

EHK – 698 a 699 Stanovení HBV DNA a HCV RNA

Pavel Fritz

Charakteristika sérií EHK 698 a 699 a způsob hodnocení

Série EHK–698 byla určena pro stanovení přítomnosti DNA viru hepatitidy B, série EHK–699 pro stanovení RNA viru hepatitidy C. Obou sérií se účastnilo celkem 25 laboratoří, z nichž jedna testovala pouze HCV-RNA a zbývajících 24 oba markery.

Obě série tvořilo shodně 6 vzorků, z nichž 3 byly pozitivní a 3 negativní. Objem vzorků činil cca 1,75 ml lidského séra nebo plazmy.

Trojice pozitivních vzorků byly připraveny vždy z jednoho pozitivního séra, naředěného v negativní plazmě na různou konečnou koncentraci cílového markeru. Nejslabší pozitivní vzorky u obou sérií (vzorek č. 2 v sérii EHK–698 a vzorek č. 5 v sérii EHK–699) sloužily účastníkům k ověření citlivosti používaných metod a nebyly součástí bodového hodnocení. U zbývajících vzorků znamenal každý neshodný výsledek pro účastníka hodnocení „laboratoř neuspěla“.

Tabulka 1: SOUHRNNÉ VÝSLEDKY EHK–698 A EHK–699

Pořadové číslo	HBV-DNA						HCV-RNA					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
	N	+	N	+++	N	++	N	N	++	N	+	++
1-NRL	N	P	N	P	N	P	N	N	P	N	P	P
2	N	N	N	P	N	P	N	N	P	N	N	P
3	N	P	N	P	N	P	N	N	P	N	N	P
4	N	P	N	P	N	P	N	N	P	N	P	P
5	N	P	N	P	N	P	N	N	P	N	P	P
6	N	P	N	P	N	P	N	N	P	N	P	P
7	N	P	N	P	N	P	N	N	P	N	P	P
8	N	P	N	P	N	P	N	N	P	N	P	P
9	N	P	N	P	N	P	N	N	P	N	P	P
10	N	P	N	P	N	P	N	N	P	N	P	P
11	N	P	N	P	N	P	N	N	P	N	P	P
12	N	P	N	P	N	P	N	N	P	N	P	P
13	N	P	N	P	N	P	N	N	P	N	P	P
14	N	P	N	P	N	P	N	N	P	N	P	P
15	N	P	N	P	N	P	N	N	P	N	P	P
16	N	P	N	P	N	P	N	N	P	N	P	P
17	–	–	–	–	–	–	N	N	P	N	P	P
18	N	N	N	P	N	P	N	N	P	N	N	P
19	N	P	N	P	N	P	N	N	P	N	P	P
20	N	P	N	P	N	P	N	N	P	N	P	P
21	N	P	N	P	N	P	N	N	P	N	P	P
22	N	P	N	P	N	P	P	P	P	P	P	P
23	N	P	N	P	N	P	N	N	P	N	P	P
24	N	P	N	P	N	P	N	N	P	N	P	P
25	N	P	N	P	N	P	N	N	P	N	P	P
26	N	P	N	P	N	P	N	N	P	N	P	P

(P = pozitivní, N = negativní)

V záhlaví tabulky je uveden cílový marker, číslo vzorku a správný výsledek (pozitivní vzorky jsou v záhlaví prezentovány jedním až třemi křížky podle koncentrace cílového markeru). Problematické výsledky jsou vybarveny šedě. Vzorky nebyly individuálně kódovány, takže jejich čísla v tabulce jsou shodná s čísly, pod kterými je laboratoře vyšetřovaly. Pořadová čísla laboratoří v tabulce nemají souvislost s jejich zavedenými kódy v EHK. NRL pro VH je v tabulce uvedena pod č. 1.

Vzorky byly distribuovány v NRL-VH od 12. do 22. 4. 2011, konečným termínem pro odevzdání výsledků byl 14. 5. 2011.

Koncentrace cílových markerů u pozitivních vzorků

V případě série EHK–698 činily koncentrace HBV-DNA naměřené v NRL-VH zhruba $2,2 \times 10^2$ IU/ml (vzorek 2), $1,2 \times 10^3$ (vzorek 6) a $1,6 \times 10^4$ (vzorek 4). V sérii EHK-699 činily naměřené koncentrace HCV-RNA zhruba $2,3 \times 10^2$ IU/ml (vzorek 5), $1,9 \times 10^3$ (vzorek 6) a $2,6 \times 10^3$ (vzorek 3). Výsledky získané v referenční laboratoři by však neměly být chápány jako přesný standard. Při stanovování koncentrace nukleových kyselin metodou PCR je přirozený určitý rozptyl hodnot v závislosti na typu použité soupravy a dalších specifických podmínkách.

Kvantitativní hodnoty, získané všemi účastníky, jsou shrnuty v tabulkách 2–3 (Národní referenční laboratoř pro virové hepatitidy figuruje v těchto tabulkách pod číslem 1).

Přestože nejslabší pozitivní vzorky (v obou případech zhruba 2×10^2 IU/ml) nebyly hodnoceny, je třeba uvést, že za hranici dobré citlivosti metod pro oba typy nukleových kyselin se v současnosti považuje koncentrace cílového markeru řádově okolo 50 IU/ml. Nelze proto vyloučit, že v příštích sériích bude hranice tolerance výrazně posunuta a současná koncentrace, použitá u nejslabších vzorků, se ocitne již v bodovaném pásmu.

Celkové výsledky laboratoří

Série EHK–698 a EHK–699 se vyznačovaly nízkým počtem chybujících (celkové rozložení chyb viz tabulka 1).

U bodovaných vzorků chybovala pouze jediná laboratoř (poř. č. 22), která vykazovala zásadní systémový problém při detekci HCV-RNA, když v sérii EHK699 označila všechny tři negativní vzorky za pozitivní, navíc s extrémně silnou koncentrací cílového markeru (od $1,6 \times 10^5$ do $1,8 \times 10^6$). Výsledky u trojice pozitivních

Tabulka 2: KVANTITATIVNÍ VÝSLEDKY HBV-DNA (EHK–698)

Pořad. číslo laboratoře	1	2	3	4	5	6	jednotky
	N	+	N	+++	N	++	
1-NRL	N	$2,25 \times 10^2$	N	$1,57 \times 10^4$	N	$1,25 \times 10^3$	IU/ml
2	N	N	N	$2,19 \times 10^3$	N	$2,12 \times 10^2$	IU/ml
3	N	$2,50 \times 10^4$	N	$1,15 \times 10^6$	N	$1,50 \times 10^5$	IU/ml
4	N	P	N	P	N	P	-
5	N	$1,70 \times 10^2$	N	$1,52 \times 10^4$	N	$1,34 \times 10^3$	IU/ml
6	N	$1,14 \times 10^2$	N	$1,20 \times 10^4$	N	$1,77 \times 10^3$	IU/ml
7	N	$2,20 \times 10^1$	N	$1,27 \times 10^3$	N	$1,38 \times 10^2$	IU/ml
8	N	$6,00 \times 10^1$	N	$7,15 \times 10^3$	N	$5,77 \times 10^2$	IU/ml
9	N	$5,34 \times 10^1$	N	$6,01 \times 10^3$	N	$4,16 \times 10^2$	IU/ml
10	N	$7,00 \times 10^1$	N	$1,00 \times 10^4$	N	$7,48 \times 10^2$	IU/ml
11	N	$8,98 \times 10^1$	N	$1,71 \times 10^4$	N	$1,46 \times 10^3$	IU/ml
12	N	$2,50 \times 10^2$	N	$1,25 \times 10^4$	N	$1,25 \times 10^3$	IU/ml
13	N	P	N	P	N	P	-
14	N	$9,1 \times 10^1$	N	$1,45 \times 10^4$	N	$1,23 \times 10^3$	IU/ml
15	N	$< 2,86 \times 10^2$	N	$3,52 \times 10^3$	N	$1,20 \times 10^3$	IU/ml
16	N	$5,50 \times 10^2$	N	$6,70 \times 10^4$	N	$5,60 \times 10^3$	cp/ml
18	N	(N)*	N	$3,74 \times 10^4$	N	$1,54 \times 10^3$	cp/ml
19	N	$1,70 \times 10^2$	N	$1,63 \times 10^4$	N	$1,76 \times 10^3$??
20	N	$9,25 \times 10^2$	N	$8,90 \times 10^3$	N	$2,33 \times 10^3$	IU/ml
21	N	$1,40 \times 10^2$	N	$1,70 \times 10^4$	N	$1,40 \times 10^3$	IU/ml
22	N	$1,20 \times 10^2$	N	$1,02 \times 10^4$	N	$5,84 \times 10^2$	IU/ml
23	N	$1,93 \times 10^2$	N	$1,32 \times 10^4$	N	$2,26 \times 10^3$	IU/ml
24	N	$< 2,50 \times 10^2$	N	$9,00 \times 10^3$	N	$1,25 \times 10^3$	IU/ml
25	N	$2,84 \times 10^2$	N	$1,86 \times 10^4$	N	$2,12 \times 10^3$	IU/ml
26	N	$9,50 \times 10^1$	N	$1,80 \times 10^4$	N	$1,20 \times 10^4$	IU/ml

Laboratoře 4 a 13 své výsledky nekvantifikovaly, laboratoř 19 neuvedla jednotky.

Laboratoř 18 hodnotila vzorek 2 jako negativní, neboť byl pod „detekčním limitem kvantifikace“.

Pořadová čísla laboratoří v této tabulce nemají souvislost s jejich zavedenými kódy v EHK (NRL pro VH uvedena pod číslem 1).

vzorků pak byly zhruba o dva řády nadsazeny oproti skutečnosti (viz tabulka 3). Je zřejmé, že v daném okamžiku není použitá metoda funkční.

U nebodovaných vzorků prokázaly nižší citlivost svých metod (nezachycením nejslabšího pozitivního vzorku) celkem tři laboratoře, z toho jedna (poř. č. 3) pouze u markeru HCV-RNA a další dvě (poř. č. 2 a 18) u obou markerů.

Kvantitativní vyjádření pozitivních výsledků nebylo povinné a netvořilo součást bodového hodnocení, jako zcela chybné se však ukázalo pouze u jediné laboratoře (poř. č. 3), která u obou cílových markerů nadsazovala hodnoty zhruba o tři řády. Nehodnotitelné pak byly kvantitativní výsledky u dalších dvou pracovišť, z nichž jedno (poř. č. 7) uvedlo u markeru HCV-RNA hodnoty tak nízké, že za nimi zřejmě měly být uvedeny ještě řády (?), zatímco druhým je již zmiňovaná laboratoř (poř. č. 22), jejíž

metodu pro detekci HCV-RNA nelze považovat v současné době za funkční. Pouhé tři laboratoře své výsledky nekvantifikovaly vůbec, z toho dvě (poř. č. 4 a 13) ani u jednoho markeru a jedna (poř. č. 16) pouze u markeru HCV-RNA.

Celkově lze shrnout, že z 25 zúčastněných laboratoří pouze jedna (poř. č. 22) vykázala zásadní problém, a to při detekci HCV-RNA, u dalších dvou (poř. č. 2 a 18) se projevila nižší citlivost testů nezachycením ani jednoho z obou nejslabších pozitivních vzorků. Poslední laboratoř s problematickými výsledky (poř. č. 3) kombinovala nižší citlivost u HCV-RNA s chybnou kvantifikací u obou vyšetřovaných markerů.

*Mgr. Pavel Fritz
NRL pro virové hepatitidy
SZÚ-CEM*

Tabulka 3: KVANTITATIVNÍ VÝSLEDKY HCV-RNA (EHK-699)

Pořad. číslo laboratoře	1	2	3	4	5	6	jednotky
	N	N	++	N	+	++	
1-NRL	N	N	2,57x10e3	N	2,34x10e2	1,86x10e3	IU/ml
2	N	N	9,30x10e2	N	N	9,30x10e2	IU/ml
3	N	N	9,00x10e5	N	N	3,00x10e5	IU/ml
4	N	N	P	N	P	P	-
5	N	N	5,77x10e3	N	5,57x10e2	3,38x10e3	IU/ml
6	N	N	2,78x10e3	N	5,47x10e2	1,76x10e3	IU/ml
7	N	N	(5,96)?	N	(0,49)?	(6,28)?	IU/ml
8	N	N	3,90x10e3	N	4,50x10e2	2,70x10e3	IU/ml
9	N	N	4,29x10e3	N	7,29x10e2	2,97x10e3	IU/ml
10	N	N	3,18x10e3	N	4,03x10e2	2,35x10e3	IU/ml
11	N	N	3,53x10e3	N	3,56x10e2	2,57x10e3	IU/ml
12	N	N	1,45x10e4	N	1,5x10e3	7,00x10e3	IU/ml
13	N	N	P	N	P	P	-
14	N	N	3,51x10e3	N	3,77x10e2	2,79x10e3	IU/ml
15	N	N	2,16x10e3	N	<2,50x10e2	2,42x10e3	IU/ml
16	N	N	P	N	P	P	-
17	N	N	3,75x10e3	N	3,76x10e2	2,80x10e3	IU/ml
18	N	N	4,97x10e4	N	N	1,20x10e4	cp/ml
19	N	N	3,17x10e3	N	3,63x10e2	2,54x10e3	??
20	N	N	3,35x10e3	N	5,07x10e2	2,86x10e3	IU/ml
21	N	N	8,40x10e3	N	4,00x10e2	4,80x10e3	IU/ml
22	1,78x10e6	6,45x10e5	5,60x10e5	1,58x10e5	9,02x10e4	3,05x10e5	IU/ml
23	N	N	3,12x10e3	N	4,02x10e2	2,58x10e3	IU/ml
24	N	N	4,71x10e3	N	8,57x10e2	2,57x10e3	IU/ml
25	N	N	1,16x10e4	N	3,29x10e3	6,09x10e3	IU/ml
26	N	N	3,10x10e3	N	4,40x10e2	3,90x10e3	IU/ml

Laboratoře 4, 13 a 16 své výsledky nekvantifikovaly, laboratoř 19 neuvedla jednotky. Pořadová čísla laboratoří v této tabulce nemají souvislost s jejich zavedenými kódy v EHK (NRL pro VH uvedena pod číslem 1).