PCR-SSP a PCR-SSOP je možné v rámci preciznosti hodnotit dosažení stejného výsledku a dosaženou kvalitu amplifikace. U SBT je možné navíc hodnotit i dosaženou kvalitu sekvenace [např. hodnocení pomocí QV (Quality Value) skóre]. Při opakovatelnosti se doporučuje amplifikovat několik vzorků v triplikátu ve stejném termocykleru a hodnotit kvalitu amplifikace vizualizací PCR produktu v agarózovém gelu. Při mezilehlé preciznosti je několik vzorků testováno ve 3 různých sériích (v různých dnech, různými reagensy) a v různých termocyklerech. Pro snížení ceny je možné jedno z měření opakovatelnosti zahrnout do měření mezilehlé preciznosti (Pont-Kingdon 2012).

4.5. Robustnost

Robustností se ověřuje vnímavost metody na případné drobné odchylky od optimálních podmínek jejího provádění. Tyto odchylky se hodnotí stanovením preciznosti. Mezi běžné odchylky v laboratoři patří:

- preanalytické odchylky (např. jiný typ vzorku – krev odebraná do EDTA nebo heparinátu lithného, podmínky transportu vzorku) a
- analytické odchylky (např. koncentrace DNA, použití různých termocyklerů, polymeráz, restriktáz, různé množství vstupních komponent, různé šarže reagensů a různé podmínky prostředí – vlhkost, teplota).

Vhodné proměnné by měly být zvažovány a ověřovány pro každou konkrétní metodu (Brdička 2007; Jennings 2009).

4.6. Meze zobrazení („reportable range“) a referenční rozmezí

Tyto parametry jsou u metod PCR-SSP a PCR-SSOP pro určování HLA fenotypu z ekonomického (cenová náročnost) a praktického (množství HLA fenotypů) hlediska nepoužitelné. V jistém smyslu je možné je stanovit u metody SBT. Pozn.: U kvantitativních metod je v rámci tohoto parametru stanovována linearita a pracovní rozsah metody.

Cílem ověření mezí zobrazení je stanovit, které všechny výsledky je možné danou metodou získat (např. pozitivní, negativní, homozygot, heterozygot). U SBT však může být mez zobrazení interpretována tak, že se prověří oblast genu, která je zahrnuta do analýzy, zda je díky ní možné rozlišit jednotlivé HLA fenotypy.

Referenční rozmezí v případě HLA fenotypu neexistuje. V rámci tohoto parametru se u SBT doporučuje ověřit referenční sekvence, které jsou používány pro interpretaci výsledků a jejich shodu s doporučenými databázemi (Pont-Kingdon 2012). Takovouto databází je např. <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla>.

4.7. Interference

Interferenci je možné rozdělit na:

- stanovení vlivu interferující látky a
- stanovení přenosu mezi vzorky (AMP 2009).

4.7.1. Vliv interferující látky

Při hodnocení vlivu interferující látky se prověřuje, zda některá z látek, která může být přítomná ve vzorku (nebo se může do vzorku dostat během zpracování), může mít vliv na detekci HLA fenotypu. Prověřuje se, zda tato látka působí selhání reakce, nebo získání nesprávného výsledku. V případě, že se zjistí, že přítomnost interferující látky může způsobit získání nesprávného výsledku, je nutné věnovat velikou pozornost zabránění vlivu této látky. To je možné zajistit např. analýzou známých vzorků, zpracovávaných stejným postupem souběžně s patientskými vzorky (Mattocks 2010).

Možnými zdroji interferujících látek, které by mohly ve vzorku interferovat, jsou:

- odběr vzorku (použité protisrážlivé činidlo),
- nedostatečné množství stabilizačního činidla ve vzorku,
- křížová kontaminace v průběhu zpracování vzorků,
- tkáň jiného než požadovaného původu,

- endogenní látky (např. hemoglobin, cholesterol, triglyceridy, léky, zbytky již zpracovaných vzorků, stabilizační činidla),
- zbytky reagensů jako organická rozpouštědla, promývací roztoky, zbytky solí, heparin apod. (AMP 2009; Mattocks 2010)

Testováním interference by mělo být stanoveno maximální množství potenciálně interferující látky, které neovlivní získané výsledky. Nejčastěji se provádí metodou standardního přídavku, kdy se ke známému vzorku přidává testovaný interferent ve velmi malém objemu, aby nedošlo k významnému naředění matrice vzorku (doporučuje se 9 dílů vzorku pacienta s 1 dílem interferentu). Základní roztok přidávaného interferentu musí být patřičně koncentrovaný (v uvedeném případě desetinásobek přídavku). Současně s tímto vzorkem je stejným způsobem analyzován vzorek bez přídavku interferentu. Test by měl být proveden pro každou používanou vzorkovou matrix (AMP 2009; Friedecký 2010).

4.7.2. Přenos mezi vzorky („carryover“, „cross-contamination“)

Přenos mezi vzorky může být způsoben nedokonalým očištěním pipetovacích špiček nebo přítomností zbytků vzorku z předchozí nebo souběžné analýzy. Mezi běžné opatření pro eliminaci přenosu mezi vzorky je přijetí přísných opatření, např. fyzické oddělení pre- a post-PCR místností jak pro činidla, tak pro laboratorní vybavení (Mattocks 2010). Přenos mezi vzorky může být ověřen analýzou negativních nebo známých kontrolních vzorků.

4.8. Mez detekce

Mezi detekce se rozumí minimální množství DNA, které poskytuje přesný výsledek alespoň v 95 % případů (Jennings 2009). Obvykle se stanovuje ředícím experimentem, kdy se známé množství DNA se známým HLA fenotypem ředí negativním vzorkem (Pont-Kingdon 2012).

5. Interní kontrola kvality

Pro každou metodu musí mít laboratoř kontrolní postupy monitorující přesnost a preciznost celého analytického procesu a tyto postupy musí být dokumentovány. V rámci těchto kontrolních postupů musí vedoucí laboratoře stanovit počet, typ a frekvenci měření kontrolních vzorků tak, aby mohly být detekovány bezprostřední chyby, které mohou nastat selháním systému, nepříznivými podmínkami okolí a výkonem operátora. Počet a frekvence měření kontrolních vzorků by měla splňovat minimálně požadavky doporučené výrobcem soupravy. Mezi základní pravidla interní kontroly kvality patří:

- v každém testu se analyzuje negativní a pozitivní kontrola
- každý kontrolní vzorek musí mít stanovená a ověřena kritéria pro přijetí správného výsledku
- kontrolní vzorky se analyzují stejným způsobem jako vzorky pacientů a stejnými pracovníky, kteří zpracovávají patientské vzorky
- kontrolní vzorky se analyzují minimálně 1x denně, ideálně však s každou sérií vzorků
- kontrolní vzorky jsou analyzovány po změně v činidlech, dodání nové šarže činidel, zásadní preventivní údržbě nebo kritickém zásahu
- všechny problémy a neúspěchy při analýze kontrolních vzorků jsou dokumentovány a hodnoceny. Tam, kde je odhalena příčina, jsou přijata nápravná opatření, aby se předešlo opakování tohoto problému (AMP 2009; EFI 2009; ASHI 2011).

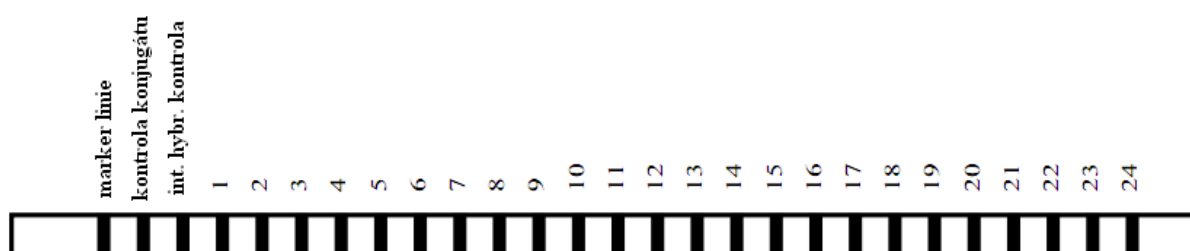
Akreditační orgány také kladou požadavky na udržování dokumentace o kontroly kvality. EFI požaduje, aby laboratoř udržovala dokumentaci o veškeré kontrole kvality včetně identifikovaných problémů a přijatých nápravných opatření minimálně 2 roky a je seznam stálých testů interní kontroly kvality a externího hodnocení kvality minimálně 4 roky (EFI 2009). ČIA vyžaduje, aby tato dokumentace byla uchovávána minimálně po dobu platnosti Osvědčení o akreditaci, tedy alespoň 5 let.

5.1. Kontrola amplifikace

Amplifikace předchází všem třem diskutovaným metodám, tj. PCR-SSP, PCR-SSOP a SBT. Požadavkem (ASHI 2011) a (EFI 2009) je, aby každá amplifikační reakce obsahovala pro každou směs primerů kontrolní vzorky pro odhalení technických selhání. Jedná se jednak o negativní kontrolu neobsahující nukleovou kyselinu a pozitivní kontrolu obsahující např. přídavné primery nebo templáty produkující produkty odlišné od produktu typizace. Jako templát se používá např. gen lidského růstového hormonu a je zároveň kontrolou amplifikace každého vzorku. Získané produkty by měly tvořit na gelu stejně intenzivní fragmenty DNA. Negativní kontrola by na gelové elektroforéze neměla tvořit žádný produkt. V případě pozitivní reakce je možné usuzovat na kontaminaci vzorků. Takové vzorky nelze dále analyzovat a amplifikace se musí opakovat. Pozitivní kontrola by měla také sloužit jako kontrola inhibice reakce, která je významným zdrojem falešně negativních výsledků (ASHI 2011; Pont-Kingdon 2012). Další běžně používanou (a doporučovanou) pozitivní kontrolou je hmotnostní marker v každém gelu (ASHI 2011). Přítomnost produktu pozitivní kontroly a nepřítomnost produktu v negativní kontrole validuje splnění všech podmínek správného provedení PCR reakce.

5.2. Interní kontrola kvality u PCR-SSOP

U metody PCR-SSOP se v rámci interní kontroly kvality analyzuje negativní a pozitivní (známý) vzorek. S výhodou je možné provádět hybridizaci na firemních nylonových membránách, které již pozitivní kontrolní linie obsahují. Např. systém INNO-LiPA obvykle využívá 2 kontrolní linie (viz obr. 5): linii kontroly konjugátu (kontroluje funkčnost systému konjugát-substrát) a linii interní hybridizační kontroly – obsahuje interní sondu ke konzervované oblasti amplifikovaného fragmentu. Test je validní v případě, že obě linie jsou pozitivní (INNOGENETICS 2004).



Obr. 5 INNO-LiPA nylonová membrána pro stanovení HLA-DPB metodou PCR-SSOP. Marker linie určuje pozici membrány. Kontrola konjugátu kontroluje funkčnost systému konjugát-substrát. Int. hybr. kontrola slouží jako kontrola hybridizace amplifikovaného fragmentu. Následuje 24 sekvenčně-specifických DNA sond. Převzato a upraveno z (INNOGENETICS 2004).

5.3. Interní kontrola kvality u SBT

Po amplifikaci se jako interní kontrola kvality u metody SBT používá nejčastěji hodnocení sekvenované konsenzus sekvence, která se nachází v každém vzorku. Toto hodnocení je možné rozdělit na hodnocení kvalitativní a kvantitativní. V rámci kvalitativního hodnocení se porovnává získaná sekvence se sekvencí referenční. Kvantitativní hodnocení využívá tzv. QV hodnoty. QV hodnota (Quality Value) určuje pravděpodobnost, s níž je nukleobáze v sekvenci přiřazena správně.

Přístupů k určení QV hodnoty je několik, nejčastěji se používá tzv. PQV (Phred Quality Value). Tato metoda byla původně vyvinuta jako pomůcka při automatizaci sekvenace DNA v projektu Human Genome Project a poté se stala široce používanou charakteristikou kvality DNA sekvenace. PQV bývá používáno ke srovnání výkonnosti různých sekvenčních metod. Při určení PQV se využívá algoritmus:

$$PQV = -10 \times \log_{10}(PE),$$

kde PE je pravděpodobnost nesprávného přiřazení nukleobáze. $PQV = 40$ znamená, že je pravděpodobnost 1:10000, že nukleobáze byla přiřazena nesprávně. Čím je tedy vyšší hodnota PQV, tím je nižší pravděpodobnost chyby a naopak. PE je určeno na základě mnoha parametrů (intenzita signálu, poměr signál:šum, tvar peaku apod.), které detailně popisuje (Ewing 1998) a (Ewing 1998). (Sayer D.C. 2004) navrhl postup, jak PQV využít pro monitorování vzorků a sérií sekvenací pro odchylku od cílové specifikace (přesnost) a hodnocení variability okolo cílové sekvence (preciznost), což jsou kritéria efektivní kontroly kvality. Ze získaných PQV je možné vypočítat aritmetický průměr (AP) a směrodatnou odchylku (SD), respektive variační koeficient (CV), což jsou základní údaje pro řízení interní kontroly kvality série sekvenace. Podle (Sayer D.C. 2004) AP a SD získaná z PQV konsenzus sekvence všech nukleotidových pozic reflektuje kvalitu sekvenace sekvenovaného vzorku. Dále AP a SD PQV konsenzus sekvence všech nukleotidových pozic všech vzorků v sekvenační sérii reflektuje kvalitu sekvenační série. Na základě získaných dat (AP, SD) je možné kvalitu sekvenace hodnotit podle klasických pravidel používaných při hodnocení interní kontroly kvality kvantitativních metod (např. ± 2 SD, Westgardova pravidla apod.). Analýza dat PQV konsenzus sekvence poskytuje možnost posoudit vliv reagentů a SBT protokolů na kvalitu sekvenačních dat (Sayer D.C. 2004). Mezi další algoritmy určení QV patří např. KB Basecaller firmy Applied Biosystems.

6. Externí hodnocení kvality (EHK)

Každá laboratoř musí být zapojena do systému externího hodnocení kvality (mezilaboratorní porovnávání, zkoušení způsobilosti). V tomto požadavku se shodují všechny akreditační instituce. EHK spočívá v analýze neznámých vzorků, které zasílá jednotlivým účastníkům organizátor EHK a vyhodnocení výsledků organizátorem EHK. Samozřejmostí je, že všechny vzorky jsou zpracovávány rutinním způsobem jako patientské vzorky. Minimální počet vzorků EHK, který doporučuje EFI ročně je u LR i HR metod 10, přičemž správně musí být určeno minimálně 9 vzorků (90 % ze všech testovaných vzorků). Je-li u vzorků použita LR i HR metoda, musí být obě metody analyzovány a hodnoceny nezávisle (EFI 2009; EFI 2010). Vzorky EHK pro HR DNA typizaci musí být hodnoceny minimálně na základě rozdílů v exonech 2 a 3 ve I. třídě a exonem 2 v II. třídě. (EFI 2010), což jsou nejrelevantnější genové oblasti kódující α -helixy a β -skládané listy antigen-vazebného místa (Gabriel Ch. 2011). Jestliže je laboratoř neúspěšná v EHK v jakékoliv metodě, která podléhá akreditaci EFI, laboratoř se musí zúčastnit přídatného programu EHK pro tuto metodu, dokumentovat to ve zprávě vedení a přijmout nápravné opatření (EFI 2010).

Účast v EHK vede k eliminaci chybných výsledků a tím zvyšuje kvalitu a spolehlivost HLA typizace. Dále slouží k:

- ověření výsledků HLA typizace dané laboratoře prostřednictvím srovnání s ostatními účastníky,
- určení těch nejnáročnějších zvláštních typizací a
- posouzení druhu chyby při typizaci – analýza protichůdných a chybných typizací pomáhá v pochopení a odstranění jejich příčin (Bogunia-Kubik 2008).

Mezi nejčastěji využívané organizátory EHK pro oblast HLA typizace patří např. UK National External Quality Assessment Scheme for Histocompatibility and Immunogenetics [UK NEQAS for H&I (<http://www.wtail.org.uk/neqashi.htm>)], který nabízí HLA laboratořím tzv. „Educational (Cell Exchange)“ schéma, ve kterém každý vzorek obsahuje zajímavý nebo raritní fenotyp (N. Bendukidze 2006). Ve Střední Evropě jsou hlavními organizátory EHK Central European Testing (Universitätsklinik für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin, Medizinische Universität Wien) a Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwik Hirszfeld pod patronátem Polské společnosti pro imunogenetiku (Polskie towarzystwo immunogenetyczne). V ČR zajišťuje EHK v HLA typizaci Ústav imunologie FN Olomouc. Výsledky těchto cyklů jednoznačně ukazují signifikantně se zvyšující úspěšnost v HLA typizaci. Jednou z příčin je vyšší používání komerčních souprav, které jsou výrobci plně validovány (Bogunia-Kubik 2008).

7. Závěr

Ve své bakalářské práci jsem se zabýval problematikou kontroly kvality HLA typizace. V dnešní době se jedná o téma, které je na jedné straně velmi diskutované (díky propracovanému systému akreditací a legálnímu požadavku na neustálé zvyšování kvality práce především zdravotnických laboratoří), ale na straně druhé i téma neoblíbené nebo opomíjené [např. učebnice HLA typizace (Hurley 2011) se o použití kontrolních vzorků vůbec nezmiňuje]. Celý proces kontroly kvality (validace, verifikace, interní kontrola kvality a externí hodnocení kvality) je nesmírně pracovně a ekonomicky náročný, jednoznačně zvyšuje cenu jednotlivých vyšetření, ale na druhou stranu zvyšuje přesnost a preciznost jednotlivých stanovení, snižuje pravděpodobnost rejekce transplantované tkáně nebo GvHD a tím se podílí na zvyšování úspěšnosti transplantací a delším poločasem přežití transplantované tkáně (Erlich H.A., Opelz G. et al. 2001).

V současné době existující doporučení pro provádění validace, verifikace, interní kontrola kvality a externí hodnocení kvality jsou (pokud vůbec existují) obecně zaměřeny na metody

molekulární biologie, především pro oblasti detekce extrahumánního genomu nebo pro detekci klinických mutací. Doporučení, která by byla určena přímo specificky pro oblast HLA typizace musí teprve vzniknout.

8. Literatura

Adib M., Y. M., Rezaie A., Solgi G. (2004). "HLA-DR Typing by PCR with SSP Compared to Serological typing." *Journal of Research in Medical Sciences*(4): 255-259.

Allen, M., Liu,L., and Gyllensten,U. (1994). "A comprehensive polymerase chain reaction-oligonucleotide typing system for the HLA class I A locus." *Human Immunology* 40: 25-32.

AMP (2009). *Molecular Diagnostic Assay Validation*. Association for Molecular Pathology Clinical Practice Committee. Bethesda: 1-12.

ASHI (2011). *Standards for Accredited Laboratories, 2011 Revised Standards approved by the ASHI Board of Directors Approved by the CMS: January 27, 2012 Guidance Final Version January 2011; Revised July 2011.*

Bogunia-Kubik, K., Lange, A. (2008). "Development of the HLA proficiency testing for Central and East Europe." *International Journal of Immunogenetics* 35: 409-416.

Brdička, R., Vraná,M., Otáhalová,E., Štambergová,A., Čamajová,J. (2007). "Analytická validace metod molekulární genetiky určených pro analýzu lidského genomu." *Klinická biochemie a metabolismus* 15(36): 58-62.

EFI (2009). *STANDARDS FOR HISTOCOMPATIBILITY TESTING, Version 5.6.1., Accepted by the Standards and Quality Assurance Committee on 17th October 2009, Accepted by the EFI Executive Committee on 18th October 2009, Effective from 1st April 2010.*

EFI (2010). *Standards for LABORATORIES participating in External Proficiency Testing (EPT) Exercises – Version 5.0.: 2.*

These Standards are the minimum criteria required to conform to the accreditation procedures of EFI.

EFI (2010). Standards for PROVIDERS of External Proficiency Testing (EPT) schemes – Version 5.0.

These Standards are the minimum criteria required to conform to the accreditation procedures of EFI.

Erlich H.A., Opelz G., et al. (2001). "HLA DNA Typing and Transplantation." *Immunity* 14: 347-356.

Ewing, B., Green,P. (1998). "Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. II. Error Probabilities." *Genome Research* 8: 186-194.

Ewing, B., Hillier,L,Wendl,M.C.,Green,P. (1998). "Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. I. Accuracy Assessment." *Genome Research* 8: 175-185.

Friedecký, B., Šprongl,L.,Kratochvíla,J.,Plzák,Z. (2010). "Doporučení k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích " *Klinická biochemie a metabolismus* 19(40): 36-44.

Gabriel Ch., S. S., Danzer M., Pröll J. (2011). "What Next? The Next Transit from Biology to Diagnostics: Next Generation Sequencing for Immunogenetics." *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 38(2011): 308-317.

Hurley, C. K. (2011). *DNA Methods for HLA Typing. A Workbook for Beginners.* Washington, DC, C. W. Bill Young Marrow Donor Recruitment and Research Program: 82.

INNOGENETICS (2004, 2004-10-11). "INNO-LiPA HLA-DPB." 25007 v2. from www.veritastk.co.jp/attached/79/E-IGX-LP-HLADPB.pdf.

ISO (2006). ČSN EN ISO 9000 Systémy managementu kvality - Základní principy a slovník. Česká technická norma (ČSN). Praha, Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví.

ISO (2007). ČSN EN ISO 15189 Zdravotnické laboratoře - Zvláštní požadavky na kvalitu a způsobilost. Česká technická norma (ČSN). Praha, Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví.

Jennings, L., Deerlin, V.M., Van, Gulley, M.L. (2009). "Recommended Principles and Practices for Validating Clinical Molecular Pathology Tests." *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 133: 743-755.

Kolesár, L. (2009). *Imunogenetika HLA a non-HLA genů - detekce a význam*. Praha, Institut postgraduálního vzdělávání ve zdravotnictví.

Mattocks, C. J., Morris, M.A., Matthijs, G., Swinnen, E., Corveleyn, A., Dequeker, E., Müller, C.R., Pratt, V., Wallace, A. (2010). "A standardized framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests." *European Journal of Human Genetics* 18: 1276–1288.

N. Bendukidze, S. D., J. Street, L. Hammond, J. Downing, S. Corbin, P. P. J. Dunn, C. Darke (2006). "Identification of a novel HLA-A allele (A*1115) in the UK National External Quality Assessment Schemes for Histocompatibility and Immunogenetics' Educational Cell Exchange." *Tissue Antigens* 67: 153-156.

Petřek, M. (2000). "Hlavní histokompatibilní komplex člověka (HLA) v klinické imunologii: nomenklatura a možnosti laboratorní diagnostiky." *Alergie* 3/2000.

Pont-Kingdon, G., Gedge, F., Wooderchak-Donahue, W., Schrijver, I., Weck, K.E., Kant, J.A., Oglesbee, D., Bayrak-Toydemir, P., Lyon, E. (2012). "Design and Analytical Validation of Clinical DNA Sequencing Assays." *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 136: 41-46.

Saiki, R. K., Bugawan, T.L., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1986). "Analysis of enzymatically amplified β -globin and HLA-DQ α DNA with allele-specific oligonucleotide probes." *Nature* 324: 163 - 166.

Sayer D.C., G. D. M., Christiansen F.T. (2004). "Assign 2.0: software for the analysis of Phred quality values for quality control of HLA sequencing-based typing." *Tissue Antigens* 64: 556–565.

Schaffer, M., Olerup, O. (2001). "HLA-AB typing by polymerase-chain reaction with sequence-specific primers: more accurate, less errors, and increased resolution compared to serological typing." *Tissue Antigens* 58: 299-307.

ÚNMZ (2010). Terminologie z oblasti metrologie. Sborníky technické harmonizace 2010. Praha, Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví: 1-162.

Voorter Ch., B.-L. E. M. v. d. (2006). "Sequence-Based Typing of the Complete Coding Sequence of DQA1 and Phenotype Frequencies in the Dutch Caucasian Population." *Human Immunology* 67(2006): 756-763.