

LP	Elphogene		Verze č.: 6
Laboratorní příručka		Strana / počet stran	1/18
		Platnost od:	1. 11. 2019
Vypracoval:	Mgr. Barbora Belšánová	Schválil:	Mgr. Eliška Streitová

Laboratorní příručka

Vedoucí laboratoře: Mgr. Eliška Streitová



LP	Elphogene	Verze č.:6
Laboratorní příručka		Strana / počet stran 2/18

OBSAH

1. Úvod	3
2. Základní informace o laboratoři.....	4
2.1. Identifikace laboratoře	4
2.2. Zaměření laboratoře a spektrum nabízených služeb	5
2.3. Vnitřní členění laboratoře	5
2.4. Spektrum nabízených služeb	5
3. Preanalytická fáze	6
3.1. Odběry vzorků mimo Laboratoř	6
3.2. Odběry vzorků v Laboratoři	7
3.3. Příjem primárních vzorků	7
3.4. Doprovodné listy ke vzorkům	8
3.5. Přezkoumání přijatého vzorku.....	8
3.6. Odmítnutí vzorků pro zpracování	9
3.7. Dodatečné požadavky na vyšetření.....	9
3.8. Skladování vzorků po jejich přijetí.....	9
3.9. Vyšetřování ve smluvních a spolupracujících laboratořích	9
4 Postanalytická fáze.....	9
4.1 Vydávání výsledků	9
4.2 Telefonické hlášení výsledků	10
4.3 Komunikace s laboratoří.....	11
5 Seznam jednotlivých vyšetření	12
5.1 Izolace nukleové kyseliny	12
5.2 oncoMonitor	12
6. Seznam změn.....	18
7. Seznam revizí.....	18
8. Přílohy.....	18

LP	Elphogene	Verze č.:6
Laboratorní příručka		Strana / počet stran 3/18

1. Úvod

Cílem dokumentu je informovat lékaře a žadatele o laboratorní vyšetření o nabídce služeb Laboratoře Elphogene (dále jen Elphogene). Laboratorní příručka je určena zejména lékařům, zdravotním sestřám a potencionálním klientům, jako přehledný zdroj informací o laboratoři, popisuje preanalytické fáze a postanalytické fáze laboratorního vyšetření (zásady odběru, způsob požadování vyšetření a vydávání výsledků, spektrum laboratorních vyšetření, vydávání výsledků atd.).

Laboratorní příručka je součástí řízené dokumentace laboratoře, je pravidelně aktualizována a žadatelům o vyšetření je k dispozici na webových stránkách laboratoře – www.elphogene.cz.

Laboratorní příručka je připravena v souladu s normou ČSN EN ISO 15189:2013.

LP	Elphogene	Verze č.:6
Laboratorní příručka		Strana / počet stran 4/18

2. Základní informace o laboratoři

2.1. Identifikace laboratoře

Název organizace:	Elphogene, s.r.o.	
Adresa pracoviště:	Budova Carolina centrum Drnovská 1112/60 161 00 Praha 6 – Ruzyně	
Identifikační údaje:	IČO: 07717067 DIČ: CZ07717067	
Provozní doba:	Pondělí – Pátek	8:00 – 18:00
Příjem vzorků:	Pondělí – Pátek	8:00 – 18:00
Odběr vzorků:	Pondělí – Pátek	8:00 – 18:00
Ředitel společnosti:	doc. RNDr. Marek Minárik, Ph.D. Tel: +420 737 455 711 Email: mminarik@elphogene.cz	
Vedoucí laboratoře:	Mgr. Eliška Streitová Tel: +420 226 203 573 Email: estreitova@elphogene.cz	

LP	Elphogene	Verze č.:6
Laboratorní příručka		Strana / počet stran 5/18

2.2. Zaměření laboratoře a spektrum nabízených služeb

Elphogene je nová laboratoř, která vznikla odštěpením od společnosti Genomac výzkumný ústav, jenž byl založen v roce 2001 a od svého vzniku se zaměřoval na testování DNA a aplikovaný výzkum v oblasti molekulární onkologie, vyšetřování geneticky podmíněných onemocnění a určování otcovství.

Laboratoř Elphogene se v první řadě zaměřuje na výzkum a vyšetření vzorků v oblasti molekulární onkologie. Společnost má statut nestátního zdravotnického zařízení. Pravidelně se účastní mezinárodních kontrol kvality (EMQN, EQA) a kontrol kvality v České republice.

2.3. Kontakty na pracovníky společnosti a laboratoře

Seznam odborných pracovníků:

doc. RNDr. Marek Minárik, Ph.D.: ředitel

Mgr. Eliška Streitová: vedoucí laboratoře

VŠ odborný pracovník s registrací a specializací odborný pracovník v laboratorních metodách a v přípravě léčivých přípravků

Mgr. Barbora Belšánová: Odborný pracovník s registrací a specializací v oboru klinická genetika, metrolog, manažer kvality

Doc. MUDr. Lenka Foretová, Ph.D: lékař

klinický genetik s atestací

Ostatní laboratorní personál

Pracovníci laboratoře nakládají s osobními údaji ve smyslu nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 2016/679, obecné nařízení o ochraně osobních údajů (General Data Protection Regulation, GDPR).

2.4. Spektrum nabízených služeb

Laboratoř je zaměřena na molekulárně-genetické analýzy včetně odpovídající interpretace. Molekulárně-genetická vyšetření jsou prováděna citlivými laboratorními metodami na principu DNA analýz. Služby laboratoře jsou navrženy tak, aby splňovaly potřeby klientů a lékařů.

LP	Elphogene		Verze č.:6
Laboratorní příručka		Strana / počet stran	6/18

Laboratoř poskytuje tato vyšetření:

Izolace nukleových kyselin (DNA)

Izolace DNA

Detekce somatických mutací pomocí denaturační kapilární elektroforézy

- Pomocí denaturační kapilární elektroforézy jsme schopny detekovat jakékoli somatické mutace
- Mezi akreditované somatické mutace patří:
 1. Stanovení mutací v genu *EGFR* exonu 19, 20 a 21 metodou PCR ^(EQA)
 2. Stanovení mutací v genu *KRAS* exonu 2, 3 a 4 metodou PCR ^(EQA)

3. Preanalytická fáze

3.1. Odběry vzorků mimo Laboratoř

Před odběrem vzorku, musí být klient řádně informován o důvodu a průběhu vyšetření a s tímto vyšetřením souhlasit, což stvrzuje svým podpisem na informovaném souhlasu (viz příloha č.1). Stav pacienta, klienta, vlastní odběr materiálu, jeho transport do laboratoře, uchovávání a další manipulace se vzorkem před analýzou mohou ovlivnit konečný výsledek analýzy. Podrobné podmínky pro odběr, skladování a přepravu vzorků do Elphogenu jsou popsány v kapitole 5 u jednotlivých typů vyšetření. Obecně však platí, že vzorky standardně přijímané do laboratoře k následnému zpracování jsou:

- DNA
- čerstvá tkáň, bukalní stěr, krev odebraná do speciálních transportních zkumavek, separovaná plazma na námi definovaných podmínkách
- archivovaná tkáň ve formě parafinových bločků či řezů, buněčný nátěr na cytologickém skle

Ostatní typy vzorků jsou přijímány pouze po předchozí domluvě s vedoucí laboratoře. Vzorky jsou do laboratoře dodávány poštou, kurýrem nebo jinou transportní službou, sanitárním vozem vypraveným odesílajícím zdravotním zařízením a osobně klientem, lékařem či pracovníkem laboratoře.

Vzorky musí být do laboratoře dodány v takovém obalu, aby bylo maximálně zamezeno jejich poškození nebo vytečení. Doporučujeme uložení vzorků v plastových (PE) zkumavkách

LP	Elphogene	Verze č.:6
Laboratorní příručka		Strana / počet stran 7/18

(DNA, tkáň, krev, bukalní stěry) nebo krabičkách (archivované vzorky) a při dopravě poštou nebo kurýrem vložení do bublinkové nebo jinak vyztužené obálky či chladicí nádoby.

DNA izolovaná z různých materiálů a rozpuštěná v TE pufru nebo ve sterilní vodě může být skladována krátkodobě při 4°C a dlouhodobě při -18 až -24 °C. Vzorky DNA musí být dopravovány v chlazené nádobě. Krev, bukalní stěr nebo čerstvou tkáň je třeba po odběru skladovat při 4–8 °C po dobu maximálně jednoho dne. Pokud se předpokládá delší uskladnění před odesláním do laboratoře, je třeba odebraný biologický materiál uchovávat při -18 až -80°C. Vzorky krve pro separaci plazmy musí být dopravovány do laboratoře ve speciální odběrové soupravě, která je dodávána laboratoří Elphogene. Čerstvá tkáň v chlazené nádobě.

Archivovaný biologický materiál (fixovaná tkáň v parafínovém bločku nebo řezu, buněčný nátěr na cytologickém skle, FTA karta) lze uchovávat při laboratorní nebo pokojové teplotě a za stejných podmínek i transportovat do laboratoře.

Každý vzorek biologického materiálu je považován za potenciálně infekční, proto je po odběru nutné zamezit jeho možnému kontaktu s pacienty i veřejností. Svoz vzorků musí být zajišťován v uzavřených nádobách či boxech tak, aby během transportu nedošlo ke kontaminaci osob nebo dopravních prostředků použitých k přepravě. V případě rozlití je třeba se řídit platnými zásadami dezinfekce a dekontaminace.

3.2. Odběry vzorků v Laboratoři

Na žádost klienta o vyšetření provádí odběr biologického materiálu pracovníci Elphogenu. Tento odběr probíhá po předchozím sjednání termínu s odpovědným pracovníkem v odběrové místnosti.

3.3 Příjem primárních vzorků

Všechny materiál je do Elphogenu přijímán během provozní doby 8:00 – 18:00 hod, v případě telefonické domluvy i mimo pracovní dobu. Vzorky mohou být dodané poštou, kurýrem, sanitárním vozem nebo osobně a jsou přejímány pracovníkem, který vzorky předá do laboratoře kompetentním osobám. Nedílnou součástí přijímaného vzorku je žádanka na molekulárně genetické vyšetření.

LP	Elphogene		Verze č.:6
Laboratorní příručka		Strana / počet stran	8/18

3.4 Doprovodné listy ke vzorkům

Nedílnou součástí přijímaného vzorku je doprovodný list. Základními doprovodnými listy k vyšetřením zadávaným lékaři jsou žádanky vydávané Elphogenem (příloha č. 2) Žádanka obsahuje náležitosti požadované normou 15189.

- identifikace pacienta - jméno, příjmení, číslo pojištěnce
- číslo pojišťovny (pouze v případě hrazení ZP)
- jméno lékaře (žadatele o vyšetření), adresa ambulance
- identifikační číslo zařízení
- odbornost indikujícího lékaře
- soupis požadovaných vyšetření
- klinické informace o pacientovi (hlavní klinická diagnóza a případné vedlejší diagnózy)
- datum a čas odběru primárního vzorku

3.5 Přezkoumání přijatého vzorku

Biologický materiál je při příjmu přezkoumán pracovníky laboratoře společně s žádankou. Účelem této kontroly je zajistit, aby se k dalšímu zpracování nedostal žádný biologický vzorek, k němuž není připojena řádně vyplněná průvodka ke vzorku nebo jinak nevyhovující vzorek. Jednotlivé kroky přezkoumání jsou následující:

- přiřazení biologického materiálu k žádance nebo průvodce ke vzorkům dle identifikačních údajů uvedených na obalu vzorku (zkumavce, mikroskopickém skle, parafínovém bločku apod.)
- posouzení kvality biologického materiálu na základě kontroly nepoškozenosti obalu vzorku (zkumavka, krabička), vzhledu vzorku (konzistence, způsob fixace, zbarvení atd.) a jeho množství (objem, velikost)
- kontrola správného, čitelného a kompletního vyplnění doprovodného listu (žádanky nebo průvodky ke vzorkům) dle bodu 3.2. včetně všech požadovaných podpisů

Potvrzením shody s požadavky je přidělení identifikačního čísla danému vzorku a jeho zanesení do elektronické evidence vzorků. Podrobný postup identifikace vzorků je zaznamenáno ve směrnici S01 **Řízení dokumentace a záznamů.**

LP	Elphogene	Verze č.:6
Laboratorní příručka		Strana / počet stran 9/18

3.6 Odmítnutí vzorků pro zpracování

V případě zjištění neshody v některém z kroků uvedených v kapitole 3.5 laboratoř vzorek nezpracovává, vyzve e-mailem, poštou či telefonicky zasílající osobu k nápravě a s dalším zpracováním vzorku čeká, dokud nejsou potřebné informace či dokumenty nebo nový vzorek dodány.

3.7 Dodatečné požadavky na vyšetření

Lékař nebo klient může doobjednat další vyšetření. Podmínkou je dostatečné množství a kvalita vyšetřovaného biologického materiálu a dodání nového doprovodného listu s dodatečnými požadavky na vyšetření.

3.8 Skladování vzorků po jejich přijetí

Vzorky jsou laboratoří zpracovávány postupně s ohledem na typ vyšetření respektive urgentnost konkrétních případů. Před zahájením zpracování jsou vzorky typu DNA, čerstvá tkáň, bukalní stěr, krev apod. uchovávány krátkodobě (do 1 dne) v lednici při teplotě 4-8°C, při delším skladování v mrazicím boxu při teplotě -18 až -80°C. Archivované vzorky se uchovávají při laboratorní teplotě.

3.9 Vyšetřování ve smluvních a spolupracujících laboratořích

Laboratoř Elphogene nemá smluvní a spolupracující laboratoře.

4 Postanalytická fáze

4.1 Vydávání výsledků

Laboratoř vydává výsledky ve formě výsledkové zprávy nebo telefonicky, a to výhradně té osobě, která je v doprovodném listu uvedena jako kontakt pro předání výsledků. Výsledková zpráva je vždy připravena v tištěné formě a předaná dle požadavků lékaře či klienta (v tištěné formě, elektronicky nebo osobně). Výsledková zpráva je zasílána vždy v tištěné formě zadávajícímu lékaři. Předání výsledků e-mailem, telefonicky nebo osobně je pouze na základě zadání hesla, které se po domluvě doplní na průvodku. Před vydáním

LP	Elphogene		Verze č.:6
Laboratorní příručka		Strana / počet stran	10/18

výsledkové zprávy jsou výsledky zkontrolovány a uvolněny oprávněnou osobou včetně její autorizace.

Výsledkové zprávy u vyšetření zadávaných lékařem musí vždy obsahovat:

- identifikaci laboratoře, která výsledek vydala
- identifikaci pacienta (jméno a příjmení, číslo pojištěnce nebo rok narození)
- identifikaci žadatele (jméno, adresa, IČP)
- datum a čas odběru primárního vzorku
- datum a čas příjmu vzorků
- diagnózu pacienta
- výsledek vyšetření
- druh dodaného biologického materiálu
- slovní komentář, v případě nutnosti slovní interpretaci
- datum vydání výsledkové zprávy
- identifikaci pracovníka zodpovídajícího za analýzu
- identifikace pracovníka uvolňujícího výsledkovou zprávu

Akreditované vyšetření je na výsledkové zprávě označeno symbolem ^{SOP 1, 2*}.

Vzor výsledkové zprávy je přílohou č. 3 tohoto dokumentu.

Ostatní výsledkové zprávy obsahují:

- identifikaci laboratoře, která výsledek vydala
- identifikaci testovaného vzorku (jméno a příjmení nebo evidenční číslo vzorku)
- datum příjmu vzorků
- název zadaného testu
- výsledek vyšetření
- druh dodaného biologického materiálu
- slovní komentář, v případě nutnosti slovní interpretaci
- datum vydání výsledkové zprávy
- identifikaci pracovníka zodpovídajícího za analýzu
- identifikace pracovníka uvolňujícího výsledkovou zprávu

4.2 Telefonické hlášení výsledků

Výsledky se sdělují telefonicky v případě, že si o toto zadavatel (lékař, klient) zažádal v doprovodném listu nebo po předchozí domluvě s vedoucí laboratoře. Zadavatel (lékař,

LP	Elphogene		Verze č.:6
Laboratorní příručka		Strana / počet stran	11/18

klient) je telefonicky ověřován pomocí specifického údaje uvedeného na doprovodném listu. V případě lékaře se ověřuje pomocí IČZ, v případě klienta se ověřuje pomocí hesla. Oznámení o hlášení výsledků v rámci akreditovaných vyšetření se zapisuje do knihy (Záznam o telefonických hlášeních), který obsahuje: datum, čas, jméno odpovědného pracovníka laboratoře, jméno příjemce zprávy a výsledky vyšetření. Výsledek je pak zaslán ještě v tištěné podobě.

4.3 Komunikace s laboratoří

Stížnosti

Laboratoř se snaží minimalizovat nedostatky a neshody ve své práci. Vyřizování stížností je věcí vedoucího laboratoře a ředitele zařízení. Drobné připomínky okamžitě řeší kterýkoliv pracovník laboratoře a následně o tom informuje svého nadřízeného. V případě oficiální písemné stížnosti je tato prošetřena vedením laboratoře a v co nejkratší době vyřízena, což se vyjádří formou písemného záznamu. Tento záznam je uložen a archivován v dokumentech laboratoře.

Konzultace

Laboratoř poskytuje poradenské služby, které vyřizuje vedoucí laboratoře nebo odpovědný pracovník telefonicky nebo e-mailem. Taktéž vyřizuje konzultace a případné dotazy zadavatelů vyšetření.

LP	Elphogene	Verze č.:6
Laboratorní příručka		Strana / počet stran 12/18

5 Seznam jednotlivých vyšetření

5.1 Izolace nukleové kyseliny

Popis:

Izolace nukleových kyselin (DNA) je výchozí krok, který je podstatný pro všechna následná laboratorní vyšetření. Provádí se pomocí komerčních kitů. Kvalita a kvantita se stanovuje pomocí gelové elektroforézy nebo spektrofotometricky.

Materiál pro izolaci DNA:

- periferní krev
- archivované preparáty (cytologické sklíčko, parafínový bloček)
- nativní tkáň
- bukální stěr
- plazma

5.2 oncoMonitor

Popis akreditovaných vyšetřovaných mutací:

EGFR (exon 19, 20 a 21)^(EQC)

Gen *EGFR* je lokalizován do oblasti chromozomu 7p12 a skládá se z 28 exonů. Jeho proteinový produkt je receptor pro epidermální růstový faktor (*EGFR*, Her1 nebo ErbB1), jehož hlavní funkcí je stimulace buněčné proliferace, diferenciace, přežívání, angiogeneze a migrace. *EGFR* je důležitým proteinem pro udržování normální buněčné funkce a pro přežití. Při deregulaci *EGFR* signální dráhy dochází k vývoji maligního procesu v důsledku aktivace buněčného cyklu, inhibice apoptózy, indukce angiogeneze, pohybu nádorových buněk a metastazování.

Aktivace *EGFR* nastává po navázání ligandu na extracelulární část proteinu. Po vazbě ligandu receptor vytváří homo nebo heterodimer s dalším receptorem z rodiny ErbB, pak následuje autofosforylace receptoru přenesením fosfátu z ATP a nakonec dochází k fosforylaci některého z adaptérových proteinů.

LP	Elphogene	Verze č.:6
Laboratorní příručka		Strana / počet stran 13/18

Mutace, které se vyskytují v nádorových buňkách, jsou lokalizovány v exonech 18 - 21 genu *EGFR*, což je oblast kódující tyrozin kinázovou doménu, kde dochází k vazbě ATP. Téměř 90% těchto mutací představují delece v exonu 19 a substituce L858R v exonu 21.

Přítomnost těchto mutací je pozitivním prediktivním faktorem při cílené biologické léčbě tyrozin kinázovými inhibitory (gefitinib, erlotinib) a základní podmínkou pro nasazení léčby gefitinibem v první linii. Přítomnost mutace T790M v exonu 20 je považována za rezistentní mutaci k léčbě první generace inhibitorů TKI (gefitinib, erlotinib). Zároveň je tato mutace pozitivním prediktorem cílené léčby inhibitory druhé generace TKI (např. afatinib) nebo třetí generace TKI (např. osimertinib).

Referenční hodnoty:

Negativní = nemutované buňky = wild type = wt; **O**

Pozitivní = mutované buňky = mut; **X**

KRAS(exon 2, 3, 4)^(EQC)

Gen *KRAS* leží v oblasti chromozómu 12p12.1 a obsahuje 6 exonů. Jeho produktem je Ras neboli p21 protein. Jde o malý GTP-vazebný protein lokalizovaný na vnitřní straně plazmatické membrány, který přenáší prostřednictvím transdukčních dráh do jádra signály stimulující buněčný růst nebo inhibující apoptózu. Tento protein se vyskytuje ve dvou stavech - v inaktivním stavu ve vazbě s GDP a v aktivním stavu ve vazbě s GTP. Ve fyziologických podmínkách je Ras v inaktivním stavu. Aktivace Ras proteinu nastává působením extracelulárních signálů (např. růstových faktorů, cytokinů nebo signálů pro adhezi) prostřednictvím specifických povrchových receptorů. Po navázání signální molekuly na receptor dojde k jeho autofosforylaci, dimerizaci a následné vazbě dalších proteinů. To vede k přechodu Ras do aktivního stavu. Ten pak zahajuje některou z transdukčních drah Ras/Raf, Ras/PI3-K, Ras/Ral nebo Ras/PLC.

Mutace v *KRAS* genu detekované v nádorových buňkách způsobují permanentní aktivaci proteinu a vedou k rozsáhlé interakci s různými efekty. Tím se role mutovaného Ras proteinu stává v postižených buňkách mnohem komplexnější a kvantitativně rozdílná než funkce Ras ve zdravých buňkách a umožňuje nekontrolovaný růst a nádorovou transformaci. Ve většině případů jde o jednonukleotidové mutace v kodonech 12 a 13 (exon 2), 59 a 61 (exon 3), 117 a 146 (exon 4). Bylo ukázáno, že konkrétní typ a pozice mutace může mít vliv

LP	Elphogene	Verze č.:6
Laboratorní příručka		Strana / počet stran 14/18

na prognózu, průběh onemocnění nebo odpověď na léčbu. Vyšetření *KRAS* negativity (prokázání exklusivní přítomnosti divoké alely) je základní podmínkou pro nasazení schémat obsahujících cetuximab nebo panitumumab.

Referenční hodnoty:

Negativní = nemutované buňky = wild type = wt; **O**

Pozitivní = mutované buňky = mut; **X**

Metodika: Specifická PCR s tvorbou heteroduplexů s následnou detekcí pomocí denaturační kapilární elektroforézy

Biologický materiál:

- nativní zmražená tkáň
- archivovaná tkáň ve formě parafinových bločků či řezů
- buněčný nátěr na cytologickém skle
- periferní krev

Popis ostatních vyšetřovaných mutací:

Gen APC

Jedná se o gen lokalizovaný v oblasti 5q21-22 skládající se z 15 exonů. Kóduje tumor-supresorový protein Apc, jehož hlavní funkcí je negativní regulace buněčného cyklu a inhibice buněčné proliferace. Dále působí na procesy související s buněčnou migrací a adhezí, transkripční aktivací a apoptózou. Zárodečný defekt proteinu způsobuje vznik Familiární adenomatózní polypózy (FAP). Somatická forma mutace se vyskytuje především u KK v exonu 15 v oblasti označované MCR (MCR = mutation cluster region) a způsobuje vznik adenomu gradujícího až ve zhoubný nádor. Uvádí se, že aberace genu APC se nachází v přibližně padesáti procentech sporadických adenomů a u šedesáti až osmdesáti procent sporadických kolorektálních karcinomů.

Referenční hodnoty:

Negativní = nemutované buňky = wild type = wt; **O**

Pozitivní = mutované buňky = mut; **X**

LP	Elphogene		Verze č.:6
Laboratorní příručka		Strana / počet stran	15/18

Metodika: Specifická PCR s tvorbou heteroduplexů s následnou detekcí pomocí denaturační kapilární elektroforézy

Biologický materiál:

- nativní zmražená tkáň
- archivovaná tkáň ve formě parafinových bločků či řezů
- buněčný nátěr na cytologickém skle
- periferní krev

Gen TP53

Gen *TP53* je tumor-supresorový gen lokalizovaný na krátkém raménku sedmnáctého chromozómu, přesněji 17p13.1. Jedná se o gen kódující protein p53, který odpovídá za regulaci vybraných genů působících např. na zástavu buněčné proliferace, apoptózu, opravy DNA a na změny metabolismu buňky. V normálních buňkách je protein p53 exprimován v nízkém stupni, kdežto v pozměněných buněčných liniích se exprimuje ve stupni vysokém, kde způsobuje maligní transformaci. P53 je vazebný protein obsahující místo transkripční aktivace vazebné místo pro navázání DNA k aktivaci exprese proteinů a oligomerizační domény. Mutace v genu *TP53* se nachází u různých nádorových onemocnění. Stále dochází ke spekulacím o vlivu přítomnosti mutované formy *TP53* na účinnost chemoterapie.

Referenční hodnoty:

Negativní = nemutované buňky = wild type = wt; **O**

Pozitivní = mutované buňky = mut; **X**

Metodika: Specifická PCR s tvorbou heteroduplexů s následnou detekcí pomocí denaturační kapilární elektroforézy

Biologický materiál:

- nativní zmražená tkáň
- archivovaná tkáň ve formě parafinových bločků či řezů
- buněčný nátěr na cytologickém skle
- periferní krev

LP	Elphogene	Verze č.:6
Laboratorní příručka		Strana / počet stran 16/18

Gen *BRAF*

Onkogen *BRAF* je lokalizovaný v oblasti 7q34 a skládá se z 18 exonů. Kóduje protein Braf, který je součástí rodiny serin-threonin kináz zahrnující Araf, Braf a Crafa. Hraje důležitou úlohu v regulaci MAPK/ERK signální kaskády ovlivňující buněčné dělení, diferenciaci a apoptózu buňky. Nejčastěji detekovanou mutací je V600E v patnáctém exonu způsobující konstitutivní kinázovou aktivitu udržující protein B-Raf v permanentně aktivním stavu. Mutace v genu *BRAF* se podílí na patogenezi velkého množství nádorů. U KK je nález mutace v genu *BRAF* spojován s významně horší prognózou onemocnění a neposkytnutím terapie monoklonálními protilátkami, kdežto u melanomu je tato mutace spojována s pozitivní odpovědí na inhibitor kinázy Braf vemurafenib.

Referenční hodnoty:

Negativní = nemutované buňky = wild type = wt; **O**

Pozitivní = mutované buňky = mut; **X**

Metodika: Specifická PCR s tvorbou heteroduplexů s následnou detekcí pomocí denaturační kapilární elektroforézy

Biologický materiál:

- nativní zmražená tkáň
- archivovaná tkáň ve formě parafínových bločků či řezů
- buněčný nátěr na cytologickém skle
- periferní krev

Gen *PIK3CA* – exon 9

Fosfatidylinositol 3-kinázy (PKI3s) představují skupinu enzymů hrající významnou roli regulátorů hladin jednotlivých fosfatidylinositolů v buňkách, což následně mění vlastnosti buněčných membrán, a tím i proteinů a signálních drah s nimi asociovaných. Ovlivňují tak řadu buněčných procesů včetně proliferace, diferenciací a přežíváním buněk.

Produkt genu *PIK3CA* pak působí jako přenašeč signálu v signální dráze regulující receptor epeidermálního růstového faktoru (*EGFR*). Somatické mutace genu *PIK3CA* bývají

LP	Elphogene	Verze č.:6
Laboratorní příručka		Strana / počet stran 17/18

nacházeny u kolorektálních karcinomech, nádorech prsu či plic. Aktivační mutace *PIK3CA* genu jsou asociovány s rezistencí k léčbě *EGFR* tyrozinkinázami inhibitory.

Referenční hodnoty:

Negativní = nemutované buňky = wild type = wt; **O**

Pozitivní = mutované buňky = mut; **X**

Metodika: Specifická PCR s tvorbou heteroduplexů s následnou detekcí pomocí denaturační kapilární elektroforézy

Biologický materiál:

- nativní zmražená tkáň
- archivovaná tkáň ve formě parafínových bločků či řezů
- buněčný nátěr na cytologickém skle
- periferní krev

Odběr a skladování:

Tkáň nebo buňky odebrané při endoskopickém vyšetření nebo operaci

- nativní tkáň: ihned po odběru uchovávat v plastové zkumavce při teplotě -18°C až -80°C, transport do laboratoře v chladicí nádobě
- parafínové bločky: standardní zpracování, fixou označit oblast nádorové tkáně, transport do laboratoře při pokojové teplotě
- buněčné nátěry: barvení coomasie blue, nezalévat do epoxidu!!!, fixou označit oblast nádorových buněk, transport do laboratoře při pokojové teplotě v pevném obalu chránícím skla proti rozbití

Periferní krev

odběr do speciálních odběrových zkumavek, které k tomu naše laboratoř zajišťuje a dodává.

Provádí se: 1x týdně

Doba odezvy od dodání vzorku: 20 pracovních dnů

LP	Elphogene	Verze č.:6
Laboratorní příručka		Strana / počet stran 18/18

6. Seznam změn

č. změny	č. kapitoly	Popis změny	datum	schválil
1.	3.5.	Odkaz na směrnici S01	20.8.2020	Belšánová
2	5	Změna doby odezvy	20.8.2020	Belšánová

7. Seznam revizí

Datum revize	status	datum příští revize	schválil

8. Přílohy

Příloha č. 1: Informovaný souhlas

Příloha č. 2: Žádanka Elphogene

Příloha č. 3: Vzor výsledku molekulárně genetické analýzy