

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Adéla Špulková

VALIDACE / VERIFIKACE DIAGNOSTIK V
ONKOHEMATOLOGICKÉ LABORATOŘI

Validation and Verification of Diagnostics in
Onco-hematological Laboratory

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Petr Man, Ph.D.

Praha 2013

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s projektem (Ministerstva zdravotnictví) koncepčního rozvoje výzkumné organizace 00023736 (IČ).

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 1.9.2013

Podpis:

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu bakalářské práce panu RNDr. Petru Manovi, PhD. za jeho pomoc při vyhledávání zdrojů k této práci, za rady a konzultace, kterými mi při jejím psaní pomohl. Dále bych ráda poděkovala paní Ing. Věře Šiffnerové a Mgr. Haně Čechové z Ústavu hematologie a krevní transfúze v Praze za jejich pomoc při zpracovávání (především) experimentální části této práce. V neposlední řadě bych také ráda poděkovala své rodině, která mě po celou dobu studia podporovala jak morálně, tak i finančně.

Abstrakt

Se současným vývojem společnosti se rozvíjí i veškeré oblasti vědy a nejen jí. Jsou tak kladeny čím dál tím větší požadavky na práci lidí, na používané metody a techniky. Neustále se objevují nové léky, nové postupy při diagnostice. S tím vším souvisí i potřeba ověřovat, zda vše funguje tak, jak má, zda měření plní požadavky, které jsou na něj kladené. K tomuto účelu je tedy třeba vše validovat/verifikovat. Validace metod je zároveň jedním z požadavků norem ISO.

Validace/verifikace, konkrétně diagnostik v onkohematologické laboratoři, je tématem této bakalářské práce. Ta se v teoretické části věnuje vymezení základních pojmů souvisejících s molekulární genetikou, imunitním systémem a prací v klinické laboratoři, včetně používaných metod. Experimentální část je zaměřena na využití validace v praxi, a to akreditovanou laboratoří Ústavu hematologie a krevní transfúze. Hlavními cíly byla validace nových kitů HLA- SuBiTo, validace kitu PowerPlex® CS7 System a validace bílelického sekvenčního polymorfismu G42863. Každý z těchto stanovených cílů byl specifický a byl proveden s odlišným účelem a postupem, čímž se potvrdilo, že validace (verifikace) je nedílnou součástí práce v klinických laboratořích a její využití je velice rozmanité.

Klíčová slova

Alela, deoxyribonukleová kyselina, hlavní histokompatibilitní systém, chimérismus, polymerázová řetězová reakce, sekvenace, validace, verifikace

Abstract

As our society evolves, all of the scientific fields evolve as well. Thanks to this phenomenon, the demands on peoples' work, methods and techniques increase. New drugs and new diagnostic procedures are developed constantly. Consequently, there exists a need to authenticate all the procedures to ensure that everything works as it is supposed to and that the measurements meet the requirements. Therefore, every procedure has to be validated or verified. Validation is also one of the requirements of ISO's international standards.

This bachelor thesis' topics were validations and verifications of diagnostic procedures in oncohematologic laboratory. The theoretical part is dedicated to defining the basic terms related to molecular genetics, the immune system and to work in clinical laboratory. The experimental part describes the use of validation in practice as performed in the accredited laboratory at the Institute of Hematology and Blood Transfusion.

The main objectives of the thesis were validations of kits HLA – SuBiTo, PowerPlex® CS7 System and validation of biallelic sequence polymorphism G42863. Each of the objectives was specific and was conducted with a different purpose. As a result, it was confirmed that validation and verification is integral element of work in clinical laboratories and its use is very diverse.

Key Words

Allele, deoxyribonucleic acid, major histocompatibility complex, chimerism, polymerase chain reaction, sequencing, validation, verification

Obsah

Seznam zkratk	8
1. Teoretická část.....	11
1.1 Úvod	11
1.2 Základy molekulární genetiky.....	11
1.2.1 DNA	11
1.2.2 Dědičnost.....	13
1.2.3 Polymorfismus	14
1.2.4 Chimérismus.....	14
1.3 Imunitní systém	15
1.3.1 Hlavní histokompatibilitní systém	16
1.3.2 HLA systém a transplantace.....	20
1.3.3 Asociace antigenů HLA systému s chorobami	22
1.4 Techniky	22
1.4.1 Elektroforéza	22
1.4.2 Polymerázová řetězová reakce.....	23
1.4.3 Sekvenování	26
1.5. Ústav hematologie a krevní transfúze	26
1.6. Práce v klinické diagnostické laboratoři	27
1.6.1 Validace.....	30
1.6.1.1 Proces validace	30
1.6.2 Verifikace	32
2. Cíle práce.....	33
3. Experimentální část	34
3.1 Použité přístroje.....	34
3.2 Použité softwary	34
3.3 Použité chemikálie	34
3.4 Použité enzymy	35
3.5 Použité kity.....	35
3.6 Použité roztoky.....	36
3.7 Použité metody	36

3.7.1 Validace kitů SuBiTo	36
3.7.2 Validace kitu PowerPlex® CS7 System	40
3.7.3 Validace sekvenčního polymorfismu G42863	42
4. Výsledky.....	44
4.1 Validace kitů HLA SuBiTo.....	44
4.2 Validace kitu PowerPlex® CS7 System	46
4.3 Validace bodového polymorfismu	48
5. Diskuze.....	49
6. Závěr.....	51
Příloha A.....	57

Seznam zkratek

A	adenin
alHSCT	alogenní transplantace hematopoetických buněk
APC	antigen prezentující buňka; z <i>anglického Antigen Presenting Cell</i>
BALT	lymfoidní tkáň spojená s průduškami; z <i>anglického Bronchial-Associated Lymphoid Tissue</i>
BCS	base calling score, hodnota udává čistotu sekvence
bp	páry bází; z <i>anglického base pairs</i>
C	cytosin
CC	kompletní chimérismus; z <i>anglického Complete chimerism</i>
CRM	certifikovaný referenční materiál
Ct	threshold cycle; cyklus, ve kterém fluorescence překročí hodnotu pozadí
ČIA o.p.s.	Český institut pro akreditaci, obecně prospěšná společnost
DNA	deoxyribonukleová kyselina; z <i>anglického Deoxyribonucleic acid</i>
DTP	deoxyribonukleotid trifosfát; z <i>anglického Deoxyribonucleotid triphosphate</i>
ddNTP	dideoxyribonukleotid trifosfát; z <i>anglického Dideoxyribonucleotid triphosphate</i>
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EFI	Evropská organizace pro imunogenetiku; z <i>anglického European federation for immunogenetics</i>
FN	falešná negativita; z <i>anglického False Negativity</i>
FP	falešná pozitivita; z <i>anglického False Positivity</i>
G	guanin
g.p.	genotyp pacienta
GvHD	reakce pacienta proti štěpu dárce; z <i>anglického Graft versus host disease</i>
HLA	hlavní histikompatibilitní systém člověka; z <i>anglického</i>

Human Leukocyte Antigens

HSCT	hematopoetická transplantace kmenových buněk; <i>z anglického Hematopoetic Stem Cell Transplantation</i>
ILS	molekulový velikostní standard; <i>z anglického International Lane standard</i>
IS	imunitní systém
ISO	mezinárodní organizace pro standardizaci; <i>z anglického International Organization for Standardization</i>
IVD MD	zařízení, vyráběné a dodávané k posuzování stavu zdraví chorob populace; <i>z anglického In vitro diagnostic-medical device</i>
IVD s CE	deklarace shody; <i>z anglického In vitro diagnostic- CE</i>
JCI	akreditační organizace; <i>z anglického Joint Commission International</i>
MALT	lymfoidní tkáň spojená se sliznicemi; <i>z anglického Mucosal- associated lymphoid tissue</i>
MC	smíšený chimérismus; <i>z anglického mixture chimerism</i>
Mc	mikrochimérismus
MHC	hlavní histokompatibilitní systém; <i>z anglického Major Histocompatibility Complex</i>
mRNA	messenger RNA
NTC	kontrolní vzorek bez templátu; <i>z anglického no template control</i>
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PCR	polymerázová řetězová reakce; <i>z anglického Polymerase Chain Reaction</i>
RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů; <i>z anglického Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA	ribonukleová kyselina; <i>z anglického Ribonucleotide acid</i>
rRNA	ribozomální ribonukleová kyselina
SBT	metoda přímého sekvenování; <i>z anglického Sequence Based Typing</i>

SNP	jednonukleotidový polymorfismus; z <i>anglického Single Nucleotide Polymorphism</i>
SOP	standardní operační postup
STR	mikrosatelitní DNA; z <i>anglického Short Tandem Repeats</i>
T	thymin
TAE	pufř Tris-Acetate-EDTA
TN	pravá negativita; z <i>anglického True Negativity</i>
TP	pravá pozitivita; z <i>anglického True Positivity</i>
tRNA	transferová RNA
VNTR	minisatelitní DNA; z <i>anglického Variable Number of Tandem Repeats</i>

1. Teoretická část

1.1 Úvod

Klinická diagnostika je dnes ve velké míře založena na analýze DNA a molekulárních technikách. Použití těchto technik jako diagnostických metod je poměrně mladou záležitostí, díky které můžeme najít rozdíly v sekvencích DNA, identifikovat polymorfismy, objasnit příčiny chorob.

Tato kapitola přibližuje teoretický základ, z něhož se poté vycházelo v části experimentální.

1.2 Základy molekulární genetiky

Během posledních několika let se genetika rapidně vyvíjí. Jsme schopni analyzovat DNA do i těch nejmenších detailů pomocí nejnovějších technik. Rozlišujeme genetikou klasickou, genetiku populací a molekulární genetiku.¹

Molekulární genetika studuje dědičnost na molekulární úrovni. Díky znalostem, které máme o sekvencích DNA, můžeme gen definovat z chemického hlediska či můžeme identifikovat jednotlivé součásti genu.¹

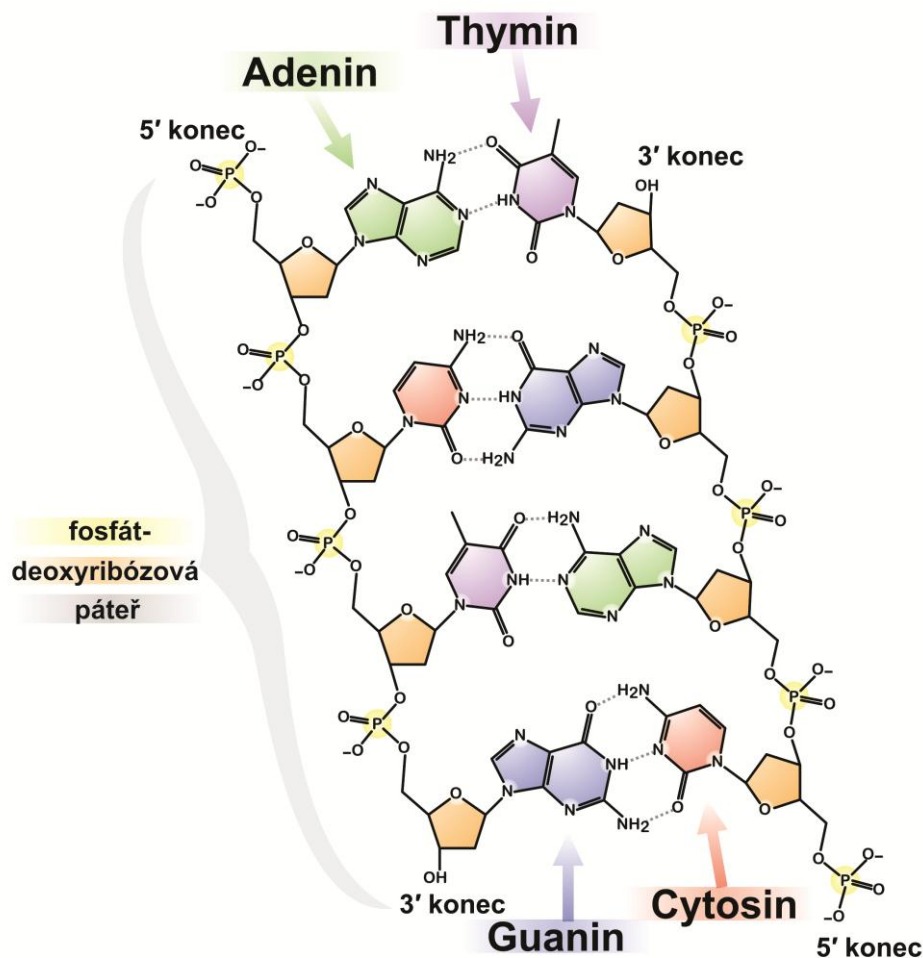
1.2.1 DNA

Kyselina deoxyribonukleová se nachází se v jádře a v semiautonorních organelách. Je nositelkou genetické informace a jejím nejčastějším uspořádáním jsou dvojité řetězce-vlákna mající helikální uspořádání.²

Každé vlákno DNA molekuly je lineárním uspořádáním opakujících se jednotek známých jako nukleotidy. Nukleotid se skládá z: cukru (deoxyribosy), fosfátu a dusíkatých bází. Dusíkatými bázemi jsou Adenin — A, Guanin — G, Thymin — T a Cytosin — C.³ Na střídání těchto dusíkatých bází je založeno uložení genetické informace.⁴ Zbylé složky, tzn. fosfát a deoxyribosa, se podílejí na prostorové stavbě molekuly.¹⁰ Báze jsou vázány N-β-glykosidovou vazbou na C1' pentos. Pentosy jsou pak s fosfátem spojeny fosfodiesterovou vazbou, přičemž fosfát váže 5' konec jedné pentosy s 3' koncem následujícího cukru.⁴ Cukr spojený s bází (bez fosfátu) se nazývá nukleosid.¹⁰

Molekuly bází jsou orientovány do nitra šroubovice a jsou vzájemně spojeny

vodíkovými vazbami na principu komplementarity bází, kdy A se páruje s T a C se páruje s G (obr. 1), molekuly deoxypentos jsou pak orientovány pod pravým úhlem vůči bázím.²



Obr. 1 *Struktura DNA.* Nukleotidy jsou spojené fosfodiesterovou vazbou, jednotlivá vlákna DNA jsou spojena přes vodíkové vazby bází, kdy guanin je spojen s cytosinem třemi vodíkovými vazbami, adenin a thymin dvěma vodíkovými bázemi. (Převzato a upraveno z 9)

Hlavní význam DNA spočívá v tom, že je v ní zakódovaná primární struktura proteinů. Dále je v ní informace o transkripci pro rRNA, tRNA, formování chromozomů, či replikaci DNA.⁵

DNA je v jádře buňky uložena v útvarech, které se nazývají **chromozomy**.¹ Jedná se o fakultativně kondenzovanou DNA o definované délce.

Segment DNA, jehož informace jsou exprimovány buď jako RNA molekula

nebo jako polypeptidový řetězec se nazývá **gen**. Geny eukaryotických organismů obsahují exony a introny. Exony jsou části genové sekvence projevující se při zpracování mRNA, jedná se o geny kódující. Introny jsou pak nekódujícími součástmi genů.⁶

Konkrétní místo na chromozomu, kde se nachází gen, nazýváme **lokus**. Konkrétní forma genu se označuje jako **alela**.⁶

Soubor všech genů buňky či jedince organismu se nazývá **genom**.¹ U eukaryot je tvořen těmito sekvencemi:⁴

- a) Strukturální geny — tyto geny obsahují informaci pro stavbu bílkovin, obvykle jsou složeny z exonů a intronů.⁵
- b) Geny řídící syntézu ribozomální RNA a transferovou RNA
- c) Regulační sekvence — od těchto sekvencí jsou zahajovány, ukončovány, zesilovány či zeslabovány určité děje během replikace, transkripce a translace.
- d) Pseudogeny — nalezneme je v genových rodinách strukturálních genů, oproti nim jsou však nefunkční
- e) Repetitivní sekvence — sekvence, u nichž se opakují motivy pořadí bází⁴

1.2.2 Dědičnost

Dědičnost je jedním z hlavních témat, kterým se zabývá genetika. Zájem roste především o výzkum geneticky podmíněných chorob, kdy se díky dědičnosti snažíme objasnit mechanismus jejich vzniku a pravděpodobnost jejich dědění z rodičů na potomky.⁷

Základy tomuto oboru položil Gregor Mendel, a to díky jeho experimentům s křížením různých druhů hrachu, díky nimž můžeme zjednodušeně říci, že se nedědí znaky jako takové, ale cosi, co vznik těchto znaků podmiňuje. Podstatnou roli zde hrají geny neboli vlohy. Soubor genů se nazývá genotyp, jehož vyjádřením je pak fenotyp. U diploidních organismů pak nalezneme každý gen v buňce ve dvou párových alelách, přičemž u homozygotů jsou alely shodné (např. aa, AA) a u heterozygotů rozdílné (Aa).⁷

Gregor Mendel je rovněž autorem zákonů dědičnosti - Mendelových zákonů. Prvním zákonem je zákon uniformity hybridů první generace. Druhým zákonem je zákon štěpení. Třetím zákonem pak zákon nezávislé distribuce faktorů.⁷

Základem genetického vyšetření je genealogie. Zajímají nás příbuzenské vztahy, zjištění pohlaví postižených i nepostižených osob a data o nich. K tomuto používáme symboliky v tzv. genealogickém schématu. Rozlišujeme autozomální typ dědičnosti (geny jsou vázány na autozomy) a gonosomální typ dědičnosti (geny jsou vázány na gonosomy neboli pohlavní chromosomy).⁷

1.2.3 Polymorfismus

Za geneticky polymorfnní je považován znak s nejméně dvěma geneticky podmíněnými variantami v jedné populaci, které se nachází ve frekvenci alespoň 1%. Rozlišujeme polymorfismy DNA, polymorfismus biochemický, imunologický a morfologický.²³

V případě polymorfismů DNA je dále rozdělujeme na polymorfismy bodové a délkové.

a) Bodové polymorfismy — při tomto polymorfismu dochází ke změnám v sekvenci bazí. Do těchto polymorfismů patří tzv. Single Nucleotide Polymorphism (SNP)²³ Speciální podskupinou SNP jsou pak polymorfismy délky restrikčních fragmentů zkráceně RFLP, které vznikají štěpením DNA sekvence restrikčními endonukleázami.²⁴

b) Délkové polymorfismy — u délkových polymorfismů se alely liší délkou opakování repetit. ¹⁸ Mezi délkové polymorfismy řadíme tzv. Variable Number of Tandem Repeats, zkráceně VNTR (můžeme se setkat i s pojmem minisatelity) a Short Tandem Repeats, zkráceně STR (můžeme se setkat s pojmem mikrosatelity).²⁰ STR se skládají z di, tri nebo tetranukleotidových repetitivních sekvencí rozdělených skrz genom s frekvencí asi 1-10 kb a jedná se o repetitivní úseky DNA, které je jednoduché neamplifikovat pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR).^{20,29}

Sekvence polymorfnní DNA se mohou použít pro určení alelické dědičnosti chorob způsobených genem či k testování identity.²⁹ K jejich rozboru můžeme použít metody přímé k zjištění sekvence variabilní DNA a metody nepřímé, díky kterým můžeme získat profil DNA.³¹

1.2.4 Chimérismus

Chimérismus je jev, kdy organismus obsahuje buňky se dvěma i více rozdílnými genotypy.¹³ Jednou z jeho možných příčin je i alogenní transplantace.¹²

DNA každého jedince je unikátní a jedinečná, je tvořena souborem vysoce variabilních polymorfismů DNA. Na základě porovnání DNA dárce a příjemce můžeme najít vhodné DNA polymorfismy, díky nimž jsme schopni odlišit buňky jedince. Význam chimérismu je v mnoha ohledech nenahraditelný. Můžeme díky němu sledovat, jak se přihouje štěp, aktivitu alogenní krvetvorby, známky autologní repopulace a možná rizika relapsu onemocnění. (osobní sdělení, Mgr.Hana Čechová)

Vyšetření informativity znamená, jaké polymorfní lokusy DNA se budou vyšetřovat u pacienta po alogenní transplantaci hematopoetických buněk. Jedná se o lokusy, u kterých jsme schopni rozlišit genotyp dárce a genotyp příjemce. Pro toto vyšetření je nutné odebrat pacientovi před alogenní transplantací hematopoetických buněk (alHSCT) a jeho dárci vzorek periferní krve. Je žádoucí provést odběr ve stavu dostatečné buněčnosti krve pacienta, tj. ještě před zahájením přípravného režimu transplantace. V případě, že nebylo možné zajistit vyšetření informativity u pacienta před alHSCT, odebere se pacientovi po alHSCT primární vzorek, který neobsahuje krevní, či krvetvornou tkáň (stěr buněk vnitřní strany dutiny ústní – bukální sliznice, či nehty). U dárce je tento vzorek nahrazen výplachem transplantačního vaku obsahujícího zbytky převáděných hematopoetických kmenových buněk.²⁶

Monitoring chimérismu je proveden tak, že se v dané časové posloupnosti odebírají pacientovi po alHSCT vzorky periferní krve nebo kostní dřeně. K úspěšnému vyšetření je třeba, aby vzorek obsahoval dostatečné množství jaderných buněk. (minimálně $1,5 \times 10^6$ leukocytů/ml). V ideálním případě nacházíme u pacienta pouze genotyp dárce.²⁶

1.3 Imunitní systém

Imunitní systém je soustava skládající se z velkého počtu specializovaných buněk, tkání a molekul, která zajišťuje obranyschopnost jedince vůči změnám. Tyto změny mohou být vyvolány překonáním vývojových stupňů v embryogenezi, nádorovou transformací vlastních buněk, mutacemi, stárnutím, vlivem vnějších faktorů (paraziti, toxická xenobiotika, ultrazvuk).¹⁴

VLASTNOSTI

Imunitní systém není tvořen jasnou ohraničenou strukturou, ale jeho složky jsou

součástí krve, lymfy či jsou usazené v lymfatických orgánech. Imunitní systém dokáže rozpoznat vlastní, cizí nebo odcizené (zničené nádorovým růstem či pozměněné vlastní) molekuly neboli antigeny. Nevlastní antigeny dokážou v imunitním systému vyvolat imunitní reakci, při které dochází k tvorbě protilátek, cytokinů nebo buněk zajišťujících imunitní odpověď. Oproti tomu vlastní antigeny imunitní reakci nevyvolávají s výjimkou tzv. autoantigenů, které vyvolávají autoagresivní reakce. V případě nepřiměřených reakci dochází ke vzniku imunodeficiencie a v případě nadměrných reakcí pak ke vzniku alergických či hypersenzitivních stavů.¹⁴

Kromě imunitní odpovědi, zajišťuje IS i tzv. imunologickou paměť, díky které je systém schopen pohotověji reagovat na opětovný kontakt s antigenem.¹⁴

STRUKTURA

Do struktury imunitní soustavy zahrnujeme

a) buňky a tkáň IS – K buňkám IS řadíme buňky, které přímo patří IS, tzn. leukocyty a dále buňky pomocné, které nepatří přímo do IS, ale jsou součástí jiných systémů, např. krevní destičky, červené krvinky, endotelové buňky. Buňky mohou pracovat jednotlivě nebo se shlukovat do lymfoidní tkáň, které pak vytváří lymfoidní orgány. Primárními lymfoidními orgány jsou thymus a kostní dřev. Sekundární lymfoidními orgány mohou být opouzdřené (lymfatické uzliny a slezina) nebo neopouzdřené (MALT – lymfoidní tkáň spojená se sliznicemi, BALM – lymfoidní tkáň spojená s průduškami).¹⁴

b) molekuly IS – molekuly imunitního systému plní výkonnou funkci spočívající v obraně a regulační funkci, která zajišťuje regulaci průběhu imunitních reakcí a spolupráci tohoto systému s ostatními systémy. Mezi molekuly IS patří protilátky, cytokiny, imunohormony, komplementový systém, HLA molekuly, receptory.¹⁴

1.3.1 Hlavní histokompatibilitní systém

Hlavní histokompatibilitní systém, označovaný jako MHC (Major Histocompatibility Complex), je soubor molekul, zajišťujících na povrchu buněk prezentaci antigenů. U člověka je tento systém také označován jako HLA, z anglického Human Leukocyte Antigen, neboli „lidské leukocytové antigeny“. Jsou kódovány

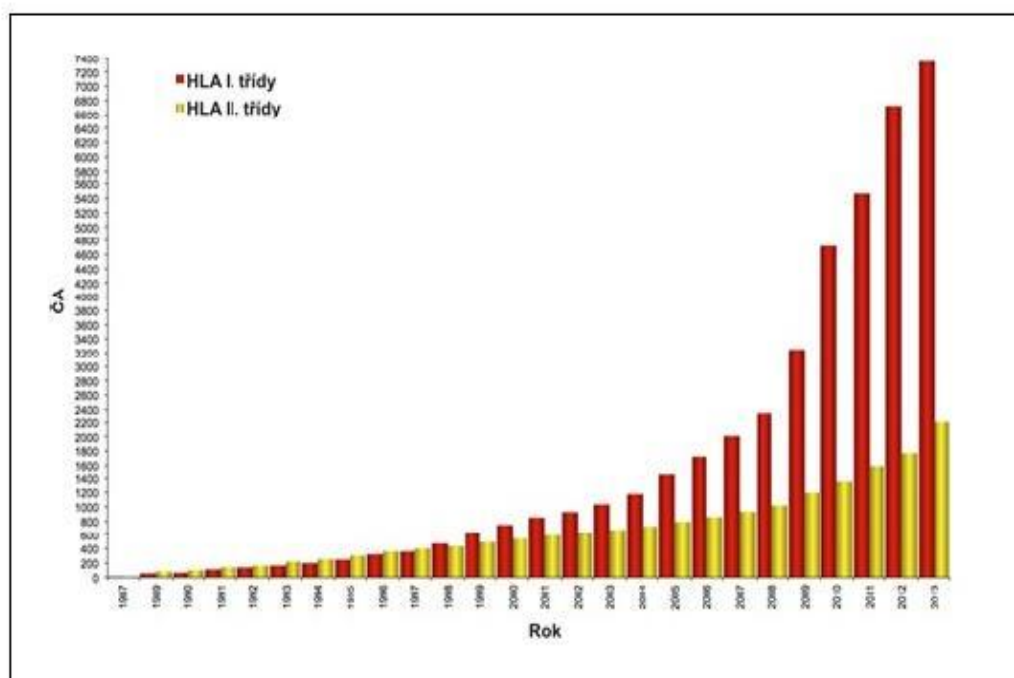
soustavou genů nacházejících se na krátkém rameni 6. chromozomu.¹⁴ Produkty těchto genů zajišťují prezentaci antigenů a hrají důležitou roli v přihojení či odvržení transplantovaného orgánu či transplantované tkáně.¹⁹

CHARAKTERISTICKÉ RYSY HLA SYSTÉMU

Prezentuje antigeny, díky tomu jsou u MHC I naše vlastní buňky rozeznány jako zdravé (nemocné, prezentují-li špatně) a u MHC II je zajištěna imunitní odpověď díky antigen prezentujícím buňkám. HLA systém je komplexní, polymorfní. Dalšími charakteristickým znakem je vazebná nerovnováha, přítomnost „širokých specifit“ a křížové reakce. U bělochů, černochů a příslušníků orientálních skupin nalezneme rozdílné genové i holotypové frekvence.¹⁷

GENY HLA

HLA-systém v sobě zahrnuje více než 200 odlišných genů. Ty jsou velmi polymorfní, proto v populaci nacházíme větší množství jejich alel (viz obr. 2).¹⁴



Obr. 2 - Graf vyjadřující nárůst počtu alel od roku 1987 do března roku 2013. ČA = číslo alely (Převzato z 39)

Na lokusech A, B a C mají geny I. třídy maximálně dvě odlišné alely, a to od otce a od matky. Z toho vyplývá, že na jedné buňce je prezentováno nejvýše šest různých molekul. U HLA II. třídy může dojít ke kombinaci řetězce α a β . Buňka proto může nést 10-20 odlišných molekul HLA.¹⁹

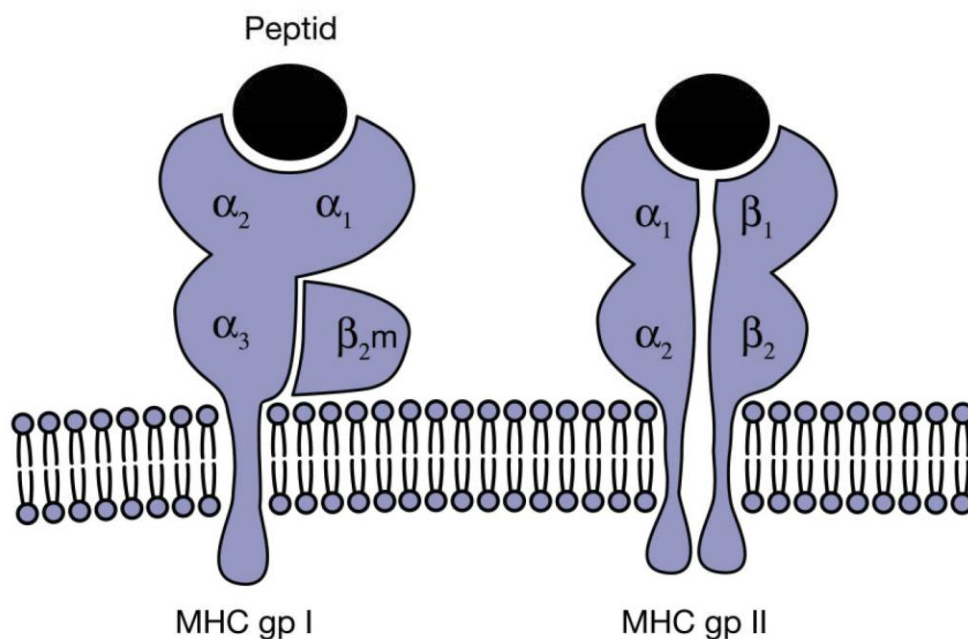
Specifickou kombinací alel lokusů HLA systému v rámci jednoho chromozomu nazýváme HLA haplotyp. Jedinec nese jeden haplotyp otcovský a jeden mateřský. V souvislosti s transplantacemi pak platí, že sourozenci můžou být: a) HLA identičtí (zdědí stejný haplotyp od otce i od matky); b) haploidentičtí (mají shodný pouze jeden haplotyp); c) zcela rozdílní (zdědí jiný haplotyp).¹⁹

ANTIGENY HLA

HLA systém zahrnuje mnoho různých variant. Rozlišujeme antigeny I. a II. třídy.

Mezi antigeny I. třídy patří HLA-A, HLA-B, HLA-C, jež jsou klasickými HLA-antigeny. Mimo ně patří do této třídy i neklasické HLA-antigeny, kterými jsou HLA-E, HLA-H a HLA-G.¹⁴ Skládají se z těžkého řetězce α spojeného s lehkým řetězcem β 2-mikroglobulinu. Řadíme je mezi glykoproteinové molekuly vyskytující se na povrchu jaderných buněk.¹⁹

Mezi antigeny II. třídy patří HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP. Tyto molekuly řadíme mezi heterodimery dvou těžkých řetězců α a β . Nalezneme je na povrchu B-lymfocytů, makrofágů či dendrických buněk. (viz obr. 3, str. 19)¹⁹



Obr. 3 Znárodnění struktury MHC glykoproteinů. Vlevo: struktura MHC I složená z řetězce α a β_2 -mikroglobulinu. V α řetězci můžeme rozlišit tři domény α_1 , α_2 a α_3 . Vpravo: struktura MHC II složená ze dvou těžkých řetězců α a β . Černý ovál je prezentovaný peptid. (převzato z 27)

NOMENKLATURA

V současné době se používá následující nomenklatura :

HLA-A*02:01:01:02N

HLA – předpona

A – lokus

02 (první dvojčíslí za *) – alelická skupina

01 (druhé dvojčíslí) – specifický HLA protein, udává, v jakém pořadí byly sekvence determinovány.

01 (třetí dvojčíslí) – vyjadřuje záměnu nukleotidů bez změn aminokyselinové sekvence

02 (čtvrté dvojčíslí) – používá se u alel, které se liší sekvencí polymorfismů v intronech nebo v 5' a 3' nepřekládaných oblastech, které lemují exony a introny

N – přípona používaná k rozlišení změn v expresi genu ¹⁶

HLA TYPIZACE

V rámci HLA typizace (nalezení HLA typu) rozlišujeme typizaci sérologickou a molekulárně-genetickou.¹⁹

a) Sérologická typizace - využívá se k typizaci HLA I. třídy. Mezi tento druh typizace patří mj. lymfocytotoxický test, jehož základem je reakce protilátek s antigenními determinantami molekul HLA prezentovaných na povrchu lymfocytů.¹⁹

b) Molekulárně-genetická typizace - využívá metod analýzy DNA. Oproti serologické typizaci je to proces spolehlivější s vyšším rozlišením. K HLA typizaci se v dnešní době v klinické laboratoři rutinně využívají komerční kity. V souvislosti s počtem použitých sad oligonukleotidových sond se odvíjí i stupeň rozlišení. V první řadě se aplikuje sada k nízkému rozlišení, tzv. low resolution, odpovídající serologickým specifikám. Pro vysoké rozlišení, tzv. high resolution, týkající se především transplantace hematopoetických buněk (HSCT), se provádí typizování specifity na alelickou úroveň.¹⁹

1.3.2 HLA systém a transplantace

HLA hraje důležitou roli při transplantacích. Jedná se o nejsilnější systém transplantačních antigenů, který je odpovědný za transplantační reakci a reakci štěpu proti hostiteli.¹⁷ Již dříve bylo prokázáno, že tkáň, která je přenesena z jednoho jedince na druhého je v některých případech po určité době odloučena. Zkoumáním tohoto jevu u myši bylo zjištěno, že důvodem takovéto neslučitelnosti, je rozdíl v antigenech přítomných na buňkách normálních a nádorových, jež je možné prokázat sérologicky. Díky tomuto objevu tak byla analýza tkáňové neslučitelnosti rozpracována ve velkém rozsahu a spolu s objevem imunologické tolerance a zjištěním, že dochází k urychlenému odhojení druhého štěpu, je-li jeho dárcem stejný dárcem jako v případě prvního štěpu, byl tak dán základ imunogenetického chápání neslučitelnosti po alotransplantaci.¹⁷

U transplantace musíme rozlišovat, jedná-li se o transplantaci orgánů nebo transplantaci hematopoetických buněk. V případě transplantace orgánu je třeba zabývat se problémem reakce imunokompetentních buněk pacienta, tedy příjemce proti alogenním buňkám štěpu. Terapie tak směřuje k tlumení reaktivity lymfocytů pacienta.

U transplantace hematopoetických kmenových buněk dochází ke snížení a utlumení funkce lymfocytů pacienta a existuje reakce imunokompetentních buněk dárce vůči tkáním pacienta, tzv. graft versus host disease (GvHD) ¹⁹

TRANSPLANTACE ORGÁNŮ

Při transplantaci orgánů je vždy vyšetřena krevní skupina teoretického dárce a příjemce. HLA typizace je poté odlišná s ohledem na transplantovaný orgán. U transplantací ledvin se jedná o lokusy HLA-A, HLA-B, HLA-DR. Menší význam hraje HLA typizace u transplantace srdce, plic, pankreatu a střeva. U transplantace jater a rohovky není třeba vůbec zjišťovat shodu v antigenech, protože jsou velmi málo imunogenní. Mezi další vyšetření pak patří určení stavu senzitivizace příjemce, které slouží ke zjištění přítomnosti anti-HLA protilátek. Sérum pacienta je při něm inkubováno s panelem alogenních lymfocytů. Nutným testem je pak také křížová zkouška (cross-match), při které je sérum těsně před transplantací inkubováno s lymfocyty dárce. V případě, že je reakce pozitivní, je to důvod k odmítnutí transplantace, protože v těle pacienta jsou přítomny protilátky proti aloantigenům dárce. ¹⁹

TRANSPLANTACE HEMATOPOETICKÝCH BUNĚK

Tento typ transplantace (HSCT= hematopoietic stem cell transplantation) je prováděn hlavně u maligních poruch krvetvorby (leukémie), vybraných solidních nádorů, útlumů kostní dřeně (aplastická anémie) a závažných primárních imunodeficiencí. Hlavním cílem je obnovit krvetvorbu. Je zde vyžadována vysoká shoda HLA systému, a to na úrovni alel. HLA typizace až na úroveň vysokého rozlišení (high resolution, používá se značení alel pomocí čtyřčíslí), při níž se používají metody molekulární genetiky. ¹⁹

Upřednostňují se HLA shodné sourozenské transplantace. Prokáže-li se, že budoucí dárce a pacient zdědily stejný mateřský i otcovský haplotyp, není třeba, aby byla typizace tak podrobná. Nenajde-li se dárce v rodině, je třeba k nalezení HLA identického dárce využít národní i mezinárodní registry dárců kostní dřeně. Provádí se typizací genů HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1, často také HLA-C, HLA-DRB3, HLA-DRB4, HLA-DRB5 a HLA-DQB1. ¹⁹

1.3.3 Asociace antigenů HLA systému s chorobami

Na základě provedení HLA typizace většího množství pacientů s rozličnými nemocemi se zjistilo, že určité alely se u pacientů s danou chorobou objevují častěji než u zdravých jedinců. Nejtypičtějšími chorobami jsou ty, u nichž má podstatný význam imunitní systém. HLA antigeny jsou vrozené, proto je nutné podotknout, že u lidí s určitými HLA antigeny se vyskytuje větší riziko vzniku těchto chorob, na jejímž rozvoji se však podílí i další faktory, jak genetické, tak faktory prostředí. Mezi tyto onemocnění patří např.: Bechtěrevova nemoc (antigen HLA-B27), revmatoidní artritida (HLA-DR4) nebo celiakie (HLA-DR3) ¹⁹

1.4 Techniky

Tato kapitola je věnována základním metodám, které byly použity v praktické části.

1.4.1 Elektroforéza

Elektroforéza patří mezi elektromigrační metody. Ty jsou založeny na schopnosti nabitých částic pohybovat se v elektrickém poli. Mohou být využity jak pro analytické tak i pro preparativní účely. ²¹

Existuje celá řada elektromigračních metod lišících se od sebe způsobem práce a principem, na kterém separace funguje. Můžeme je provádět na nosičích nebo ve vodných roztocích pufrů. Používají se metody, jejichž separace je založena na velikosti molekul a/nebo náboji. Mezi nejpoužívanější elektromigrační metody patří: volná elektroforéza, elektroforéza na nosičích, elektroforéza v polyakrylamidovém gelu ((PAGE), elektroforéza v gradientovém gelu, SDS elektroforéza, isoelektrická fokusace, dvojrozměrná elektroforéza či kapilární elektroforéza. ²¹ V praktické části této práce byla použita elektroforéza v agarózovém gelu a kapilární elektroforéza.

Elektroforéza v agarózovém gelu umožňuje rozdělit směs DNA. Vizualizace se provádí s využitím speciálních fluorescenčních barev, např. ethidiumbromidu, který se dostane mezi řetězce DNA. Gel se nalévá do forem, které se poté položí do elektroforetické vany, aby gel byl ponořen v tlumivém roztoku. ²²

Kapilární elektroforéza vychází ze stejného principu jako klasická desková elektroforéza, tzn. ze schopnosti nabitých částic pohybovat se v elektrickém poli. Mezi základní komponenty patří tenká skleněná kapilára, 2 vialky naplněné vstupním a

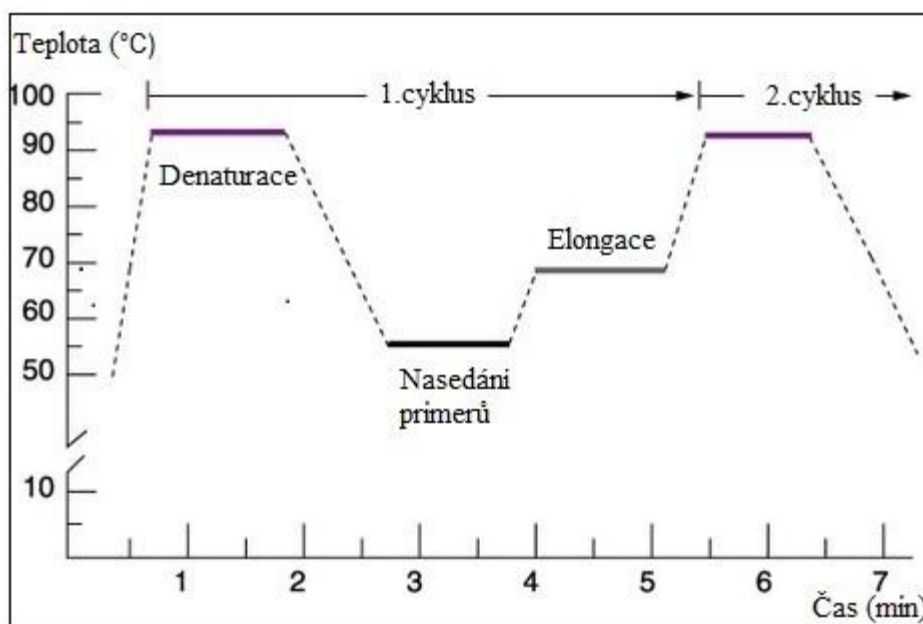
výstupním pufrem a 2 elektrody napojené na zdroj vysokého napětí.²⁰ Kapilára je naplněna médiem, kterým může být vodný elektrolyt či specifický gel. Gel zároveň představuje i molekulové síto, díky kterému se nabitě částice dělí na základě jejich molekulových hmotností.¹¹ Vzorky jsou umístěny v sekvenční destičce a nadávkovány do kapiláry pomocí vozeného napětí na kapiláře. Vzorek prochází kapilárou. Výsledné produkty jsou označeny fluorescenční barvou a analyzovány detekčním okénkem, kde dochází k jejich excitaci laserovým paprskem a následně jsou vyhodnocena získaná data.²⁰

1.4.2 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je *in vitro* metoda, která se používá k amplifikaci DNA.³⁰ Jsme díky ní schopni získat úseky DNA, aniž bychom ji museli předtím klonovat.³¹

Jedná se o enzymatický proces, který je založen na zahřívání a chlazení vzorků v přesném teplotním programu obsahujícím přes 30 cyklů. Během každého cyklu je kopie cílové DNA sekvence vyráběna pro každou molekulu obsahující cílovou sekvenci. Hranice amplifikovaného produktu je vymezena oligonucleotidovými primery, které jsou komplementární k 3' konci významné sekvence. Teoreticky je po 30 cyklech vyrobeno zhruba miliarda kopií cílové části DNA templátu. Výsledný PCR produkt, někdy také nazývaný jako amplikon, je získán v množství dostatečném pro další zpracování. Obvykle se PCR provádí se vzorkem o objemu 5 -100 μ l.²⁰

K provedení PCR se reakce se používají přístroje zvané termocyklery. Ty jsou nastaveny tak, že se v nich automaticky mění teplota, a to v naprogramovaných časových intervalech (viz obr. 4, str. 24)³¹



Obr. 4 Ukázka teplotního programu PCR. V jednom cyklu dochází k denaturaci, nasedání primerů (tzv. annealing) a následně elongaci. (Převzato a upraveno z 40)

KOMPONENTY PCR

Základními komponenty PCR reakce jsou:

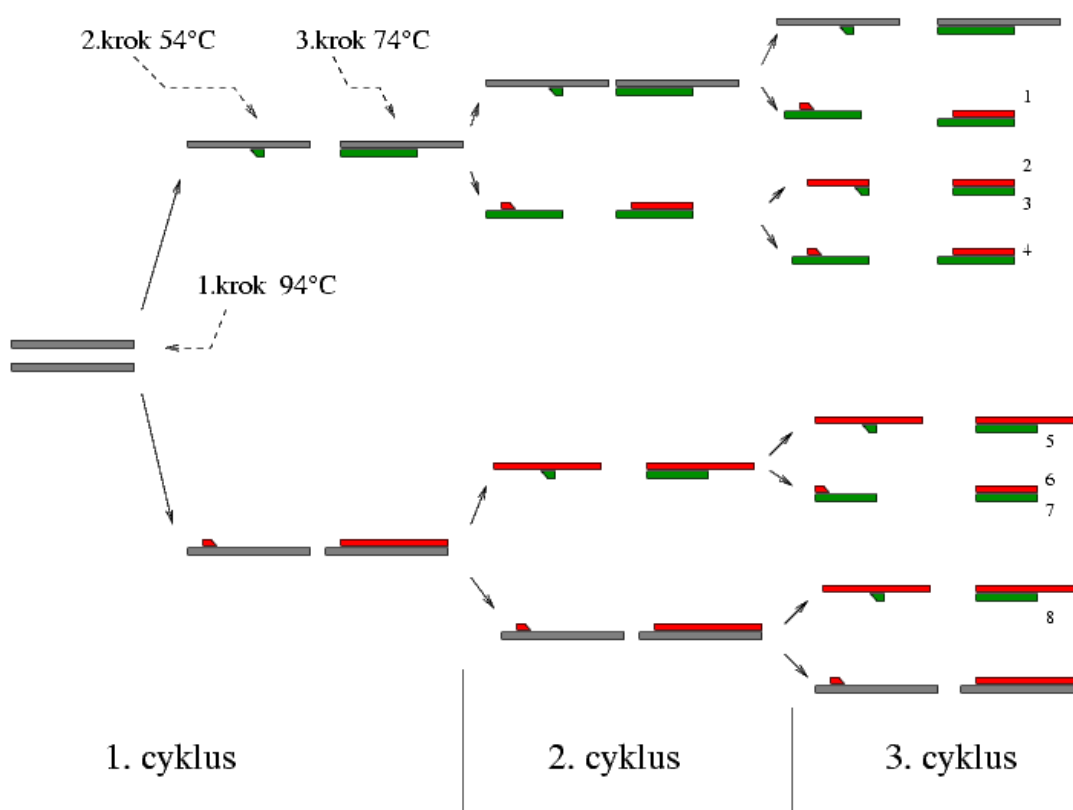
- DNA templát
- Oligodeoxynukleotidové primery
- Nukleotidy (všechny 4: dA- dT- dC- dGTP)
- Termostabilní DNA polymeráza
- Reakční pufr²⁹

Primery by měly mít délku okolo 18-25 nukleotidů, obsah G+C by se měl pohybovat v rozmezí 40-50%, oblasti s velkým počtem G/C a A/T párů by měly být rovnoměrně rozprostřeny. Teplota tání obou primerů by měla být podobná (kolem 50°C). Primery musí být specifické, nesmí se v nich vyskytovat komplementární sekvence a vnitřní sekundární struktury. K zajištění vazby na templát je třeba vhodně zařadit 1-2 zbytky C nebo G na 3'-konce primerů.³¹

CYKLY

PCR cyklus se skládá ze tří základních kroků. Prvním krokem je tepelná denaturace cílové DNA. Následuje nasedání syntetických oligonukleotidových primerů

a posledním krokem je extenze nasadnutých primerů s DNA polymerázou (viz obr. 5)³⁰ Počet těchto cyklů se odvíjí od koncentrace templátu DNA. Většinou PCR probíhá v rozmezí 25-35 cyklů. Při vyšším počtu může docházet ke vzniku nespecifických produktů. Konečným výsledkem je velké množství ampliconů, jejichž velikost se může pohybovat v řádech desítek až tisíců párů bází (bp). K prokázání přítomnosti PCR produktů se používá elektroforéza v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu či real-time PCR.³¹



Obr. 5 Princip polymerázové řetězové reakce, první tři cykly. 1. krok – denaturace, 2.krok – nasyntetizování primerů, 3.krok – extenze. Čísla 1-8 označují výsledné PCR produkty. (Převzato z 25)

V současné době existuje mnoho typů PCR, které jsou modifikovány pro různé použití a které se již běžně používají v klinických laboratořích. Patří mezi ně např.: multiplexová PCR, real-time PCR, uhnížděná PCR. Dále pak PCR *In Situ* nebo PCR se sekvenčně specifickými primery (PCR- SSP).²⁸

Real-time PCR patří mezi jednu z technik kvantifikace DNA. Umožňuje nám amplifikovat DNA a zároveň i monitorovat průběh amplifikace, a to měřením

fluorescence vznikajících amplifikátů. Díky tomu je možné nejen určit množství DNA ve vzorku, ale i pozorovat chování DNA za nejrůznějších podmínek analýzy. ⁸

1.4.3 Sekvenování

Sekvenování se používá ke stanovení pořadí nukleotidů v úseku DNA. Sekvenační techniky využívané v klinické praxi zahrnují především Maxam-Gilbertovu a Sangerovu metodu, ale také techniky tzv. „next-generation sequencing“, které představují souhrnné označení pro moderní metody sekvenování jako je pyrosekvenování, Illumina sekvenování nebo SOLiD sekvenování. ^{31, 36}

Sangerova metoda je založena na specifické inhibici enzymové syntézy řetězců DNA. DNA, u které má být stanovena sekvence nukleotidů, je použita jako matrice k syntéze komplementárních řetězců prostřednictvím DNA polymerázy. DNA polymeráza umí vytvořit identickou kopii DNA a je schopna syntetizovat DNA ve směru 5'→3' od primeru s volnou 3' OH skupinou. Zahájení syntézy na matricové DNA je v místě, kde je připojen sekvenčně specifický primer a je ukončena v místě, kde se do rostoucího řetězce začleňují (na základě pravidel o párování bází) 2',3'-dideoxyribonukleosidtrifosfáty (ddNTP). ddNTP funguje jako koncový inhibitor, protože nemá volnou OH skupinu, a tak k němu DNA polymeráza nemůže připojit další nukleotid. Reakce jsou prováděny ve 4 vzorcích. Použitá reakční směs obsahuje: purifikovanou molekulu DNA, primer, směs obsahující 4 normální nukleotidy a jeden ze čtyř ddNTP a DNA polymerázu. Pro detekci nově vznikajících řetězců se primer, ddNTP nebo jeden z deoxynukleosidtrifosfátů radioaktivně nebo neradioaktivně značí. Po polymerační reakci se produkty denaturují a oddělují na polyakrylamidovém gelu. Při manuálním provedení této metody můžeme stanovit sekvenci dlouhou 300-400 bází. Rychlejší stanovení se však provádí pomocí automatizovaných aparatur, kdy syntéza DNA probíhá metodou PCR reakce, k detekci se používají 4 odlišné fluorescenční značky a délka stanovené sekvence je 500-1000 bází. ³¹

1.5. Ústav hematologie a krevní transfúze

Ústav hematologie a krevní transfúze, se sídlem v Praze, patří mezi významná pracoviště zabývající se léčbou, diagnostikou a výzkumnou činností v oblastech hematologie a krevní transfúze. Byl založen 1.1.1952 a již na samém počátku bylo jeho

cílem vytvořit a zajistit organizaci transfuzní služby a zásobovat nemocnice transfuzními přípravky.³³

Díky spojení výzkumu s klinickou a transfúziologickou částí patří Ústav hematologie a krevní transfúze v oblasti léčebně-preventivní péče mezi vysoce specializované léčebné instituty a konsiliární zařízení. Současně plní kontrolní funkci v transfuzní službě, hemostáze a DNA diagnostice.³³

Klinický úsek se zabývá diagnostikou a léčbou pacientů s maligními i nezlobnými hematologickými chorobami (transplantace kmenových buněk, intenzivní hematologická péče či léčba leukémií).³³

Hlavním úkolem transfúziologického úseku jsou odběry krve dárců a její následné zpracování, součástí tohoto úseku je transfúzní oddělení, aferetické oddělení, oddělení imunohematologie, oddělení buněčné terapie, banka pupečnickové krve, laboratoř prevence virových nákaz a odběrová laboratoř.³³

Výzkumný úsek ve spolupráci s předchozími dvěma úseky zajišťuje výzkum hematologických nádorů a vývoj terapeutických protinádorových vakcín, studuje nádorové markery, hemostázy, trombózy a sleduje genovou a proteinovou expresi onkohematologických onemocnění.³³

Ústav hematologie a krevní transfúze zároveň plní významnou roli ve vzdělávání a je držitelem mnoha certifikátů- Certifikát kvality Joint Commission International (JCI), European federation for immunogenetics (EFI) a plní požadavky mezinárodních norem a dokumentů Českého institutu pro akreditaci, obecně prospěšné společnosti (ČIA o.p.s.) pro zkušební a kalibrační laboratoře (ČSN EN ISO/IEC 17025:2005 a ČSN EN ISO 15189:2007).³³

1.6. Práce v klinické diagnostické laboratoři

Práce v klinické diagnostické laboratoři podléhá přísným kontrolám, které mají zaručit, aby výsledky zde získané byly objektivní a relevantní. S tímto souvisí i potřeba validace a verifikace metod, přístrojů, kitů. V souvislosti s touto problematikou je třeba vymezit pojmy s ní související.

- **Bias (odchylka)** – Rozdíl mezi střední hodnotou výsledku zkoušky a přijatou referenční hodnotou.³⁴

- **Certifikovaný referenční materiál** – Jedná se o materiál, který je doprovázen certifikátem, jehož jedna či více hodnot vlastností jsou certifikovány postupem.³⁵
- **Citlivost** – Citlivost je takový rozdíl v koncentraci analytu, který odpovídá nejmenšímu zjizitelnému rozdílu, jenž může být zjištěn vhodnou odezvou signálu metody.³² Jedná se o poměr $TP / (TP + FN)$.³⁵
TP= true positivity (správná pozitivita)
FN= false negativity (falešná negativita)
- **Externí hodnoty kvality** – Jedná se o objektivní zhodnocení výsledků prováděné nezávislou organizací.³⁵
- **Falešná negativita** – Výsledek testu svědčící o nepřítomnosti znaku či projevu, ve skutečnosti ale znak či projev je.
- **Falešná pozitivita** – Výsledek testu svědčící o přítomnosti znaku či projevu, ve skutečnosti ale znak či projev chybí.
- **Kontrolní materiál** – Kontrolní materiál je materiál používaný pro účely operativního řízení kvality.³⁵
- **Mez detekce** – Vyjadřuje nejnížší množství analytu, které jsme schopni ve vzorku detekovat, není však nutně kvantifikovatelné jako exaktní hodnota.³⁸
- **Mez stanovitelnosti** – Je nejnížší množství analytu ve vzorku, které může být stanoveno jako exaktní hodnota s požadovanou hodnotou nejistoty.³⁵
- **Mezilehlá preciznost** – Preciznost měření za použití podmínek mezilehlé preciznosti měření. Je měřeno stejným postupem, na stejném místě, měření se opakuje na stejných nebo podobných objektech, ale vyskytují se podmínky zahrnující další podmínky.³⁷

- **Nejistota měření** – Parametr přidružený k výsledku měření, které charakterizuje míru rozptýlení, které by mohly být důvodně přisuzovány měřené veličině. ³⁵

- **Opakovatelnost** – Míra těsnosti souhlasu mezi výsledky posloupnosti nezávislých měření stejného vzorku analytu provedených stejným člověkem, stejnou metodou, na stejném místě, na stejném přístroji, za stejných podmínek, a to v krátkém časovém intervalu. ³⁵

- **Reprodukovatelnost** – Míra těsnosti souhlasu mezi výsledky posloupnosti nezávislých měření stejného vzorku analytu provedených za různých podmínek. Zachována je jen metoda. ³⁵

- **Robustnost** – Schopnost metody poskytovat přijatelné výsledky měření i v případě, že dojde k malým odchylkám od měřicího postupu či složení vzorku. Udává její spolehlivost při běžném používání. ³⁵

- **Směrodatná odchylka** – Jedná se o rozptyl hodnot okolo hodnoty aritmetického průměru (přesněji řečeno pološířka Gaussovy křivky v místě inflexního bodu). ¹⁵

- **Správná negativita** – Výsledek testování o nepřítomnosti znaku či projevu odpovídá skutečné reálné skutečnosti.

- **Správná pozitivita** – Výsledek testování o přítomnosti znaku či projevu odpovídá skutečné reálné skutečnosti.

- **Specifičnost** – Jedná se o schopnost postupu stanovit pouze tu měřenou veličinu, která má být stanovena. ³⁸

- **Validace** – Validace je potvrzení zkoumáním a poskytnutí objektivního důkazu, že jsou splněny jednotlivé požadavky pro specifické zamýšlené použití. ³⁵ Potvrzuje nám, že postup měření plní požadavky na něj kladené. ³⁸

- **Verifikace** – Verifikace je potvrzení zkoumáním a poskytnutím objektivních důkazů,

že specifikované požadavky jsou splněny.³⁵ Verifikace nám potvrzuje, že měřicí postup či metody jsou plně funkční v konkrétní laboratoři.³⁸

1.6.1 Validace

Validace potvrzuje, že požadavky na specifické zamýšlené použití nebo specifickou aplikaci byly splněny. Dokazujeme tak, že měření za pomoci zařízení vyráběného a dodávané k posuzování stavu zdraví a chorob populace (IVD MC) splňuje požadavky na něj kladené.³⁸

Mezi důležitou součástí diagnostik chorob patří rozbor lidského genomu, a to za pomoci metod molekulární genetiky. Na tyto metody je tak kladen větší důraz, co se týká vzájemné kompatibility výsledků, které byly získány různými pracovišti. Z tohoto důvodu je zcela nezbytná jejich validace. Základním předpokladem pro používání metod je systém vnitřní kontroly kvality. V rámci vnitřní kontroly kvality testů se používají kontrolní pozitivní i negativní vzorky. U kvantitativních metod se používají vzorky o známém a ověřeném množství sledovaného znaku. V případě, že používáme PCR, je třeba mít NTC, neboli no template control. Tím tak ověříme, zda nedošlo ke kontaminaci jinou DNA kontaminaci.³⁵

Na validaci pohlížíme ze dvou hlavních pohledů - klinického a analytického. Klinické hledisko dokládá, že metoda splňuje požadavky uživatelů laboratorních služeb. S tímto aspektem souvisí určení klinické citlivosti, klinické specifčnosti a referenčního intervalu.

Analytické hledisko pak představuje validaci samotného analytického postupu. V souvislosti s tímto hlediskem patří mezi doporučené charakteristiky: opakovatelnost, mez detekce, mez stanovitelnosti, robustnost.³⁷

1.6.1.1 Proces validace

Proces validace v sobě zahrnuje formulaci požadavků, kterých má být dosaženo, vypracování plánů, provedení příslušných experimentů, vyhodnocení získaných údajů a na závěr sepsání protokolu.³⁸ Musí zde být zahrnuty veškeré kroky zahrnující mimo jiné přípravné postupy (např. izolace DNA/ RNA) a také validace použitých přístrojů. Používáme-li softwarovou analýzu, je třeba, aby byl validován i počítačový program.³⁵

Validace mohou provádět výrobci diagnostik, profesionální organizace

analytiků, nebo laboratoře.³⁸

Validace se provádí především při zavedení nové metody, při zavedení nového diagnostického kitu, při převzetí metody z jiné laboratoře či po jejím po roce po jejím používání (revalidace).³⁸

Rozlišujeme kvalitativní a kvantitativní validaci:

a) Kvantitativní validace

Mezi validace kvantitativních metod řadíme: plnou validaci metody vyvinuté v laboratoři, validaci převzaté metody a validaci metody s použitím komerčně vyráběných diagnostických souprav IVDs CE.³⁵

U plné validace metody vyvinuté v laboratoři stanovujeme citlivost, specifčnost, detekční rozmezí, testujeme opakovatelnost (5 krát pro jeden vzorek ve třech koncentracích na okrajích a ve středu detekčního rozmezí) a reprodukovatelnost (5 krát pro jeden vzorek ve třech koncentracích na okrajích a ve středu detekčního rozmezí). Ze získaných hodnot opakovatelnosti a reprodukovatelnosti lze určit přesnost, která je vyjádřena hodnotou nejistoty měření např. pomocí směrodatné odchylky.³⁵

U validace převzaté metody postupujeme jako u validace plné metody, není-li metoda normalizovaná. V případě, že je normalizovaná, můžeme provést zkrácenou validaci, kdy stanovujeme detekční rozmezí, testujeme opakovatelnost (3 krát pro jeden vzorek ve třech koncentracích na okrajích a vepředu detekčního rozmezí), reprodukovatelnost (3 krát pro jeden vzorek ve třech koncentracích na okrajích a ve středu detekčního rozmezí). Ze získaných hodnot opakovatelnosti a reprodukovatelnosti lze určit přesnost, která je vyjádřena hodnotou nejistoty měření pomocí např. směrodatné odchylky.³⁵

U validace metody s použitím komerčně vyráběných diagnostických souprav IVD s CE značkou můžeme provést zkrácenou validaci/verifikaci ke zjištění, že naměřené hodnoty budou shodné s hodnotami uvedenými v protokole od výrobce. Souprava musí být použita přesně dle návodu, můžeme ji použít jen ke stanoveným účelům, postup je stejný jako u normalizovaných metod.³⁵

b) Kvalitativní validace

Mezi validace kvalitativních metod řadíme: plnou validaci metody vyvinuté v laboratoři, validaci převzaté metody a validaci metody s použitím komerčně vyráběných diagnostických souprav IVDs CE.³⁵

U plné validace metody stanovujeme specifičnost, mez detekce, robustnost, citlivost určení veškerých možností (mutací/polymorfismů) zjišťovaného znaku (genu/nukleotidové sekvence), jež jsou danou metodou stanovovány, testujeme negativní kontroly, testujeme opakovatelnost (10 krát pro jeden vzorek), reprodukovatelnost (10 krát pro jeden vzorek), určujeme nejistoty identifikace.³⁵

U validace převzaté metody postupujeme jako u validace plné metody, není-li metoda normalizovaná. V případě, že je normalizovaná, můžeme provést zkrácenou validaci, kdy testujeme opakovatelnost (6 krát pro jeden vzorek), reprodukovatelnost (6 krát pro jeden vzorek), stanovujeme mez detekce, robustnost.³⁵

U validace metody s použitím komerčně vyráběných diagnostických souprav IVD s CE značkou můžeme provést zkrácenou validaci/verifikaci ke zjištění, že naměřené hodnoty budou shodné s hodnotami uvedenými v protokole od výrobce. Souprava musí být použita přesně dle návodu, můžeme ji použít jen ke stanoveným účelům, postup je stejný jako u normalizovaných metod.³⁵

1.6.2 Verifikace

Verifikace ověřuje, že data o analytických znacích poskytnutá výrobcem, jinou laboratoří, nebo referenční institucí jsou v dané laboratoří s použitím konkrétního měřicího systému dosažena. Znamená to, že měření IVD MD je zcela funkční v konkrétní laboratoří.³⁸ Hlavním významem verifikace je ověření daných charakteristik metody v konkrétních podmínkách laboratoře. Zjišťuje se, zda získané hodnoty vybraných charakteristik se shodují s údaji, které udal výrobce nebo údaji zjištěnými při validaci. Obvykle se provádí jednou ročně, mimořádně se provádí při inovaci výrobku IVD. Obsah a rozsah verifikace určuje laboratoř.³⁷

U verifikace kvantitativních metod stanovujeme opakovatelnost, mezilehlou preciznost, bias měření. U kvalitativní verifikace stanovujeme opakovatelnost, mezilehlou preciznost, klinickou citlivost a specifičnost. V praxi se můžeme setkat i s opakovanou verifikací metody, která by se měla provádět minimálně jednou ročně. K tomuto účelu se využívá dat získaných z externího hodnocení kvality, interní kontroly či dat od klinických pracovníků.³⁷

2. Cíle práce

1. Validace kitů HLA-SuBiTo.
2. Validace kitu PowerPlex[®] CS7 System (výrobce Promega), jenž měl nahradit stávající kit The GenePrint Fluorescent STR Multiplex systém FFFL.
3. Validace nového sekvenčního polymorfismu v rámci vyšetření buněčného chimérismu po alogenní HSCT analýzou jednonukleotidových polymorfizmů a krátkých inzercí a delecí metodou kvantitativní PCR v reálném čase.

3. Experimentální část

3.1 Použité přístroje

Centrifuga - Eppendorf Minispin Plus	Eppendorf, Německo
Centrifuga IEC CL31-Multispeed	Thermo Scientific, USA
Elektroforetická vana – GNA	GE Healthcare, USA
Genetický analyzátor - ABI 3500,	Applied Biosystems, USA
Chladicí stojánek pro 0,5 až 2,0 ml mikrozkušavky	P-LAB, ČR
Chladicí stojánek pro 0,1 ml stripy	Corbett Research, Austrálie
Mikrovlnná trouba	AEG, Německo
Pipety - Pipetman P20, P200, Distriman	Gilson, Francie
PCR mikrozkušavky s víčky	Qiagen, USA
Přečišťovací desky	Merck Millipore, Německo
Sekvenační deska	BIOplastics, Holandsko
Sekvenační septa	LifeTechnologies, USA
Termocykler DNA Engine	BioRad, Německo
Termocykler - PTC-200-MJ Research	Bio-Rad, Německo
Termocykler Rotor Gene 6000	Corbett Research, Austrálie
UV transluminátor	Biometra, Německo
Vortex - Vortex Classic	VELP SCIENTIFICA, Itálie

3.2 Použité softwary

BioDocAnalyse (BDA) live - dokumentační systém	Biometra, Německo
Software- Assign 3.6 +	Conexio, Austrálie
Software Gene Mapper	Applied Biosystems, USA
Software - Rotor Gene 6000	Qiagen, USA

3.3 Použité chemikálie

Agaróza	SERVA, Německo
	GE Healthcare, USA

EDTA	Sigma, USA
Ethidium bromid - PCR Ethidium bromid	Top Bio, ČR
Ficoll	GE Healthcare, USA
Formamid - Hi-Di Formamide	Applied Biosystems, USA
Voda pro chromatografii - LiCHrosolv VODA	HIRSCHMANN LABOR, Německo
Orange G	Chemapol limited, U.K.
Primery	BIOGEN, ČR

Forward primer

pro polymorfismus G42863-C : GGCTTGTGGATGAAGGAGTC

pro polymorfismus G42863-A : GGCTTGTGGATGAAGGAGAA

Reverse primer

stejný pro oba polymorfismy : TGGCACATCTGGCAAATCTC

TaqMan sonda

stejná pro oba polymorfismy : ACAGGGAGAGTGATGTTGGAGCTGGGT

Sephadex- FINE DNA GRADE	GE HEALTHCARE, USA
Sterilní voda (bez nukleáz)	Ambion, USA
Tris-HCl	Sigma, USA

3.4 Použité enzymy

Gold polymeráza- AmpliTaq Gold 360 DNA polymerase (250 U)

Applied Biosystems, USA

3.5 Použité kity

***GenePrint*[™] Fluorescent STR Multiplex - F13A01, FESFPS, F13B, LPL**

(součástí kitu byl: PrimerMix, alelický žebříček, kontrolní DNA, pufr)

Promega, USA

PowerPlex[®] CS7 Systém

Promega, USA

(součástí kitu byl: MasterMix, PrimerMix, kontrolní DNA, alelický žebříček, velikostní

molekulární standard ILS, destilovaná voda)

PowerPlex® 16 HS System

Promega, USA

(součástí kitu byl: MasterMix, PrimerMix, kontrolní DNA, alelický žebříček, velikostní molekulární standard ILS, destilovaná voda)

SuBiTo – A

Inno-Train, Německo

(součástí kitu byla: IT – Taq polymeráza, primery, EXO-SAP)

SuBiTo – B

Inno-Train, Německo

(součástí kitu byla: IT – Taq polymeráza, primery, EXO-SAP)

SuBiTo – C

Inno-Train, Německo

(součástí kitu byla: IT – Taq polymeráza, primery, EXO-SAP)

SuBiTo- DRB1

Inno-Train, Německo

(součástí kitu byla: IT – Taq polymeráza, primery, EXO-SAP)

3.6 Použité roztoky

Orange G - Smícháno 10g Ficollu s 50 mg Orange G a doplněno na 50 ml 0,5x TAE

TE pufr (pro naředění DNA na koncentraci 50 ng/μl a naředění primerů)

10 mM Tris-HCl, pH= 7,5

1 mM EDTA

Universální pufr- TagMan Universal Master Mix

Ambion Life Technologies

TAE – Smícháno 121g Tris; 28,5 ml ledové kyseliny octové; 50 ml 0,5 M EDTA a doplněno do 500 ml destilovanou vodou.

3.7 Použité metody

3.7.1 Validace kitů SuBiTo

K validaci byly použity 4 kity, a to HLA- SuBiTo A, HLA-SuBiTo B, HLA-SuBiTo C a HLA-SuBiTo DRB1. Do stojánku bylo dáno 8 mikrozkušavek, v následujícím pořadí:

dvě žluté mikrozkušavky pro lokus A označené AG1 a AG2

dvě zelené mikrozkušavky pro lokus B označené BG1 a BG2

dvě oranžové mikrozkušavky pro lokus C označené CG1 a CG2

dvě růžové mikrozkušavky pro lokus DRB1 označené RG1 a RG2

Do všech mikrozkušavek bylo napipetováno 18 μ l DNA primerů (pro AG1 a AG2 z kitu HLA-SuBiTo A, pro BG1 a BG2 z kitu HLA- SuBiTo B, pro CG1 a CG2 z kitu HLA-SuBiTo C, pro RG1 a RG2 z kitu HLA-SuBiTo DRB1). Následně bylo do mikrozkušavek AG1, AG2, RG1 a RG2 přidáno po 2 μ l DNA 1 a do mikrozkušavek BG1, BG2, CG1 a CG2 po 2 μ l DNA 2. Do každé mikrozkušavky byla poté přidána DNA polymeráza, a to vždy 0,15 μ l. Mikrozkušavky byly dány do termocykleru. PCR reakce probíhala 3 hodiny a 8 minut (BIO RAD - DNA ENGINE) s následujícím teplotním programem:

Tab. 1 – Teplotní program PCR reakce

První cyklus	Teplotní profil pro 5 cyklů	Teplotní profil pro dalších 35 cyklů	Parkovací teplota
95 °C	97 °C 15 sekund	97 °C 30 sekund	4 °C
2 minuty	65 °C 30 sekund	62 °C 15 sekund	
	72 °C 3 minuty	72 °C 3 minuty	

Po PCR reakci se kontrolovala úspěšnost amplifikace na agarózovém gelu, do kterého byly aplikovány 2 μ l vzorku a 5 μ l PCR vkladacího pufru.

Agarózový gel byl připraven následujícím způsobem: K 4500 ml destilované vody bylo přidáno 50 ml 50 \times TAE, následně bylo z této směsi odlito 150 ml tohoto roztoku do Erlenmayerovy baňky. K těmto 150 ml 0,5 \times TAE (0,5 \times koncentrovaný) bylo přisypáno 3 g agarósy. Baňka byla dána na deset minut do mikrovlnné trouby. Po krátkém vychladnutí do ní bylo přidáno 8 μ l ethidium bromidu a obsah byl vylit do připravených vaniček, do kterých byly následně zasunuty hřebínky pro tvorbu gelu.

Připravený agarózový gel byl vložen do elektroforetické vany (GNA), připojen ke zdroji elektrického napětí a nechala se probíhat elektroforéza při 120 V 30 minut. Poté byl gel přenesen do BioDocAnalyse live (BDA), což je gelová dokumentace. Pomocí CCD kamery a UV transilluminátoru byl obraz gelu zobrazen v BDA analysis softwaru na obrazovce počítače a uložen ve formátu jpg nebo tif.

Po ověření úspěšné amplifikace, bylo do každého PCR vzorku přidáno po 3 μ l

EXO-SAPu (směs enzymu exonukleasy I a alkalické fosfatázy ve speciálním pufru, používaná k přečištění produktů PCR reakce) a následovala inkubace 45 minut v termocykleru, po které se ke vzorkům přidalo 15 µl vody pro chromatografii. Teplotní program inkubace je uveden v tab. 2.

Tab. 2 – Program v termocykleru pro ExoSAP-IT

1×	1×	Parkovací teplota
37 °C 30 minut	80 °C 15 minut	4 °C

Po tomto kroku byly připraveny sekvenační reakce. Do stojánku bylo dáno čtyřicet mikrozkušavek- šest označených jako A G1, šest jako A G2, šest jako B G1, šest jako B G2, šest jako C G1, šest jako C G2, dvě jako R G1 a dvě jako R G2. Do těchto mikrozkušavek byly následně napipetovány sekvenační primery, vždy 8 µl, a to dle následujícího rozpisu :

Tab. 3 – Přehled primerů pro sekvenační reakce

LOKUS	PRIMER	PRIMER	PRIMER	PRIMER	PRIMER	PRIMER
AG1	A-Seq-2F	A-Seq-2R	A-Seq-3F	A-Seq-3R	A-Seq-4F	A-Seq-4R
AG2	A-Seq-2F	A-Seq-2R	A-Seq-3F	A-Seq-3R	A-Seq-4F	A-Seq-4R
B G1	B-Seq-2F	B-Seq-2R	B-Seq-3F	B-Seq-3R	B-Seq-4F	B-Seq-4R
B G2	B-Seq-2F	B-Seq-2R	B-Seq-3F	B-Seq-3R	B-Seq-4F	B-Seq-4R
C G1	C-Seq-2F	C-Seq-2R	C-Seq-3F	C-Seq-3R	C-Seq-4F	C-Seq-4R
C G2	C-Seq-2F	C-Seq-2R	C-Seq-3F	C-Seq-3R	C-Seq-4F	C-Seq-4R
R G1	DRB1-Seq-G1F	DRB1-Seq-G1R				
R G2	DRB1-Seq-G2F	DRB1-Seq-G2R				

Do takto připravených mikrozkušavek se sekvenačními primery, byly následně v post-PCR zóně napipetovány PCR vzorky, a to A G1 do mikrozkušavek A G1, PCR vzorek A G2 do mikrozkušavek A G2, PCR vzorek B G1 do mikrozkušavek B G1, PCR vzorek B G2 do mikrozkušavek B G2, PCR vzorek C G1 do mikrozkušavek C

G1, PCR vzorek C G2 do mikrozkušavek C G2, PCR vzorek R G1 do mikrozkušavek R G1 a PCR vzorek R G2 do mikrozkušavek R G2. Následně proběhla sekvenační PCR reakce, a to po dobu 2 hodin a 11 minut s následujícím teplotním programem :

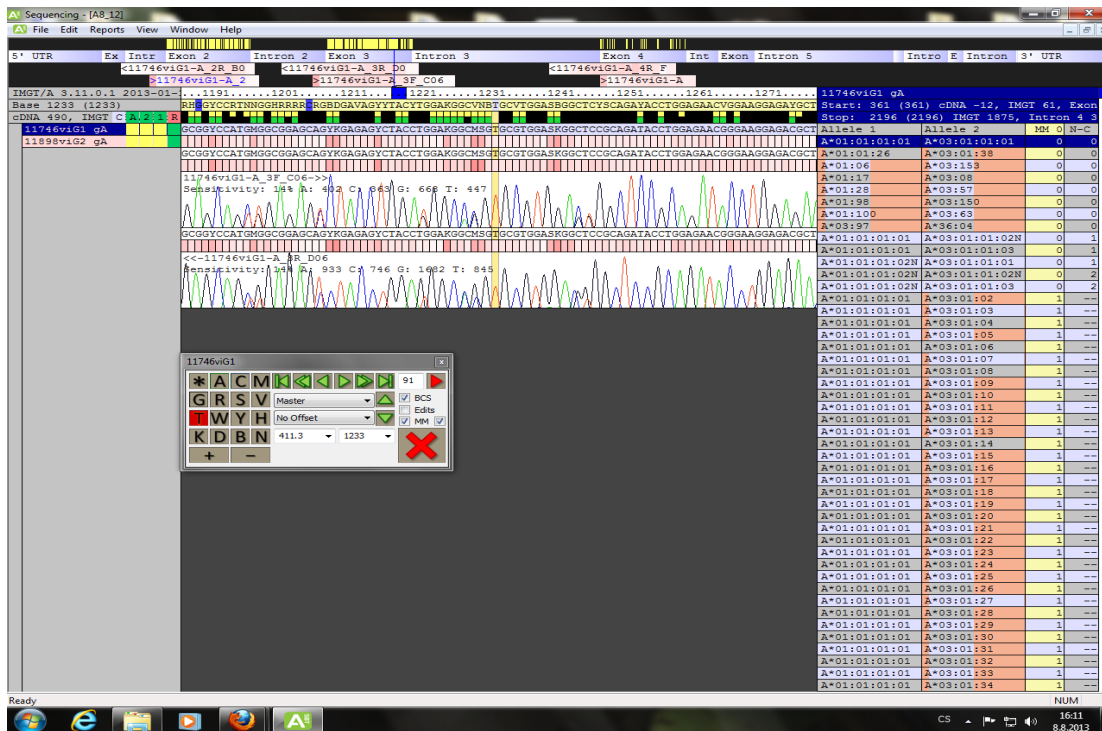
Tab. 4 – Teplotní program sekvenční PCR reakce

První cyklus	Teplotní profil pro 40 cyklů	Parkovací teplota
96 °C 1 minuta	96 °C 10 sekund 60 °C 2 minuty	4 °C

Pro následné sekvenování byly vzorky ze stojánku nanесeny na kolonky se Sephadexem pod úhlem 45 stupňů tak, aby se špička pipety nedotkla gelu. Sephadex byl připraven smícháním 3 g Sephadexu a 36 ml vody pro chromatografii. Před použitím byl ještě zředěn, aby byla získána optimální konzistence Takto připravený Sephadex byl napipetován do kolonek a 5 min. centrifugován (IEC CL31R Multispeed s rotorem T20, rpm 2000, 10 °C).

Po nanесení PCR vzorků na kolonky se Sephadexem, byly kolonky tentokrát už s nanесenými vzorky opět 5 min. centrifugovány při 10 °C (IEC CL31R Multispeed s rotorem T20, rpm 2000, 10 °C). Poté bylo do každé z jamek přidáno 15 µl formamid a kolonky byly přikryty septem a sekvenovány v sekvenátoru (AB HITACHI 3500) s následujícími parametry: teplota 60 °C, napětí při nástřiku 1,6 kV, čas nástřiku 8 s, napětí před během 18 kV, čas před během 90 s, napětí běhu 19,5 kV, čas běhu 1400 s, čas zpoždění 1 s.

Po skončení sekvenování byly získané údaje analyzovány pomocí softwaru Assign 3,6+ (Obr. 6) a srovnány s výsledky rutinně zpracovaných vzorků pacient/dárce za pomoci těchto kitů, ovšem z jiné dodávky.



Obr. 6 Ukázka softwaru Asignn 6+. Vyhodnocení pro kit HLA- SuBiTo A

3.7.2 Validace kitu PowerPlex® CS7 System

K této validaci byly vzorky připraveny smícháním 5 µl PowerPlex HS 5× MasterMix; 2,5 µl CS7 10× Primer Pair Mixu; 15 µl vody a 0,5 µl templátu DNA. Celkový reakční objem byl tedy 25 µl.

Pro porovnání byly stejné vzorky amplifikovány i kitem *GenePrint™* Fluorescent STR Multiplex - F13A01, FESFPS, F13B, LPL (tento kit obsahuje lokusy LPL, F13B, FESFPS a F13A01) a kitem PowerPlex® 16 HS System (tento kit obsahuje lokusy Penta D a Penta E). Pro každý použitý byla amplifikována i pozitivní a negativní kontrola.

Pro tuto validaci byly vybrány vzorky pacienta před aHSCT a jeho dárce pro informativitu (kvalitativní stanovení) a dále vzorky pacienta po aHSCT pro monitoring (kvantitativní stanovení).

Následovala PCR reakce v termocykleru (PTC-200 MJ Research) s následujícím teplotním programem:

Tab. 5 – Teplotní program PCR reakce

Počáteční denaturace	Teplotní profil pro prvních 10 cyklů	Teplotní profil pro dalších 20 cyklů	Závěrečná extenze	Chlazení
96 °C 2 minuty	94 °C 30 sekund 60 °C 30 sekund 70 °C 45 sekund	90 °C 30 sekund 60 °C 30 sekund 70 °C 45 sekund	60 °C 30 minut	4 °C

Poté byla provedena kontrolní elektroforéza na agarózovém gelu, díky níž bylo zjištěno, jaká je kvalita (intenzita) PCR produktu, abychom věděli kolik tohoto produktu má být použito pro fragmentační analýzu. PCR produkt byl smíchán s ORANGE G, a to v poměru 1 : 1 (7 µl:7 µl). Elektroforéza běžela 30 minut při 120 V (asi 6 V na 1 cm gelu).

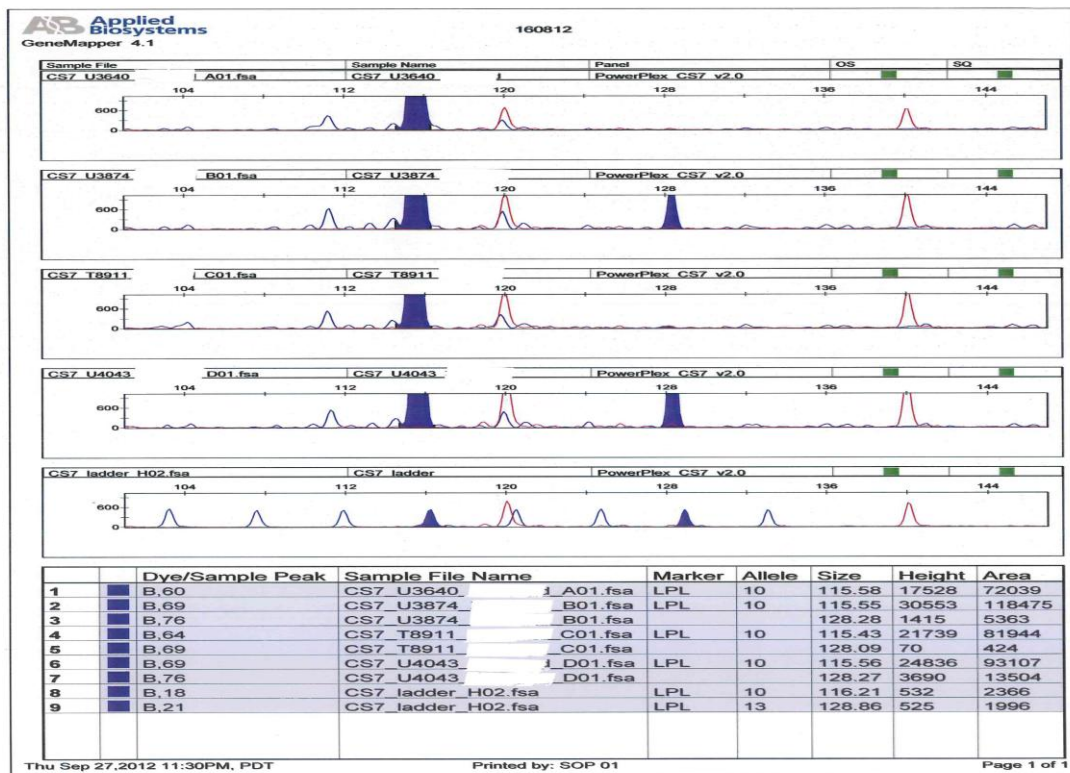
Příprava gelu byla analogická jako u gelu pro validaci kitů SuBiTo, ale 1,5% agarózový gel byl vyroben rozvařením 3,7 g agarózy ve 250 ml 0,5× TAE pufru a přidáním 10µl ethidium bromidu.

Následně byl z každé PCR reakce připraven vzorek ke fragmentační analýze, neboli kvantitativní/kvalitativní fluorescenční PCR, při které jsou za pomoci primerů a barev fluorescenčně značeny fragmenty během reakce. Výsledkem analýzy je získání elektroforetogram obsahující kombinaci píků, které jsou typické pro konkrétního jedince.

11

Dle předem připraveného rozpisu bylo pro každý vzorek do destiček pro genetický analyzátor napipetováno 12,5µl master mixu, který obsahoval 12,0µl formamidu a 0,5 µl velikostního standardu ILS 600. Do jamky příslušného vzorku bylo přidáno 0,3 µl PCR produktu (při slabé amplifikaci max. 3,0 µl). Poté byla celá destička denaturována v termálním bloku při 95 °C 3 minuty a následně hned ochlazená na ledu. Destička se následně překryla septem, centrifugovala se (IEC CL31R Multispeed s rotorem T20, 2000 rpm, 30 sekund při 10 °C) a byla vložena do genetického analyzátoru s předem zvolenými podmínkami analýzy.

Pro fragmentační analýzu byly současně připraveny i vzorky alelického žebříčku, který je součástí komerčně dodávaného kitu. Kapilární elektroforéza byla provedena na přístroji ABI 3500. Výsledky byly následně analyzovány softwarem GeneMapper (viz obr. 7, str. 42).



Obr. 7 Ukázka elektroforetogram u CS7. Poslední skupina píků (4. řádek) představuje alelický žebříček se kterým se srovnávají předchozí píky ke zjištění alel. V tabulce pod elektroforetogram jsou uvedeny identifikační údaje k analyzovanému vzorku, polymorfismus, alela, velikost píku, výška píku a plocha píku.

3.7.3 Validace sekvenčního polymorfismu G42863

Tento sekvenční polymorfismus má 2 varianty – G42863 A a G42863 C. Na začátku této práce bylo třeba namíchat MasterMixy pro každou variantu zvlášť. Pro polymorfismus G42863 C bylo smícháno 10 µl univerzálního pufru, 3,8 µl vody bez nukleáz, 0,4 µl forward primeru pro polymorfismus G42863 C; 0,4 µl reverse primeru a 0,4 µl TaqMan sondy. Pro polymorfismus G42863 A byl postup přípravy MasterMixu stejný, ale byl přidán forward primer pro polymorfismus G42863 A. MasterMixy se připravují s rezervou okolo 5 %.

Poté byly do kovového chladicího stojánku dány mikrozkuhavky. Do každé z nich bylo napipetováno po 15 µl MasterMixu a 5 µl promíchané DNA (Vortex Classic). Rozmístění vzorků je uvedeno v tab. 6, str. 43.

Tab. 6 - Rozmístění vzorků v mikrozkuřavkách před PCR reakcí

Zelená barva značí přidání MasterMixu pro polymorfismus G42863-C.

Růžová barva značí přidání MastetMixu pro polymorfismus G42863-A.

PoK= pozitivní kontrola

NTC = vzorek bez templátu DNA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	DNA 1	DNA 1	DNA 5	DNA 5	DNA 9	DNA 9	DNA13	DNA13	PoK
B	DNA 1	DNA 1	DNA 5	DNA 5	DNA 9	DNA 9	DNA13	DNA13	PoK
C	DNA 2	DNA 2	DNA 6	DNA 6	DNA10	DNA10	DNA14	DNA14	Ntc
D	DNA 2	DNA 2	DNA 6	DNA 6	DNA10	DNA10	DNA14	DNA14	Ntc
E	DNA 3	DNA 3	DNA 7	DNA 7	DNA11	DNA11	DNA15	DNA15	PoK
F	DNA 3	DNA 3	DNA 7	DNA 7	DNA11	DNA11	DNA15	DNA15	PoK
G	DNA 4	DNA 4	DNA 8	DNA 8	DNA12	DNA12	DNA16	DNA16	Ntc
H	DNA 4	DNA 4	DNA 8	DNA 8	DNA12	DNA12	DNA16	DNA16	Ntc

Mikrozkuřavky se poté uzavřely víčky a byly vloženy do termocyklieru v POST-PCR zóně. PCR reakce (Corbett Rotor-GENE 6000 real) běžela necelé dvě hodiny s následujícím teplotním programem:

95 °C – 10 minut

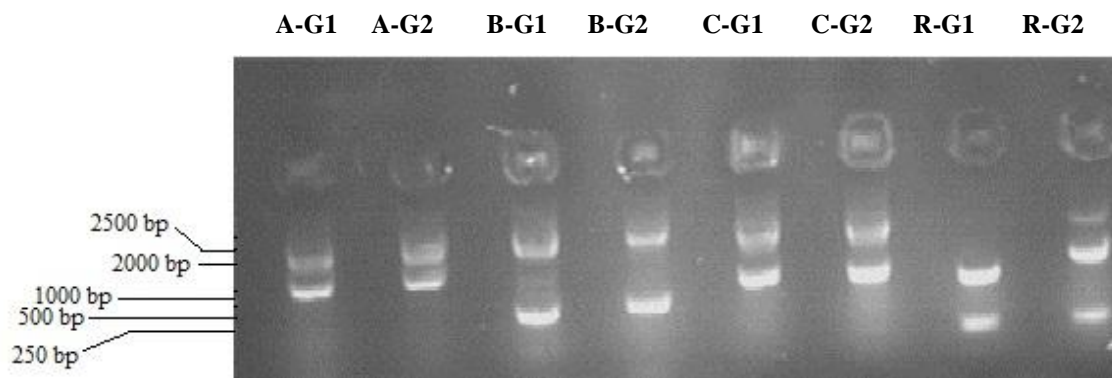
95°C- 15 sekund, 60 °C- 1 minuta 45 x opakování

Jednalo se o real time PCR, která se používá pro vyšetření buněčného chimerismu po alogenní HSCT analýzou jednonukleotidových polymorfismů a krátkých inzercí a delecí.

Po skončení PCR reakce byly výsledky vyhodnoceny pomocí softwaru (Rotor Gene 6000) a určena hodnota Ct, tzn. treshold cycle. Jedná se o počet cyklů, které jsou nutné k amplifikaci, aby vznikající fluorescence překročila tzv. mezní hodnotu, který se nastavuje manuálně tak, aby jeho stanovená hladina byla v oblasti exponenciální fáze amplifikace u všech vzorků daného běhu. Poté vzorky zanalyzujeme a zjištěné Ct hodnoty přeneseme do tabulky softwaru Microsoft Excel.

4. Výsledky

4.1 Validace kitů HLA SuBiTo



Obr. 8 Kontrola úspěšně provedené amplifikace po 1.PCR reakci na agarózovém gelu. **A-G1**= lokus A pro vzorek G1, **A-G2**=lokus A pro vzorek G2, **B-G1**= lokus B pro vzorek G1, **B-G2**= lokus B pro vzorek G2, **C-G1**= lokus C pro vzorek G1, **C-G2**= lokus C pro vzorek G2, **R- G1**= lokus DRB1 pro vzorek G1, **R-G2**= lokus DRB1 pro vzorek G2 . U každého z lokusů jsou jasně vidět 2 zřetelné a ostré proužky. První proužek od spodu představuje vnitřní pozitivní kontrolu a druhý proužek pak naamplifikované produkty. Délky v bp jsou uvedeny vlevo.

Na základě provedené kontroly amplifikace po 1.PCR reakci na agarózovém gelu byly zjištěny následující hodnoty :U **A-G1** a **A-G2** byla velikost produkt 2000bp a vnitřní pozitivní kontroly 1100 bp. U **B-G1** a **B-G2** byla velikost produktu 2200 bp a vnitřní pozitivní kontroly 550 bp. U **C-G1** a **C-G2** byla velikost produktu 2100 bp a vnitřní pozitivní kontroly 800 bp. U **R-G1** byla velikost produktů 750 bp a vnitřní pozitivní kontroly 250 bp. U **R-G2** je velikost produktů 950 bp a vnitřní pozitivní kontroly 250 bp. Amplifikace tak proběhla úspěšně.

Po provedené validaci kitů HLA SuBiTo ze dne 21.8.2012 byly vždy pro každý kit získány kombinace alel. Tyto výsledky byly poté porovnány s předchozími výsledky, pro jejichž získání byl v dřívější analýze použit stejný kit, ovšem z jiné dodávky. V tab. 7 (str. 45) a tab. 8 (str. 46) je uveden příklad validace pro kit HLA SuBiTo A.

Tab. 7 - Porovnání alelových párů u vzorku G1, použit kit HLA - SuBiTo A

OR= oblast rozdílu, udává v jaké části genu se daná alela odlišuje od alely v řádku č.1. (**I2**= druhý .intron, **E2**=druhý exon, **E3**= třetí exon). Řádek 1-6 = získané výsledné kombinace alel. Hodnota **Base Calling Score (BCS)** udává kvalitu a čistotu sekvence.

Analýza ze dne 11.6.2012				Analýza ze dne 21.8.2012		
Kombinace alel				Kombinace alel		
1	A*01:01:01:01	A* 03:01:01:01	OR	A*01:01:01:01	A*03:01:01:01	OR
2	A*01:01:01:01	A* 03:01:01:03	I2			
3	A*01:17	A*03:08	E2	A* 01:17	A*03:08	E2
4	A*01:28	A*03:57	E2	A*01:28	A*03:57	E2
5	A*01:100	A*03:63	E2	A*01:100	A*03:63	E2
6	A*03:97	A*36:04	E3	A*03:97	A*36:04	E3
Base Calling Score= 83				Base Calling Score= 85		

V tabulce jsou srovnány výsledky analýzy ze dne 11.6.2012 a 21.8.2012. Počet získaných výsledků závisí na množství polymorfních míst v sekvenci, u kterých software není schopen přiřadit, ke které alele daná báze patří, a proto není schopen vyloučit určitou kombinaci alel. V tomto případě pro HLA-A se jedná o šest kombinací (řádek 1-6). Z tabulky je patrné, že výsledek analýzy ze dne 21.8.2012 za použití kitu HLA SuBiTo z nové dodávky odpovídá výsledkům ze dne 11.6.2012, které byly získány rovněž za použití kitu HLA SuBiTo, ovšem z jiné dodávky. Alelové páry jsou kompatibilní se shodnou sekvencí. Analýza byla provedena stejným programem, ale v srpnu byla k dispozici nová verze tohoto programu, která již byla schopna analyzovat intronovou sekvenci, proto chybí druhý řádek u analýzy provedené dne 21.8.2012, tato sekvence byla programem vyloučena. U hodnoty Base calling score platí, že čím vyšší je její hodnota, tím vyšší je kvalita sekvence, přičemž hraniční hodnoty pro BCS jsou 70 v případě, že se obě alely vyskytují ve vzorku G1 nebo ve vzorku G2 (př.: A*03:97; A*36:04) a 60 v případě, že se jedna alela nachází ve vzorku G1 a jedna alela ve vzorku G2 (př.: A*06:01; A*06:01).

Tab. 8 - Porovnání alelových párů u vzorku G2, použit kit HLA - SuBiTo A

Řádek 1-6 = získané výsledné kombinace alel. Hodnota **Base Calling Score (BCS)** udává kvalitu a čistotu sekvence. **L**= rozdíl v symetrii

Analýza ze dne 30.7.2012		21.8.2012	
Kombinace alel		Kombinace alel	
1	A* 02:01:01:01 A*02:01:01:01	A* 02:01:01:01	A*02:01:01:01
2	A* 02:01:01:01 A*02:01:01:02 L	A* 02:01:01:01	A*02:01:01:02 L
3	A* 02:01:01:01 A*02:01:01:03		
4	A* 02:01:01:02L A*02:01:01:02 L	A*02:01:01:02 L	A*02:01:01:02 L
5	A* 02:01:01:02L A*02:01:01:03		
6	A* 02:01:01:03 A*02:01:01:03		
Base Calling Score= 85		Base Calling Score= 85	

Analogicky byly takto porovnány rovněž kity HLA SuBiTo – B; -C; DRB1, u kterých byly výsledky analýzy ze dne 21.8.2012 rovněž shodné s výsledky získanými z dřívějších analýzy kitem HLA-SuBiTo. Tyto výsledky jsou součástí přílohy A.

4.2 Validace kitu PowerPlex[®] CS7 System

Výsledky této validace jsou shrnuty v následujících tabulkách.

Tab. 9 - Stanovení genotypu pacienta před HSCT.

PowerPlex[®] CS7 Systém obsahuje 7 polymorfismů, systém *GenePrint*[™] Fluorescent STR Multiplex – FFFL 4 polymorfismy a PowerPlex[®] 16 HS Systém 2 polymorfismy. Polymorfismus Penta C, který je součástí PowerPlex[®] CS7 Systému, je však součástí pouze tohoto kitu, v ostatních dvou kitech přítomen není, z tohoto důvodu u něj nemohla být potvrzena shoda v alelách. (NA- non available / data nezískána)

Polymorfismus	PowerPlex [®] CS7 Systém	<i>GenePrint</i> [™] Fluorescent STR Multiplex – FFFL	PowerPlex [®] 16 HS Systém
LPL	10/13	10/13	NA
F13B	7/10	7/10	NA
FESFPS	11/12	11/12	NA
F13A01	6/16	6/16	NA
Penta D	12/14	NA	12/14
Penta C	11/13	NA	NA
Penta E	12/12	NA	12/12

Tab. 10 - Stanovení genotypu dárce pro pacienta

PowerPlex[®] CS7 Systém obsahuje 7 polymorfismů, systém *GenePrint*[™] Fluorescent STR Multiplex – FFFL 4 polymorfismy a PowerPlex[®] 16 HS Systém 2 polymorfismy. Polymorfismus Penta C, který je součástí PowerPlex[®] CS7 Systému, je však součástí pouze tohoto kitu, v ostatních dvou kitech přítomen není, z tohoto důvodu u něj nemohla být potvrzena shoda v alelách. (NA- non available/data nezískána)

Polymorfismus	PowerPlex[®] CS7 Systém	<i>GenePrint</i>[™] Fluorescent STR Multiplex – FFFL	PowerPlex[®] 16 HS Systém
LPL	10/10	10/10	NA
F13B	8/10	8/10	NA
FESFPS	11/12	11/12	NA
F13A01	6/16	6/16	NA
Penta D	12/14	NA	12/14
Penta C	11/12	NA	NA
Penta E	13/16	NA	13/16

Tab. 11 - Kvantitativní stanovení buněčného chimérismu příjemce v systému LPL

Vzorek 1-4 = vzorky pacienta po aHSCT, **g.p.** – genotyp příjemce

Ke sledování byl vybrán polymorfismus LPL, protože v tomto polymorfismu má pacient alely 10/13 a dárce 10/10. Můžeme tak sledovat, zda se po aHSCT u pacienta nebude objevovat alela 13, která by se u něj objevovat neměla, pacient by měl mít genotyp dárce.

Vzorek	PowerPlex[®] CS7 Systém	<i>GenePrint</i>[™] Fluorescent STR Multiplex – FFFL
Vzorek 1	kompletní chimerismus (CC)	kompletní chimerismus (CC)
Vzorek 2	smíšený chimerismus (MC)- 8,7% g.p.	smíšený chimerismus (MC)- 7% g.p.
Vzorek 3	mikrochimerismus (Mc)- do 1 % g.p.	mikrochimerismus (Mc)- do 1% g.p.
Vzorek 4	smíšený chimerismus (MC)- 25 % g.p.	smíšený chimerismus (MC)- 21% g.p.

V tabulce č. 11 je porovnáno kvantitativní stanovení buněčného chimérismu pacienta po aHSCT s odlišným podílem genotypu příjemce, za použití systému PowerPlex[®] CS7 System a *GenePrint*[™] Fluorescent STR Multiplex – FFFL (tento kit měl být nahrazen kitem PowerPlex[®] CS7 Systém) Můžeme vidět, že rozdíly v tomto zastoupení genotypu příjemce ve všech 4 vzorcích jsou minimální (u vzorku 2 se jedná o rozdíl 1,7%, u vzorku 4 pak 4%. Kompletní chimerismus znamená, že pacient má po

transplantaci genotyp pouze dárce, smíšený chimérismus, že pacient má po transplantaci genotyp jak dárce tak i svůj. Mikrochimérismus představuje stav, kdy detekujeme ve vzorku méně jak 1% jaderných buněk mající genotyp příjemce.

4.3 Validace bodového polymorfismu

K této validaci bylo použito 16 vzorků, jedna pozitivní kontrola a jedna negativní kontrola (NTC). Každý ze vzorků, včetně pozitivní kontroly a NTC byl napipetován vždy ve dvojici, a to jak pro polymorfismus G42863 A tak i polymorfismus G42863 C. Byla provedena real-time PCR reakce, jak je uvedeno v kapitole Techniky na str. 26. Výsledky byly vyhodnoceny softwarem Rotor Gene 6 a na jejich základě byla odečítána hodnota Ct. Výsledky jsou zachyceny v tab. 12.

Tab. 12 - Hodnoty Ct analyzovaných vzorků

Tato tabulka uvádí hodnoty Ct obou variant sekvenčního polymorfismu G42863 a výsledný genotyp konkrétního vzorku. Sekvenční polymorfismus G42863 je lokalizovaný na dlouhém raménku chromozomu X, konkrétně Xq28. Z tohoto důvodu muži mohou být pouze hemizygoty (mají gonozomy XY), tj. A,- nebo C,-. Ženy naopak mohou být homozygoty (A,A ; C,C) nebo heterozygoty (A,C), (mají 2 chromozomy XX). **PK**= pozitivní kontrola

VZOREK	POLYMORFISMUS G42863 A	POLYMORFISMUS G42863 C	GENOTYP
DNA 1	25,69	—	A,A
DNA 1	26,38	—	
DNA 2	25,46	—	A,A
DNA 2	25,99	—	
DNA 3	25,98	—	A,A
DNA 3	26,13	—	
DNA 4	—	23,75	C,C
DNA 4	—	23,65	
DNA 5	26,03	—	A,A
DNA 5	26,30	—	
DNA 6	26,87	24,67	A,C
DNA 6	26,98	24,67	

DNA 7	—	27,36	C,-
DNA 7	—	26,69	
DNA 8	26,05	—	A,A
DNA 8	25,70	—	
DNA 9	27,08	—	A,A
DNA 9	26,61	—	
DNA 10	26,97	24,53	A,C
DNA 10	27,32	24,40	
DNA 11	—	24,72	C, -
DNA 11	—	24,60	
DNA 12	26,85	—	A,-
DNA 12	27,16	—	
DNA 13	28,85	41,47	A, -
DNA 13	28,29	—	
DNA 14	27,54	—	A, A
DNA 14	27,64	—	
DNA 15	—	24,58	C, -
DNA 15	—	24,26	
DNA 16	—	25,46	
DNA 16	—	25,90	
PK	26,70	24,07	+
PK	26,83	24,19	
Ntc	—	—	—
Ntc	—	—	

5. Diskuze

Validace (verifikace) metod, přístrojů i kitů je nedílnou součástí práce v klinických laboratořích. V rámci této práce byly provedeny 3 odlišné validace.

Cílem první validace bylo validovat kit(y) HLA - SuBiTo, které přišly v nové dodávce. Dle standardů EFI musí být z každé nové dodávky validován kit k ověření, že

je v pořádku. V podkapitole 4.1 je uvedeno srovnání nově získaných dat s předchozími výsledky analyzovanými v rámci rutinní praxe pro kit HLA-SuBiTo A, na jejichž základě mohlo být konstatováno, že tento kit splnil podmínky validace. U zbylých kitů, tzn. HLA-SuBiTo – B, -C a – DRB1 byly výsledky po porovnání s výsledky získanými s použitím kitů HLA SuBiTo, z předešlé dodávky, rovněž shodné a splnily podmínky validace. Kity tak mohly být používány ke standardním účelům.

2) Druhá byla validace kitu PowerPlex[®] CS7 System. Cílem této validace bylo zjistit, zda tento kit může nahradit stávající kit *GenePrint*[™] Fluorescent STR Multiplex – FFFL System.. Bylo porovnáváno jak kvalitativní stanovení (vyšetření informativity), tak i kvantitativní stanovení (procentuální zastoupení genotypu příjemce). Nový kit obsahuje 4 polymorfismy z kitu *GenePrint*[™] Fluorescent STR Multiplex – FFFL System (LPL, F13B, FESFPS, F13A01), tak navíc i polymorfizmy Penta E, Penta D a Penta C. První 2 polymorfismy byly amplifikovány pro kontrolu genotypizace také kitem PowerPlex[®] 16 HS System, jehož jsou součástí. Bohužel pouze polymorfizmus Penta C nebylo možné porovnat s jiným dostupným kitem.

Z tabulky č. 9 na str. 46 a z tabulky č. 10 na str. 47 je patrné, že genotypy příjemce a jeho dárce se shodují ve všech polymorfizmech amplifikovaných rozdílnými kity. Hledisko kvantitativní je pak vyjádřeno pomocí tabulky č. 11 na str. 47, která je zaměřena na zjištění zastoupení genotypu příjemce v systému LPL - stanovení buněčného chimérismu. Procentuální rozdíly chimérismu získaného systémem PowerPlex[®] CS7 System a *GenePrint*[™] Fluorescent STR Multiplex – FFFL System byly v toleranci.

Na základě provedené validace a výsledkům díky ní získané tak kit PowerPlex[®] CS7 System mohl nahradit kit *GenePrint*[™] Fluorescent STR Multiplex – FFFL System, který se v současné době přestal vyrábět. Byl posouzen i v rámci pravidelné návštěvy ČIA a v současné době se rutinně používá v rámci sledování pacientů po alogenní HSCT.

Obě předchozí validace byly provedeny s kladným výsledkem na rozdíl od validace poslední, která se týkala sekvenčního polymorfismu G42863. Ze získaných výsledků bylo zjištěno, že u většiny vzorků byla hodnota Ct vyšší než 25. V současné době je podle standardního operačního postupu stanoveno, že pacient před alogenní HSCT a jeho dárce nejsou nositeli stanoveného znaku, pokud je hodnota Ct \geq 35.

Naopak jsou nositeli stanoveného znaku, pokud je hodnota $Ct \leq 25$. U většiny vzorků byla hodnota Ct vyšší nebo hraniční. Z tohoto důvodu nebyla tato validace úspěšná. K tomu, abychom ji dokončili, by bylo nutné buď změnit znění standardního operačního postupu a zvýšit tak hodnotu Ct , anebo rozšířit stávající validaci a snažit se docílit snížení získaných Ct hodnot, například změnou teplotním profilu. Z časových důvodů bylo od tohoto procesu upuštěno. Laboratoři se také naskytla příležitost začít používat nový komerčně dodávaný kit pro detekci sekvenčních polymorfizmů, který umožní jednou multiplexní reakcí analyzovat celkem 33 polymorfizmů typu krátké inserce/delece současně.

6. Závěr

1) Validovali jsme kity HLA SuBiTo z nové dodávky a ověřili jsme tak, že jsou vhodné k použití při HLA analýze v akreditované laboratoři.

2) Validovali jsme kit PowerPlex® CS7 System, který tak nahradil *GenePrint™* Fluorescent STR Multiplex – FFFL System.

3) Poslední cíl- validace sekvenčního polymorfismu G42863 - splněn nebyl a řeší se nové možnosti rozšíření panelu informativních polymorfizmů typu krátké inserce/delece v rámci rutinního stanovení buněčného chimérismu u pacientů po alogenní HSCT.

Seznam použitých zdrojů

1. Snustad,P.; Simmons J.M.: *Genetika*. Brno, Masarykova univerzita 2009
2. Musil, J.; Nováková O.: *Biochemie v obrazech a schématech*. Praha, Avicenum 1990
3. Amaratunga, D.; Cabrera J.: *Exploration and Analysis of DNA Microarray and Protein Array Data*. New Jersey, John Wiley & Sons 2004
4. Bednář, J; Kuciel, J.; Vyhnánek, T.: *Genetika*. Brno, Mendelova univerzita 2010
5. Fiala, J.: *Biologie IV: genetika*. 2.vyd. Boskovice, Albert 2006
6. Deonier, C.R.; Tavaré,S.; Waterman,S.M.:*Computational genome analysis: an introduction*. New York, Springer 2005
7. Kučerová, M. a kolektiv: *Úvod do klinické genetiky*. 2.vyd. Praha, Avicenum 1981
8. Pokroky v kriminalistice-sborník příspěvků z mezinárodní konference, Praha 2006, Jiří Straus za kolektiv, ISBN- 80-7251-214-5
9. DNA Chemical structure. V : Wikimedia Commons. [online]. [cit. 2013-08-29]
Dostupné z: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:DNA_chemical_structure.svg
10. Kolektiv autorů : *Biochemie: základní kurs*. 4.vyd. Praha, Karolinum 2009
11. Využití kapilární elektroforézy v rámci forezních molekulárně genetických zkoumání. Praha,2010.[online].[cit.2013-08-22] Dostupné z:
<http://www.natur.cuni.cz/biologie/antropologie/aktuality/szz/pracovni/bakalarske-prace-podzim-2010/grafnetterova/bp> . Bakalářská práce.
12. Chimerism-Testing. V: Seattle Cancer Care Alliance. [online].[cit. 2013-08-27] .
Dostupné z: <http://www.seattlecca.org/Chimerism-Testing.cfm>

13. Vokurka, M.; Hugo, J. a kolektiv: *Velký lékařský slovník*. 9.vyd., Praha, Maxdorf 2009
14. Ferenčík, M.; Rovenský, J.; Shoenfeld, Y; Mat'ha, V.: *Imunitní systém: informace pro každého*. Praha, Grada 2005
15. Zpracování experimentálních dat. V: Praktika z laboratorní techniky biochemie a laboratorní techniky biochemie pro KATA [online]. [cit. 2013-05-26]. Dostupné z: http://www.biolabtech.wz.cz/navody_KATA.pdf
16. HLA Nomenclature. [online]. [cit. 2013-08-27]. Dostupné z: hla.alleles.org/inc/images/naming.png
17. Hána, I.; Ivašková, E.; Dostál, C.: *Hlavní histokompatibilní systém člověka (HLA) a nemoci*. Praha, Avicenum 1982
18. Paternity- cvičení z genetiky [online]. [cit. 2013-08-27]. Dostupné z: <http://kgn.umbr.cas.cz/prednasky/245%20Genetika%20cviceni/Cv13-Paternity.pdf>
19. Litzman, J.; Freiburger, T.; Král, V.; Thon, V. : *Základy vyšetření v klinické imunologii*. Brno, Masarykova univerzita Lékařská fakulta 2007
20. Butler, M. J.: *Forensic DNA typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers* .2.vyd. Burlington Mass, Elsevier academic press 2005
21. Králová, B.; Rauch, P.: *Bioanalytické metody*. 2.vyd. Praha, VŠCHT 1993
22. Turňa, J.; Krčmery, V.; Kettner, M.; Antal, M.; Augustín, J.: *Rekombinantné DNA a biotechnologie*. Bratislava, Alfa 1990
23. Genetický polymorfismus. V : Zdravotně sociální fakulta. Jihočeská univerzita České Budějovice. [online]. ©2013 [cit. 2013-07-3]. Dostupné z: http://www.zsf.jcu.cz/cs/katedra/katedra-klinickych-a-preklinickych-oboru/informace-katedry/informace-pro-studenty/ucebni_texty/zaklady-genetiky-a-poradenstvi/10.pdf/view

24. Primrose, S.B; Twyman, R.M.: *Principles of Gene Manipulation and Genomics*. 17.vyd., Malden, Blackwell Publishing 2006
25. Gerda aneb genetika na koleně. V: Robotika.cz. [online]. [cit. 2013-08-29].
Dostupné z: <http://robotika.cz/articles/gerda/>
26. Stanovení genotypů polymorfních a sex specifických lokusů DNA pro vyšetření buněčného chimerizmu po HSCT (SOP 01). [online]. [cit. 2013-06-17] Dostupné z :
http://www.uhkt.cz/files/nrl-dna/prirucka_odber_prim_vzorku_sop01.pdf
27. Hořejší, V.; Bartůňková, J.: *Základy imunologie*. 4.vyd., Praha, Triton 2009
28. Buckingham, L.; Flaws L.M.: *Molecular Diagnostics: Fundamentals, Methods, & Clinical Applications*. Philadelphia, F.A. Davis Company 2007
29. Coleman, B.W; Tsongalis, J.G.: *Molecular Diagnostic: For the Clinical Laboration*. 2.vydání, New Jersey, Humana Press 2006
30. Lo, Y.,M.,D.; Chiu, K., W., R.; Chan, C., K., A.; *Clinical Application of PCR*. 2.vyd., New Jersey, Humana Press 2006
31. Šmarda, J. ; Doškař, J. ; Pantůček, R.; Růžička, V.; Koptíková, J.: *Metody molekulární biologie*. Brno, Masarykova univerzita 2005
32. Kolektiv autorů: *Kvalimetrie - 7. Validace analytických metod*. Praha, EURACHEM-ČR 1997,
33. Ústavu .In: Ústav hematologie a krevní transfúze [online]. [cit. 2012-09-05].
Dostupné z: <http://www.uhkt.cz/ustav/>
34. Odchylna (bias). In: Nejistoty měření- strategie a přístup [online]. [cit. 2013-06-17].
Dostupné z: <http://www.hplc.cz/Validace/nejistoty.html>
35. Brdička, R., Otáhalová, E, Štambergová, A,Čamajová, J.Analytická validace metod molekulární genetiky určených pro analýzu lidského genomu. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2007, č. 1, s. 58-62.

36. What Is Next – Generation DNA Sequencing. V: Train online. [online]. [cit. 2013-09-02]. Dostupné z: <http://www.ebi.ac.uk/training/online/course/ebi-next-generation-sequencing-practical-course/what-you-will-learn/what-next-generation-dna->
37. Postup pro validaci/verifikaci metody [online]. [cit. 2013-06-11]. Dostupné z: <http://www.naskl.cz/rada/zapisy/doc/POSTUP%20PRO%20VALIDACI%20-%20def..pdf>
38. Doporučení: Validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích. In: Česká společnost klinické biochemie- Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně[online].[cit.2013-06-05].Dostupné z: <http://www.cskb.cz/cskb.php?pg=doporuceni--validace-a-verifikace-metod>
39. Robinson, J., Waller, MJ, Parham, P., de Groot N, Bontrop, R., Kennedy, LJ., Stoehr, P., Marsh SGE: "IMGT/HLA and IMGT/MHC: sequence databases for the study of the major histocompatibility complex." Nucleic Acids Res. (2003), 31:311-314
40. Biochemistry of Polymerase Chain Reaction. In: Lecture 12- The Polymerase Chain Reaction. [online]. [cit. 2013-08-30]. Dostupné z: <http://www.biochem.arizona.edu/miesfeld/teaching/Bioc4712/pages/Lecture12/Lectur>

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka

Příloha A

Tab. 1 - Porovnání alelových párů u vzorku G1, použit kit HLA - SuBiTo B

OR= oblast rozdílu, udává v jaké části genu se daná alela odlišuje od alely v řádce č.1. (**I5**= pátý .intron, **E3**= třetí exon, **E5**= pátý exon). Řádek 1-55 = získané výsledné kombinace alel. Hodnota **Base Calling Score (BCS)** udává kvalitu a čistotu sekvence. **5'**= 5'UTR; 5' nepřekládaná oblast, **L**= rozdíl v symetrii

Analýza ze dne 14.7.2011				Analýza ze dne 21.8.2012		
Kombinace alel				Kombinace alel		
1	B*39:01:01:01	B*39:01:01:01	OR	B*39:01:01:01	B*39:01:01:01	OR
2	B*39:01:01:01	B*39:01:01:01	5'U, I5	B*39:01:01:01	B*39:01:01:02	5'U, I5
3	B*39:01:01:01	B*39:01:03	E5, I5	B*39:01:01:01	B*39:01:03	E5, I5
4	B*39:01:01:01	B*39:01:07	E3			
5	B*39:01:01:01	B*39:03	E3			
6	B*39:01:01:01	B*39:06:01	E3			
7	B*39:01:01:01	B*39:24:01	E3			
8	B*39:01:01:01	B*39:28	E3			
9	B*39:01:01:01	B*39:42	E3			
10	B*39:01:01:01	B*39:51	E3			
11	B*39:01:01:02L	B*39:01:01:02L	5'U, I5	B*39:01:01:02L	B*39:01:01:02L	5'U, I5
12	B*39:01:01:02L	B*39:01:03	5'U,E5,I5	B*39:01:01:02L	B*39:01:03	5'U,E5,I5
13	B*39:01:01:02L	B*39:01:07	5'U,E3,I5			
14	B*39:01:01:02L	B*39:03	5'U,E3,I5			
15	B*39:01:01:02L	B*39:06:01	5'U,E3,I5			
16	B*39:01:01:02L	B*39:24:01	5'U,E3,I5			
17	B*39:01:01:02L	B*39:28	5'U,E3,I5			
18	B*39:01:01:02L	B*39:42	5'U,E3,I5			

19	B*39:01:01: 02L	B*39:51	5'U,E3,I 5			
20	B*39:01:03	B*39:01:03	E5,I5	B*39:01:03	B*39:01:03	E5,I5
21	B*39:01:03	B*39:01:07	E3,E5,I5			
22	B*39:01:03	B*39:03	E3,E5,I5			
23	B*39:01:03	B*39:06:01	E3,E5,I5			
24	B*39:01:03	B*39:24:01	E3,E5,I5			
25	B*39:01:03	B*39:28	E3,E5,I5			
26	B*39:01:03	B*39:42	E3,E5,I5			
27	B*39:01:03	B*39:51	E3,E5,I5			
28	B*39:01:07	B*39:01:07	E3			
29	B*39:01:07	B*39:03	E3			
30	B*39:01:07	B*39:06:01	E3			
31	B*39:01:07	B*39:24:01	E3			
32	B*39:01:07	B*39:28	E3			
33	B*39:01:07	B*39:42	E3			
34	B*39:01:07	B*39:51	E3			
35	B*39:03	B*39:03	E3			
36	B*39:03	B*39:06:01	E3			
37	B*39:03	B*39:24:01	E3			
38	B*39:03	B*39:28	E3			
39	B*39:03	B*39:42	E3			
40	B*39:03	B*39:51	E3			
41	B*39:06:01	B*39:06:01	E3			
42	B*39:06:01	B*39:24:01	E3			
43	B*39:06:01	B*39:28	E3			
44	B*39:06:01	B*39:42	E3			
45	B*39:06:01	B*39:51	E3			
46	B*39:24:01	B*39:24:01	E3			
47	B*39:24:01	B*39:28	E3			
48	B*39:24:01	B*39:42	E3			
49	B*39:24:01	B*39:51	E3			
50	B*39:28	B*39:28	E3			
51	B*39:28	B*39:42	E3			
52	B*39:28	B*39:51	E3			
53	B*39:42	B*39:42	E3			
54	B*39:42	B*39:51	E3			
55	B*39:51	B*39:51	E3			

Base Calling Score= 82 **Base Calling Score= 82**

Tab. 2 - Porovnání alelových párů u vzorku G2, použit kit HLA - SuBiTo B

OR= oblast rozdílu, udává v jaké části genu se daná alela odlišuje od alely v řádku č.1. (**E3**= třetí exon).
 Řádek 1-10 = získané výsledné kombinace alel. Hodnota **Base Calling Score (BCS)** udává kvalitu a čistotu sekvence.

Analýza ze dne 14.7.2011				Analýza ze dne 21.8.2012	
Kombinace alel				Kombinace alel	
1	B*18:01:01	B*18:01:01	OR	B*18:01:01	B*18:01:01
2	B*18:01:01	B*18:14	E3		
3	B*18:01:01	B*18:39	E3		
4	B*18:01:01	B*18:44	E3		
5	B*18:14	B*18:14	E3		
6	B*18:14	B*18:39	E3		
7	B*18:14	B*18:44	E3		
8	B*18:39	B*18:39	E3		
9	B*18:39	B*18:44	E3		
10	B*18:44	B*18:44	E3		
Base Calling Score=83				Base Calling Score=76	

Tab. 3 - Porovnání alelových párů u vzorku G1, použit kit HLA - SuBiTo C

Řádek 1 = získané výsledné kombinace alel. Hodnota **Base Calling Score (BCS)** udává kvalitu a čistotu sekvence.

Analýza ze dne 14.7.2011			Analýza ze dne 21.8.2012	
Kombinace alel			Kombinace alel	
1	C*06:02:01:01	A*06:02:01:01	C*06:02:01:01	A* 06:02:01:01
Base Calling Score= 77			Base Calling Score= 69	

Tab. 4 - Porovnání alelových párů u vzorku G2, použit kit HLA - SuBiTo C

OR= oblast rozdílu, udává v jaké části genu se daná alela odlišuje od alely v řádku č.1. (**I3**= třetí .intron, **I6**= šestý intron, **E7**= sedmý exon). Řádek 1-10 = získané výsledné kombinace alel. Hodnota **Base Calling Score (BCS)** udává kvalitu a čistotu sekvence. **5'UTR**= 5' nepřekládaná oblast

V této tabulce vidíme více výsledků u validace provedené dne 21.8.2012 (novým programem ve stejném softwaru), zatímco u předešlých validací bylo více výsledků u analýz provedených před 21.8.2012 (program neanalyzoval a tím i nevyločil některé sekvence). Důvodem mohla být kvalita vzorku, nebo program analyzoval delší část genu=> více výsledků

Analýza ze dne 30.7.2012				Analýza ze dne 21.8.2012		
	Kombinace alel			Kombinace alel		
1	C*07:02:01:0	C*07:02:01:01	OR	C*07:02:01:01	C*07:02:01:01	OR
	1					
2				C*07:02:01:01	C*07:02:01:01	I2, I6
3	C*07:02:01:0	C*07:02:01:03	I3	C*07:02:01:01	C*07:02:01:03	I3
	1					
4	C*07:02:01:0	C*07:50	E7	C*07:02:01:01	C*07:50	E7
	1					
5				C*07:02:01:02	C*07:02:01:02	I2, I6
6				C*07:02:01:02	C*07:02:01:03	I2,I3, I6
7				C*07:02:01:02	C*07:50	I2,I6, E7
8	C*07:02:01:0	C*07:02:01:03	I3	C*07:02:01:03	C*07:02:01:03	I3
	3					
9	C*07:02:01:0	C*07:50	I3, E7	C*07:02:01:03	C*07:50	I3,E7
	3					
10	C*07:50	C*07:50	E7	C*07:50	C*07:50	E7
	Base Calling Score= 64			Base Calling Score= 63		

Tab. 5 - Porovnání alelových párů u vzorku G1, použit kit HLA - SuBiTo DRB1

Řádek 1 = získané výsledné kombinace alel. Hodnota **Base Calling Score (BCS)** udává kvalitu a čistotu sekvence.

Analýza ze dne 14.7.2011			Analýza ze dne 21.8.2012	
	Kombinace alel		Kombinace alel	
1	DRB1* 11:03	DRB1*11:03	DRB1* 11:03	DRB1*11:03
	Base Calling Score= 83		Base Calling Score= 83	

Tab. 6 - Porovnání alelových párů u vzorku G2, použit kit HLA - SuBiTo DRB1

Řádek 1- 3 = získané výsledné kombinace alel. Hodnota **Base Calling Score (BCS)** udává kvalitu a čistotu sekvence.

Analýza ze dne 14.7.2011		Analýza ze dne 21.8.2011	
Kombinace alel		Kombinace alel	
1	DRB1*07:01:01: 01 DRB1*07:01:01:01	DRB1*07:01:01: 01	DRB1*07:01:01:01
2	DRB1*07:01:01: 01 DRB1*07:01:01:02	DRB1*07:01:01: 01	DRB1*07:01:01:02
3	DRB1*07:01:01: 02 DRB1*07:01:01:02	DRB1*07:01:01: 02	DRB1*07:01:01:02
Base Calling Score= 66		Base Calling Score= 82	