

Externí hodnocení kvality v molekulární biologii

Friedecký B., Plíšková L., Bolehovská R., Palička V.

ÚKBD FN a LF UK Hradec Králové

SOUHRN

Cílem práce je poskytnout přehledné informace o důležitých mezinárodních evropských programech externího hodnocení kvality v molekulární biologii. Jednotlivé důležité programy jsou v článku stručně charakterizovány. Uvádíme spektrum hodnocených vyšetření a pojednáváme o postupech, jakými se hodnocení provádějí. Programy se sice nemohou prokázat takovým stupněm analytické a metrologické exaktnosti jako v klinické biochemii, toxikologii a v dalších oborech laboratorní medicíny, avšak na druhé straně je jejich pojetí mnohem komplexnější zejména v propojení analyticko-technických a klinicko-postanalytických aspektů. Ve sdělení je poukázáno také na edukační význam programů EHK a rovněž na fakt, že odborná způsobilost některých pracovišť, provádějících DNA analýzy, není na dostatečné výši, která by byla potřebná pro efektivitu a správnost těchto vyšetření.

Klíčová slova: externí hodnocení kvality, molekulární biologie, edukace, způsobilost.

SUMMARY

Friedecký B., Plíšková L., Bolehovská R., Palička V.: External quality assessment in molecular biology

This review deals with recent information on important international european programs in molecular biology. We briefly characterize main European schemas for DNA analyses. Also we introduce list of analytes and methods used for assessment. Narrow connection between analytical and postanalytical processes is very important and typical characteristic for these programs. Published results reached in these programs clearly show their necessity as tool for education of laboratory personal. Proficiency of laboratories performed DNA analyses is not enough sufficient.

Key words: external quality assessment, molecular biology, education, proficiency.

Úvod

V listopadu 2007 jsme se pokusili o odhad míry publikační aktivity, týkající se výsledků programů externího hodnocení kvality (EHK) ve světě. Při zadání „EQA in PCR“ na stránkách www.ncbi.nlm.nih.gov (PubMed) jsme našli pouze 18 odkazů týkajících se organizace a výsledků rutinních programů EHK. Údaje v těchto publikacích poskytly zajímavé, avšak nijak optimistické informace o kvalitě vyšetření v molekulární biologii.

Výpověď EHK o kvalitě vyšetření v molekulární biologii

Obecně lze shrnout, že výsledky dosažené v EHK jsou nedostatečně srovnatelné. I srovnatelnost výsledků dosažených v různých laboratořích s použitím identických systémů měření/metod je málo uspokojivá.

V edukačním evropském programu EQUAL mělo 20–30 % účastníků problematické výsledky procesů extrakce a amplifikace DNA, jmenovitě se jedná o nedostatečnou přesnost a/nebo správnost při určení počtu kopií. Dále 20–30 % účastníků chybovalo v hodnocení jednoho nebo více vzorků, dokonce při použití stejného systému (detekční formát TaqMan) s vyloučením účasti metod in house [1, 2].

Italský národní program EHK z roku 2003 klasifikoval pouze u 4 laboratoří výsledky jako excelentní, u 13 jako dobré, u 15 jako akceptovatelné, 3 laboratoře prokázaly špatnou úroveň a 4 další byly označeny jako zcela neakceptovatelné [3]. O dva roky později byla četnost výsledků s nižší než požadovanou kvalitou v tomto systému stále ještě vysoká. Ačkoli účastníci

použili pro analýzu 3 neznámých vzorků stejný analytický systém (TaqMan) včetně primerů a byly jim poskytnuty stejné sady kalibrátorů (cDNA), získané výsledky byly neuspokojivé. 12 účastníků z celkového počtu 42 dosáhlo u všech vzorků požadované přesnosti a pravdivosti, proti tomu stejný počet laboratoří nebyl schopen provést kvantifikaci u materiálu s nejnižším počtem kopií DNA [4].

U sekvenování DNA, kde by bylo apriori možné předpokládat vysokou kvalitu laboratoří, bylo v programu EQUAL dosaženo více než 30% četnosti neuspokojivých výsledků [5].

Problémy se způsobilostí laboratoří jsou pozorovány také u detekcí a genotypizací speciálních virových onemocnění. Při provedení prvního mezinárodního programu EHK pro genotypizaci viru West Nile pouze 27 % laboratoří detekovalo virus ve všech pozitivních vzorcích a 10 % laboratoří mělo dokonce falešně pozitivní výsledky [6].

Velkým problémem, který je opakovaně konstatován při hodnocení výsledků EHK, je nedostatečnost a nekvalita postanalytické interpretační fáze. Často se laboratoře soustřeďují na analytickou techniku (a ani to ne se suverénní úspěšností) a pomíjejí poskytování interpretačních informací [2, 5]. V programu EQUAL, zaměřeném na hodnocení kvality sekvenování PCR produktů [5], neposkytlo více než 30 % účastníků žádná interpretační data k identifikaci genových sekvencí nebo mutací. Stejně problémy s nedostatečností nebo absencí interpretačních dat jsou uváděny např. v komentářích organizátorů cyklů Německé společnosti klinické chemie a laboratorní medicíny (DGKL).

Informace o evropských programech EHK v molekulární biologii

• QCMD (www.qcmd.org)

Program organizují Evropská společnost klinické virologie (ESCV) a Evropská společnost klinické mikrobiologie a infekčních chorob (ESCMID). Účastníkům z přibližně 60 zemí jsou rozesílány panely kontrolních materiálů obsahující 8–12 vzorků. Program používá pestré spektrum matric vzorků, které jsou často používány paralelně v jedné sadě vzorků.

• UKNEQAS (www.ukneqas.org.uk)

Jedná se o EHK pro klinickou molekulární genetiku. Jsou organizovány dva cykly za rok a v každém se rozesílá 4–5 vzorků zhruba 30 účastníkům. Předmětem hodnocení jsou genotypizace, interpretace, administrativní chyby a výsledkové protokoly.

• Instand (www.instand-ev.de)

Organizace zabývající se EHK mikrobiologických metod poskytuje i několik kontrolních cyklů pro molekulárně biologické metody v rámci extrahumánního genomu.

• DGKL (www.dgkl-rfb.de)

Poskytuje 2 odlišné typy programů. Cyklus SQ – sekvenace – se dělí na technickou a lékařskou interpretační část. V technické části se provede sekvenace PCR produktů včetně identifikace sekvencí a mutací. V lékařské části se požaduje provedení interpretace výsledků a doporučení pro ordinujícího lékaře. K příslušným vzorkům jsou dodány kazistiky. Cyklus FV – molekulární biologie – zahrnuje 15 různých panelů, ve kterých se provádějí genotypizace a klasifikace alel klíčových genetických chorob a mutací.

• EQUAL (www.ec-4.org/equal, www.dgkl-rfb.de)

Jedná se o EHK program organizovaný Evropskou unií jako finální část edukačního procesu v molekulární biologii. Zahrnuje 3 různá schémata: EQUAL-qual – kvalitativní PCR, EQUAL-quant – kvantitativní PCR a EQUAL-seq – sekvenace PCR produktů. Rozesílají se vzorky, primery a u kvantitativních měření také kalibrátory.

Kritéria a metody hodnocení výsledků

V řadě případů postačí k hodnocení výsledků EHK kvalitativní stupnice pozitivní/negativní. Z výsledků účastníků EHK lze dobře odhadnout senzitivitu a specifitu testů vyhodnocením počtu falešných pozitivit a negativit (tab. 1). Stále častěji je však vyžadováno kvantitativní hodnocení výsledků, např. z důvodu kontroly průběhu terapie. V tomto případě je možné z výsledků EHK odhadnout a verifikovat hodnoty mezi detekce a stanovitelnosti používaných metod. Jednotkou kvantitativního hodnocení je počet kopií DNA/ml, počet organismů/ml nebo počet IU/ml. Cílovou hodnotou je obvykle průměr výsledků měření účastníků nebo předem daná hodnota. Velikost správného rozmezí hodnot představuje 80% (nebo 95%) interval spolehlivosti, eventuálně interval ohraničený ± 1 SD (± 2 SD). Výsledky v tabulce 2 demonstrují podstatně nižší úspěšnost a vyšší problematičnost kvantitativních měření ve srovnání s kvalitativním hodnocením. Šíře rozpětí počtu kopií DNA, daná 95% intervalem spolehlivosti, se často pohybuje v rozmezí dvou řádů (tab. 3).

Table 1. True positivity (TP) and true negativity (TN) in qualitative in house PCR (example of bacteriology – Programme Instand 2007, introduced in %)

Analyte	TP	TN
<i>Chlamydia trachomatis</i>	93	100
<i>Helicobacter pylori</i>	98	91
<i>Borrelia burgdorferi s.l.</i>	96	100
<i>Legionella pneumophila</i>	87	95
<i>Salmonella enterica</i>	79	100
<i>Listeria spp.</i>	86	100
MRSA	86	90
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	99	98

Velké mezinárodní programy EHK používají k hodnocení způsobilosti laboratoří skórovací systémy. Předmětem hodnocení jsou nejen výsledky měření, ale i jejich interpretace. Jako příklad uvádíme systém hodnocení v programu UKNEQAS, který přiděluje 2 body za správné vyhodnocení vzorku, zatímco za chybné vyhodnocení 0 bodů. V případě panelu s 8 vzorky je

Table 2. Acceptance (%) in quantitative PCR reaction. Example of hepatitis C virus in programme QCMD 2006. % results within 95% confidence interval

Sample	All (n = 117)	Commercial conventional PCP (n = 41)	Commercial real-time (n = 47)	In house real-time (n = 10)	bDNA (n = 17)
1	81.2	78.0	91.5	100.0	64.7
2	95.7	95.1	95.7	90.0	94.1
3	95.7	92.7	95.7	100.0	88.2
4	97.4	97.6	95.7	100.0	94.1
5	53.8	19.5	89.4	60.0	41.2
6	87.2	78.0	97.9	100.0	76.1
7	92.3	92.7	93.6	90.0	100.0

Table 3. Results of quantitative measurement in QCMD EQA programme. 95% confidence interval of HBV DNA (copies number/ml)

Sample	HBV DNA (copies/ml)	
	Lower limit	Upper limit
1	4.44E+04	3.78E+06
2	8.45E+03	4.79E+05
3	1.36E+02	3.88E+04
4	9.11E+02	3.94E+03
5	1.25E+02	3.94E+03
6	7.38E+02	3.78E+04
7	5.36E+03	4.66E+05

maximální počet získaných bodů 16. Při hodnocení genotypizace se požaduje minimálně dosažení 1,6násobku maxima a při hodnocení interpretace minimálně 0,7násobku průměru skóre dosaženého všemi účastníky. Přetrvávající neakceptovatelná kvalita výsledků účastníka je konstatována při méně než třech úspěšných nebo při dvou po sobě následujících neúspěšných cyklech z 6 po sobě jdoucích. V tabulce 4 je demonstrováno, nakolik je doposud technická způsobilost laboratoří vyšší než způsobilost klinická.

Table 4. Demonstration of score in sequencing of PCR products (programme DGKL-2007), 24 participants

	Number of labs total	Number of labs accepted	% of labs accepted/improved
Technical acceptance	24	20	83
Clinical acceptance	24	14	58
Overall acceptance	24	10	42
Significant improvement	16	8	50

Závěr

Přínosem EHK v molekulární biologii je možnost verifikace mezi detekce a stanovenosti, klinické senzitivity a specificity, propojení technického a klinického hlediska. Velký počet zúčastněných laboratoří je umožněn mezinárodním charakterem EHK. Funkční programy EHK mohou být používány jako nástroje monitorování srovnatelnosti, ale také jako prostředky edukace laboratorních pracovníků, s cílem dosáhnout jejich lepší odborné způsobilosti.

V současné době by měla mít každá laboratoř, zabývající se molekulárně biologickými metodami, povinnost účastnit se vhodné EHK. Podle našeho názoru by bylo užitečné preferovat účast ve velkých mezinárodních programech s dostatečným počtem účastníků schopných poskytnout dostatečně robustní statistická data a s možností hodnotit jak výsledky kvalitativní, tak i kvantitativní analýzy. Na druhé straně by měly organizace, zabývající se přípravou EHK cyklů a jejich vyhodnocením, rozšiřovat spektrum

Table 5. List of important analytes assessed in routine EQA programs

Bacteriology	Virology	Human genom
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Cytomegalovirus	Factor V – Leiden
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Epstein-Barr virus	Factor II – Prothrombin
<i>Borrelia burgdorferi s.l.</i>	Hepatitis B virus	MTHFR
<i>Escherichia coli</i>	Hepatitis C virus	Collagen receptor
<i>Bordetella pertussis</i>	Herpes simplex virus	Apolipoprotein E
<i>Helicobacter pylori</i>	Varicella zoster virus	Apo B 100
<i>Legionella pneumophila</i>	Parvovirus B19	Beta-fibrinogen g-455a
<i>Listeria spp.</i>	Papillomavirus	ACE
<i>MRSA</i>	Rhinovirus	Alpha-1-proteinase inhibitor
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Influenza A,B virus	CYP 2D6
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Parainfluenza virus	TPMT
<i>Salmonella enterica</i>	JC/BK virus	Cu transport protein
	West-Nile virus	UDP-glucuronyl transferase
<i>Toxoplasma gondii</i>		VG1 A1
		Cystic fibrosis

nabízených panelů a zároveň poskytovat více informací o vyhodnocení jak analytických, tak i klinických aspektů včetně individuálního hodnocení jednotlivých laboratoří.

Literatura

1. Ramsdon, S. C., Doly, S., Geilenkeuser, W.-J. et al. EQUAL-quant: An international external quality assessment scheme for real-time PCR. *Clin. Chem.*, 2006, 52, p. 1584–1591.
2. Orgando, C., Verderio, P., Maatman, R. et al. EQUALqual: A European program for external quality assessment of genomic DNA extraction and PCR amplification. *Clin. Chem.*, 2007, 3, p. 1349–1357.
3. Raggi, C. C., Pinzani, P., Paradiso, A., Pazzagli, M., Orlando, C. External Quality Assurance Program for PCR Amplification of Genomic DNA: An Italian Experience. *Clin. Chem.*, 2003, 49, p. 782–791.
4. Raggi, C. C., Verderio, P., Pazzagli, M. et al. An Italian program of external quality control for quantitative assay based on real-time PCR with TaqMan probes. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2005, 43, p. 542–548.
5. Ahmad-Nejad, P., Dorn-Beineke, A., Pfeiffer, U. et al. Methodologic European external quality assurance for DNA sequencing: The EQUALseq Program. *Clin. Chem.*, 2006, 52, p. 716–727.
6. Niedrig, M., Linke, S., Zeller, H., Drosten, C. First international proficiency study on West Nile virus molecular detection. *Clin. Chem.*, 2006, 52, p. 1851–1854.

Do redakce došlo 5. 12. 2007.

Adresa pro korespondenci:
RNDr. Bedřich Friedecký, Ph.D.
ÚKBD FN a LF UK Hradec Králové, Sokolská 581
500 05 Hradec Králové
e-mail: friedecky@sekk.cz