

Postanalytické aspekty EHK v molekulární biologii extrahumánního genomu

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

Ústav klinické biochemie a diagnostiky LF a FN Hradec Králové

SOUHRN

Externí kontrola kvality (EHK) v molekulární biologii extrahumánního genomu se postupně zavádí a procesy standardizace a návaznosti často zaostávají za možnostmi a potřebami moderních vyšetřovacích postupů. V molekulární biologii ale bohužel neexistují referenční metody a referenční materiály, proto není možné zjišťovat návaznost metod. Přesto je snahou každé laboratoře vydávat správné a přesné výsledky. Zásadním pomocníkem v této snaze je EHK, která je zajišťována na mezinárodní úrovni QCMD a INSTAND e.V. a v rámci České republiky některými Národními referenčními laboratořemi. EHK poskytuje laboratořím možnost ověřit si správnost a přesnost výsledků a porovnat je s výsledky ostatních zúčastněných laboratoří, dále zjistit nebo ověřit citlivost metody. Výsledky EHK by každá laboratoř měla podrobně a důsledně zhodnotit a v případě chyb reagovat úpravou nebo změnou PCR metody. EHK může laboratoře také inspirovat při vytváření podobných kontrolních systémů pro vnitřní kontrolu kvality. V rámci EHK však nedochází ke kontrole postanalytické fáze a klinické interpretace. Tu si každá laboratoř provádí individuálně podle svých možností a znalostí s velmi variabilní úrovní.

Klíčová slova: externí kontrola kvality, vnitřní kontrola kvality, PCR, cut-off.

SUMMARY

Bolehovská R., Plíšková L., Friedecký B., Palička V.: Postanalytical aspects of EQA in molecular biology of extrahuman genome

External quality control (EQC) in molecular biology of extrahuman genome is subsequently introduced and processes of standardization and sequence often fall short of possibility and needs of modern investigative procedures. However, in molecular biology there are no available reference methods and materials and that is why it is not possible to investigate with sequence of methods. Nevertheless every laboratory tries to make right and exact results. Basic aid of this endeavour is EQC, which is supported on international level by QCMD and INSTAND e.V., and within the Czech Republic some of National reference laboratories. EQC provides to laboratories the possibility of correctness and accuracy verification of results and comparison with results of other participated laboratories. Further EQC determines or verifies sensitivity of method. Every laboratory should have in detail and thoroughly reviewed the results of EQC and in case of the mistakes responds by adjustments or changes in PCR method. EQC is able to inspire the laboratory to creation of similar control systems for internal quality control. However, the part of EQC is not the verification of post-analytical phase and clinical interpretation. This phase is provided individually by each laboratory to the best of possibility and knowledge with very variable level.

Key words: external quality control, internal quality control, PCR, cut-off.

Úvod

Klinická biochemie má již desítky let vypracovaný systém kontroly kvality včetně procesů standardizace a návaznosti měření. Oproti tomu v molekulárně biologických laboratořích pro extrahumánní genom se externí kontrola kvality postupně zavádí a procesy standardizace a návaznosti často zaostávají za možnostmi a potřebami moderních vyšetřovacích postupů. Přesto je snahou každé laboratoře vydávat správné a přesné výsledky, na které se může lékař spolehnout. Je proto nutné definovat základní požadavky na molekulárně biologickou metodu, zejména polymerázovou řetězovou reakci (PCR). Pro vydávání analyticky validních výsledků je tedy třeba zajistit správnost, přesnost a citlivost metody. Pomocníky pro splnění těchto parametrů jsou externí kontrola kvality (EHK), vnitřní kontrola kvality (VKK) a v neposlední řadě i důkladná validace metody včetně izolace nukleových kyselin (NK).

V posledních letech se ukazuje jako velmi důležitá postanalytická fáze, zejména klinická interpretace výsledků. Interpretace je ale na velmi variabilní úrovni,

neboť vždy závisí na individuálních znalostech a možnostech každého pracovníka.

Externí kontrola kvality (EHK)

Základní otázkou je: „Proč provádět EHK?“, „Co laboratoř přináší a umožňuje?“ Každá laboratoř vážící nad prováděním EHK by si měla uvědomit, že jde o jediný opravdu objektivní nástroj zjištění správnosti výsledků PCR metody v extrahumánním genomu. Problém těchto metod totiž spočívá v tom, že neexistují nejen referenční metody, ale rovněž certifikované referenční materiály. To znamená, že není možná návaznost PCR metod až na SI jednotky, tj. používané kalibrátory mají neznámou nejistotu.

EHK je tedy jediným nástrojem mezilaboratorního porovnání, tj. postavení dané laboratoře mezi ostatními. Poskytuje tak možnost ověřit si správnost a přesnost svých výsledků, dále zjistit nebo ověřit si citlivost a specifitu metody, popř. využít vzorky pro stanovení opakovatelnosti a mezilehlé přesnosti dané PCR meto-

dy. Výsledky EHK by si každá laboratoř měla podrobně a důsledně zhodnotit a v případě chyb ve správnosti či citlivosti metody reagovat úpravou nebo úplnou změnou PCR.

EHK je v rámci extrahumánního genomu zajišťována na mezinárodní úrovni, zejména QCMD (Quality Control for Molecular Diagnostics) a INSTAND e.V., v rámci České republiky některými národními referenčními laboratořemi. Přesto jednotlivé společnosti provádějící EHK mají různou úroveň kvality.

QCMD (Quality Control for Molecular Diagnostics, www.qcmd.org)

QCMD vznikla v letech 2000–2001 jako pokračovatel QCCA (Quality Control Concerted Action) iniciativy podporované Evropskou unií a také Evropskou společností klinické virologie (ESCV) a Evropskou společností klinické mikrobiologie a infekčních chorob (ESCMID). Vznik této organizace dal základ pro expanzi aktivit v rámci kontroly kvality v molekulární biologii extrahumánního genomu v globálním měřítku. V roce 2010 nabízí společnost QCMD 41 kontrolních panelů pro 34 patogenů. Pro některé patogeny (např. HCV, HBC, *Chlamydia trachomatis*) pořádá dva kontrolní panely za rok, některé panely kontrolují dva patogeny zároveň (např. JC viry a BK viry, *Chlamydia pneumoniae* a *Mycoplasma pneumoniae*). Každý rok jsou zařazovány pilotní (nové) panely pro další patogeny (v roce 2010 např. pro průkaz DNA *Aspergillus* spp.).

Jednotlivých kontrolních cyklů se účastní od 60 do 230 laboratoří z celého světa, což zaručuje vyšší výpovědní hodnotu těchto EHK. Jeden panel obsahuje vždy 8–12 vzorků, které jsou vytvořeny pomocí různých matric (kromě různých pufrů a transportních médií také plazma, výtěr, moč, plodová voda a další) často používaných paralelně. Použití reálných matric tak zajišťuje větší komutabilitu vzorků. QCMD velice často zařazuje do svých kontrolních panelů i vzorky o velmi nízkých koncentracích, díky kterým mohou laboratoře velice snadno určit nebo ověřit citlivost vlastních PCR metod. Jedinou nevýhodou této EHK je vyšší pořizovací cena kontrolních panelů, obvykle okolo 330 euro.

Každý účastník na závěr obdrží list se správnými výsledky a s celkovým zhodnocením, ve kterém jsou výsledky rozebrány celkově a podle používaných metodik a technologií, a individuální report. Vyhodnocení kvalitativních výsledků probíhá pomocí skórovacích systémů, kdy správnému výsledku je přiděleno 0 bodů, v případě chyby (falešné negativity) jsou u silně pozitivního vzorku přiděleny 3 body, u pozitivního 2 body a u slabě pozitivního vzorku 1 bod. Falešně pozitivní výsledky jsou ohodnoceny 3 body, tzn. nejlépe je hodnocena laboratoř se skórem 0. Každá laboratoř má ve svém individuálním zhodnocení (obr. 1) uvedeno své celkové skóre a v příloženém sumárním grafu je možné velice snadno zjistit, kolik laboratoří tohoto skóre dosáhlo, tj. zjistit postavení laboratoře mezi ostatními, včetně procentuálního zastoupení pro jednotlivá skóre. V případě kvantitativních výsledků se hodnocení provádí pomocí intervalů směrodatných odchylek (SD) od průměrné hodnoty všech laboratoří. Výsledky v intervalu ± 1 SD jsou

ohodnoceny 0 body, v ± 2 SD jedním bodem, v ± 3 SD 2 body a nad interval ± 3 SD 3 body. Na základě získaných bodů je vypočteno celkové skóre, kdy nejlepší je nulový počet bodů, a vytvořeno podobné individuální zhodnocení (obr. 2) jako u kvalitativního zhodnocení.

INSTAND e.V. (Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien e.V., www.instandev.de)

Vysoce žádané programy EHK byly zahájeny v roce 2002 German Society of Hygiene and Microbiology (DGHM) a v současné době jsou organizovány společností INSTAND e.V. Její programy jsou nyní využívány celosvětově, a proto jsou od r. 2008 výsledkové zprávy zasílány také v angličtině, a ne pouze v němčině.

Tato německá společnost zajišťuje EHK pro biochemii, imunologii, hematologii, molekulární genetiku, TDM a toxikologii a v neposlední řadě i pro mikrobiologii. V rámci mikrobiologie nabízí také několik kontrolních cyklů pro molekulárně biologické metody extrahumánního genomu. Pro rok 2010 INSTAND vytvořil 28 panelů pro 29 patogenů a 1 panel pro detekci enterovirové RNA v kombinaci s kultivací a typizací. Jednotlivých kontrolních cyklů se účastní od 10 do 160 laboratoří z celého světa, tzn. že výpovědní hodnota je ovlivněna počtem účastníků jednotlivých cyklů EHK. Jeden panel obsahuje vždy pouze 4 vzorky, které obsahují proteiny, bakterie a lidské buňky, ale jejich komutabilita je neznáma. Vzorky navíc mají oproti QCMD vyšší koncentraci hledaných patogenů. Pořizovací cena těchto cyklů EHK je nižší než u QCMD. Správné výsledky obdrží každý účastník až spolu s celkovým zhodnocením, individuální zhodnocení tato společnost neprovádí.

EHK na republikové úrovni provádí pouze některé národní referenční laboratoře (NRL) při Státním zdravotním ústavu. Každoročně se tak provádí EHK pro detekci DNA hepatitidy B, cytomegaloviru, herpes-simplex viru, varicella zoster viru, papilomavirů a detekci RNA hepatitidy C. Úroveň jednotlivých EHK se liší v závislosti na NRL, která je připravuje a vyhodnocuje. Počet vzorků se pohybuje mezi 4–8, pořizovací cena je okolo 4000 korun.

U žádných z dostupných EHK není součástí postanalytická fáze, zejména klinická interpretace. Každá laboratoř by si proto navíc měla provádět zhodnocení svých EHK výsledků se zohledněním potřebných požadavků na metodu, nejvíce na citlivost, a také skladbu pacientů, u kterých daná vyšetření provádí. EHK může laboratoře také inspirovat při vytváření podobných kontrolních systémů pro vnitřní kontrolu kvality, zejména pro real-time PCR metody.

Vnitřní kontrola kvality (VKK)

Všechny PCR metody, standardní nebo nested PCR, ale i real-time PCR, by měly být vždy kontrolovány pomocí pozitivní a negativní kontroly. Pozitivní kontrola zajišťuje správnost průběhu amplifikace, negativní umožňuje zjistit případné kontaminace chemikálií pro

1. Analysis of your laboratory's Qualitative EQA data

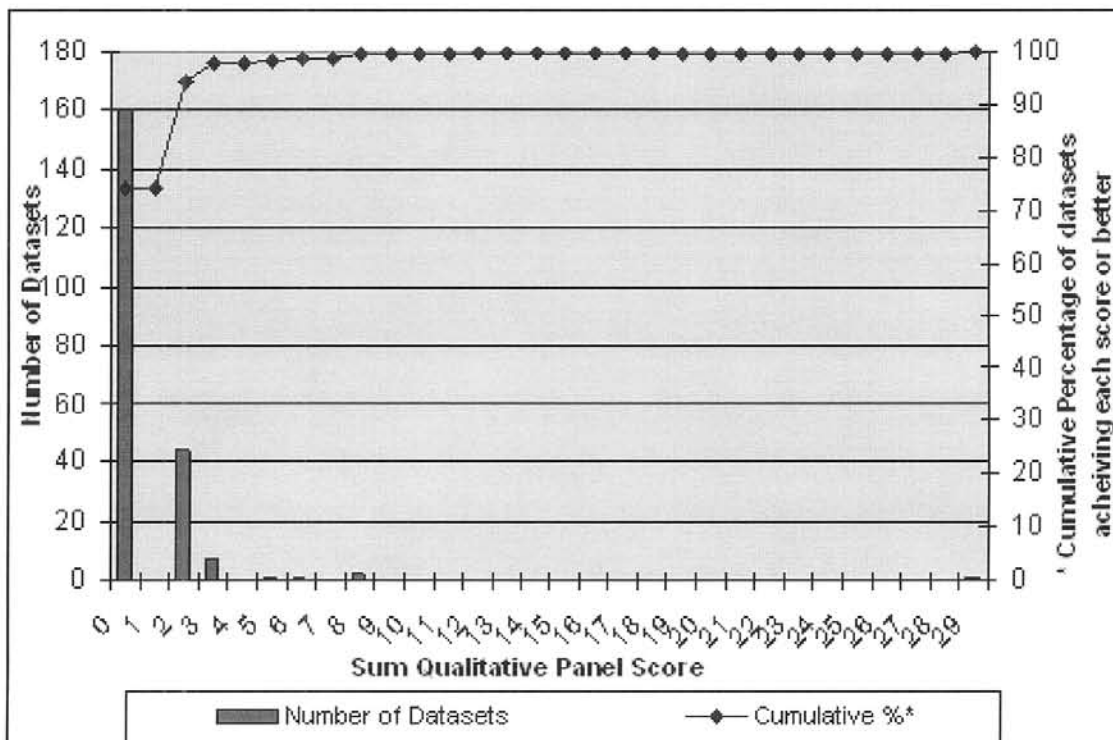
Dataset code : 1

Date Submitted : 27 MAY 08

Table 2: Your laboratory's qualitative results and performance scores

Sample	Sample Content	Qualitative		
		Sample Status	Your qualitative result	Your qualitative score
CMV08-08	CMV (Strain AD169)	Strong Positive	positive	0
CMV08-01	CMV (Strain AD169)	Strong Positive	positive	0
CMV08-10	CMV (Strain AD169)	Strong Positive	positive	0
CMV08-07	CMV (Strain AD169)	Strong Positive	positive	0
CMV08-04	CMV (Strain AD169)	Strong Positive	positive	0
CMV08-02	CMV (Strain AD169)	Strong Positive	positive	0
CMV08-09	CMV (Strain AD169)	Strong Positive	positive	0
CMV08-05	CMV (Strain AD169)	Positive	positive	0
CMV08-03	CMV Negative	Negative	negative	0
CMV08-06	CMV Negative	Negative	negative </td <td>0</td>	0
Sum Qualitative Panel Score				0

Figure 1: Sum Qualitative Panel Scores for all participants



The number of Qualitative datasets analysed : 216
 The sum of the Qualitative Panel Score for your dataset is : 0
 This maximum score was achieved by : 74.1 % of all datasets

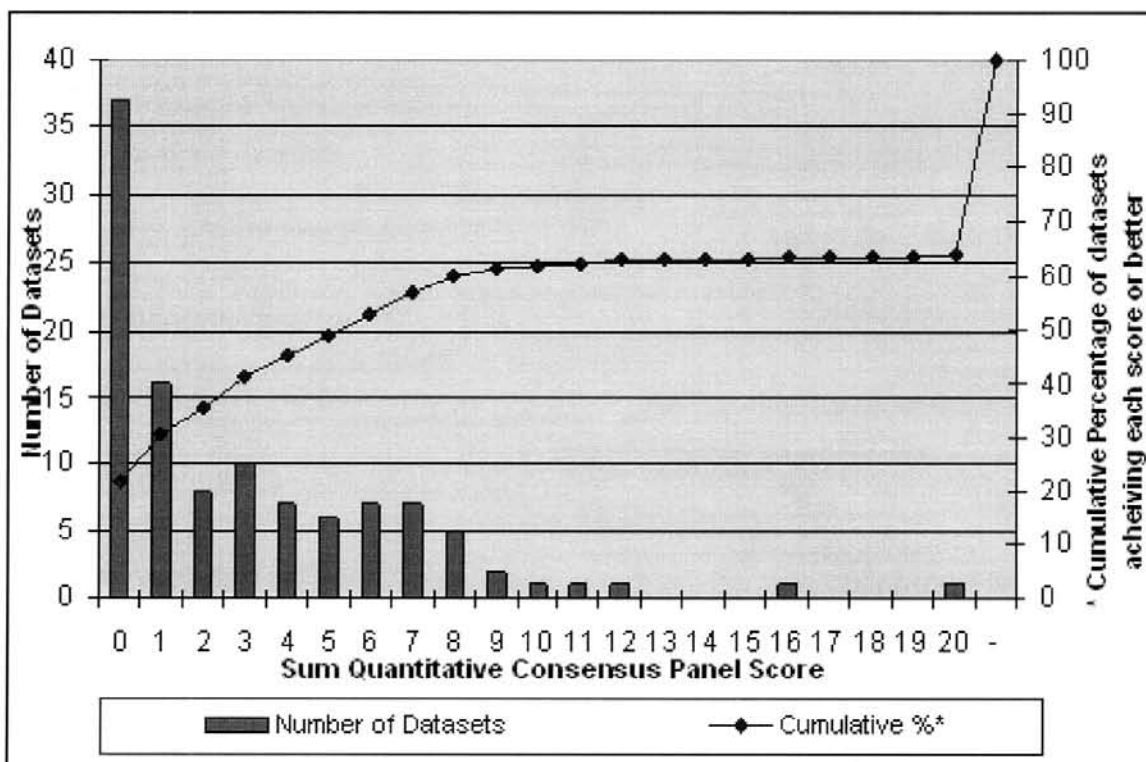
Fig. 1. Individual report of qualitative results for one participant

2. Analysis of your laboratory's Quantitative EQA data

Table 3: Your laboratory's quantitative results and performance scores

Sample	Sample Content	Quantitative		
		Your Result (log)	Your Consensus score	Your Technology score
CMV08-08	CMV (Strain AD169)	6.422	0	0
CMV08-01	CMV (Strain AD169)	5.601	0	0
CMV08-10	CMV (Strain AD169)	4.590	0	0
CMV08-07	CMV (Strain AD169)	4.520	0	0
CMV08-04	CMV (Strain AD169)	3.555	0	0
CMV08-02	CMV (Strain AD169)	3.182	0	0
CMV08-09	CMV (Strain AD169)	2.973	0	0
CMV08-05	CMV (Strain AD169)	2.447	0	0
Sum Quantitative Panel Score			0	0

Figure 2: Sum Quantitative Consensus Panel Scores for all participants



The number of Quantitative datasets analysed : 172
 The sum of the Quantitative Consensus Panel Score for your dataset is : 0
 This maximum score was achieved by : 21.5 % of all datasets

Fig. 2. Individual report of quantitative results for one participant

přípravu reakčních směsí nebo tzv. cross kontaminaci produkty předešlých PCR reakcí. V dnešní době je také nepostradatelnou součástí inhibiční kontrola, pomocí které se zjišťuje případná přítomnost inhibitorů Taq DNA polymerázy, jako např. heparin, etanol a další, v každém analyzovaném vzorku. Tímto způsobem je možné zamezit vydávání falešně negativních výsledků. Všechny tři kontroly jsou tedy minimem, ale i maximem VKK u PCR metod.

Přesto u real-time PCR metod kvalitativních nebo kvantitativních vždy získáváme určité hodnoty, absolutní nebo hodnotu threshold cyklu (Ct), které je možné vyhodnotit. Pro vyhodnocení je však nutnou podmínkou odečet výsledků za stejných podmínek – u kvantitativních metod tzn. odečet na základě kalibrační křivky, v případě kvalitativních metod si musí laborať určit parametry odečtu (např. threshold), které bude vždy dodržovat. Vzhledem k tomu, že pro molekulárně biologické metody neexistuje referenční materiál a není deklarována nejistota kvantifikovaných standardů, je vhodné si vytvořit tzv. směsné kontroly a na ně aplikovat vlastní pravidla VKK. Ta je hlavním pomocníkem sledování rozdílů mezi jednotlivými běhy PCR, což umožňuje sledovat přesnost metody. Na základě VKK si v naší laboratoři můžeme určit chybovost metody pomocí konsenzuálního rozmezí půl a jednoho řádu pro směsnou kontrolu u všech real-time metod. Při sledování variability směsné kontroly jsme vycházeli z hodnocení QCMD, tj. hodnotíme rozptyl jedné, dvou a tří směrodatných odchylek od průměru směsné kontroly. Sledování variability nám umožňuje zjistit, zda se něco neděje s metodou nebo s používanou směsnou kontrolou. Nejčastěji tak zjišťujeme, že po čase dochází ke zhoršení variability z důvodu zhoršení stability směsné kontroly, kterou je pak nutné změnit.

Důkladná VKK všech PCR metod s sebou nese i možnost sledování neshod. V naší laboratoři jsme za 26 měsíců zaznamenali 88 záznamů, které jsme dále rozdělili do několika skupin. První skupinu tvořily neovlivnitelné chyby, kterých bylo 46, tj. 52,3 %. Jedná se o chyby, které nelze předem předpokládat a nelze je tedy odstranit (např. nestabilní pozitivní nebo směsná kontrola, nestabilita primerů, eventuálně sondy apod.). Druhou skupinou byly chyby ovlivnitelné (40 záznamů, tj. 45,5 %), většinou se jednalo o subjektivní chyby při přípravě reakčních směsí PCR. V jednom případě se nám nepodařilo chybu přesně definovat a jedenkrát bylo vyšetření opakováno se stejným výsledkem, tedy nejednalo se o neshodu. Po vyhodnocení všech záznamů jsme zjistili, že počet neshod se v čase snižuje. Vysvětlením může být dlouhodobá neměnnost kolektivu a zvyšující se pracovní odbornost a zručnost laborantek naší laboratoře. Důležitou roli hraje i přechod od pracovně náročnějších nested PCR k real-time PCR.

Rozhodovací meze, cut-off

Pokud má laborať plně validované a dostatečně citlivé metody, vypracovaný fungující a správný systém EHK a VKK, pak může říci, že její kvalitativní a kvantita-

ktivní výsledky jsou přesné a správné, tedy že analytické hledisko výsledku je v pořádku. Může ale laborať říci, že její výsledky jsou validní? Co klinické hledisko výsledku – postanalytická fáze a klinická interpretace? Klinické hledisko je závislé na několika faktorech, a to na typu onemocnění, druhu patogenu, vyšetřovaném materiálu, klinickém stavu pacienta a na stavu jeho imunity.

Pozitivní výsledek PCR u některých infekcí (bakteriální meningitida, herpetická encefalitida atd.) klinicky koreluje s onemocněním, a je proto ihned zahájena odpovídající terapie. Lze tedy říci, že výsledek je validní a důkladná klinická interpretace není nutná. U těchto onemocnění je zbytečné hledání rozhodovacích mezí, respektive klinických cut-off, protože pozitivita vždy znamená onemocnění.

Naopak u jiných infekcí pozitivní výsledek PCR nemusí vždy znamenat onemocnění. V těchto případech hraje roli i druh mikroorganismu, vyšetřovaný materiál a klinický stav, respektive stav imunitního systému pacienta. Uvádíme několik příkladů.

U infekcí způsobených herpes-simplex virem (HSV typ 1 a HSV typ 2) se interpretace pozitivního výsledku PCR liší podle vyšetřovaného materiálu. V případě likvoru postačuje pouze průkaz HSV DNA pomocí PCR metody s vysokou citlivostí, není nutná kvantifikace a znalost cut-off mezí. Při zjištění pozitivitě HSV DNA v bronchoalveolární laváži (BAL) nebo krvi je kvantifikace velmi užitečná. Velkou roli hraje také stav imunity pacienta. U imunokompetentních pacientů se klinický cut-off (rozdílovací mez pro korelaci s onemocněním) pohybuje okolo 100 000 kopií HSV DNA/ml. U imunosuprimovaných pacientů je tento cut-off posunut k nižším hodnotám okolo 1000 kopií/ml. V některých případech je sledování kvantity, tzv. viral load (např. u cytomegalovirové infekce) velmi důležité nejenom z důvodu monitorování úspěšnosti léčby, ale i z důvodu odhalení rizika rezistence na antivirovou léčbu.

Druhým příkladem je vyšetření DNA chronické hepatitidy B (HBV) a RNA chronické hepatitidy C (HCV) ve stejném biologickém materiálu – séru. U obou hepatitid existují klinická cut-off pro zahájení léčby, ale také meze detekce, které jsou pro laboraře závazné a jsou uvedeny v doporučených postupech České hepatologické společnosti a Společnosti infekčního lékařství ČLS JEP [1, 2]. U HBV obecně platí, že by se mělo uvažovat o léčbě při kvantitě vyšší než 2000 IU/ml (tj. 10 000 kopií HBV DNA/ml), při kvantitě 20000 IU/ml je léčba vždy zahájena. Navíc kvantifikace HBV DNA umožňuje odlišit různé fáze chronické hepatitidy B, ale i prognózu tohoto onemocnění. U HBV je sledování vývoje kvantity DNA také důležité z důvodu rizika vzniku rezistence na určitou léčbu, která je při jejím zjištění změněna. U HCV je cut-off 50 IU/ml a jakákoliv zjištěná kvantita znamená onemocnění, v tomto případě musí laborať použít velmi citlivé metody s citlivostí, respektive mezí detekce okolo 20–25 IU/ml. Kvantifikace HCV RNA se provádí zejména pro sledování účinnosti léčby ve 12. týdnu, ale ne pro odhalení rezistencí, které nejsou u HCV zatím popsány.

Třetím příkladem jsou infekce způsobené oportunními mikroorganismy jako např. koaguláza-negativní stafylokoky, *Pneumocystis carinii*, *Aspergillus spp.* a další. U těchto patogenů hraje velmi důležitou roli imunitní stav pacienta a vyšetřovaný materiál. U infekcí způsobených vláknitými houbami rodu *Aspergillus*, zejména u hematoonkologických pacientů, je pozitivní výsledek PCR v krvi velmi závažný a antimykotická terapie ihned zahájena. V tomto případě není nutná kvantifikace, ale PCR metoda by měla být co nejcitlivější. Naopak v případě vyšetření bronchoalveolární laváže, která se zdá být velmi vhodná pro zjištění plicní aspergilózy, je nutná kvantifikace. Aspergilové infekce vznikají primárně jako vzdušné plicní infekce a pouze sekundárně se rozšiřují do krevního řečiště v závislosti na imunokompetenci hostitele [3]. Nevýhodou tohoto materiálu je riziko kontaminace vzdušnými spórami a zejména možnost detekce aspergilové DNA i při kolonizaci dýchacích cest, která by při kvalitativním vyšetření s pozitivním výsledkem mohla být označena jako falešně pozitivní. V BALech je proto prospěšné provádět kvantitativní vyšetření a ve spolupráci s klinickým lékařem stanovit rozhodovací meze, cut-off pro zahájení antimykotické terapie. Naše laboratoř si ve spolupráci s klinickým pracovištěm vytvořila rozhodovací meze pomocí ROC analýzy, na jejímž základě jsme určili následující meze: jako nezajímavý nález je označena hodnota do 130 kopií aspergilové DNA/ml, kvantita od 130 do 330 kopií/ml svědčí o možné kolonizaci, hodnota od 330 do 2 700 kopií/ml je definována jako možná invazivní aspergilóza (IA), od 2 700 do 30 000 kopií/ml jako pravděpodobná IA a nad 30 000 kopií/ml jako prokázaná IA.

Spolupráce s klinickým pracovištěm je velmi důležitá, neboť znamená pro laboratoř zpětnou vazbu, o výsledcích je tak možné diskutovat a domlouvat se na dalším postupu ve vyšetřování. Rozhodovací meze na základě ROC analýzy si laboratoř není schopna vytvořit sama, neboť je nutné provést zpětné zhodnocení PCR

výsledků se závěrečným klinickým nálezem. Úzká spolupráce laboratoře a lékaře je prospěšná, nejvíce však pro samotné pacienty.

Závěr

Všechny laboratoře se snaží vydávat kvalitní výsledky. Je proto nutné neustále se zamýšlet nad jejich správností a přesností, kterou je možné kontrolovat pomocí systémů externí a vnitřní kontroly kvality. Navíc, všechny PCR metody je potřebné před jejich prvním rutinním použitím důkladně validovat. Pro vydávání plně validních výsledků je přesto důležité nepodceňovat klinické hledisko, neboť vytvořením rozhodovacích mezí a případnou interpretací můžeme lékařům usnadnit orientaci v PCR výsledcích.

Literatura

1. **Husa, P., Plíšek, S., Šperl, J. et al.** Diagnostika a léčba chronické hepatitidy B, doporučený postup. *Klin. Mikrobiol. Infec. Lek.*, 2009, 15, 2, s. 65–76.
2. **Urbánek, P., Husa, P., Galský, J. et al.** Standardní diagnostický a terapeutický postup chronické infekce virem hepatitidy C (HCV). *Čas. Lék. čes.*, 2008, 147, 5, s. 1–12.
3. **Buchheidt, D., Baust, C., Skladny, H. et al.** Clinical evaluation of a polymerase chain reaction assay to detect *Aspergillus* species in bronchoalveolar lavage samples of neutropenic patients. *Br. J. Haematol.*, 2002, 116, 4, p. 803–811.

Do redakce došlo 18. 12. 2009.

Adresa pro korespondenci:

Mgr. Radka Bolehovská

Fakultní nemocnice Hradec Králové

Ústav klinické biochemie a diagnostiky LF UK a FN

Sokolská 581

500 05 Hradec Králové

e-mail: bolehrad@fnhk.cz