

LP	Elphogene		Verze č.: 9
Laboratorní příručka		Strana / počet stran	1/23
		Platnost od:	1.5.2025
Vypracoval:	Mgr. Petra Kroupová	Schválil:	RNDr. Martina Putzová Ph.D.

Laboratorní příručka

Vedoucí laboratoře: RNDr. Martina Putzová, Ph.D.



V Praze 1.5.2025

LP	Elphogene	Verze č.:8
Laboratorní příručka		Strana / počet stran 2/23

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. Spektrum nabízených služeb	6
3. Preamalytická fáze	6
3.1. Odběry vzorků mimo Laboratoř	6
3.2. Odběry vzorků v Laboratoři	9
3.3. Příjem primárních vzorků	9
3.4. Doprovodné listy ke vzorkům	9
3.5. Přezkoumání přijatého vzorku.....	10
3.6. Odmítnutí vzorků pro zpracování.....	10
3.7. Dodatečné požadavky na vyšetření.....	11
3.8. Skladování vzorků po jejich přijetí.....	11
3.9. Vyšetřování ve smluvních a spolupracujících laboratořích	11
4. Postanalytická fáze.....	11
4.1. Vydávání výsledků	11
4.2. Telefonické hlášení výsledků	13
4.3. Komunikace s laboratoří.....	13
5. Seznam jednotlivých vyšetření	14
5.1. Izolace nukleové kyseliny	14
5.2. oncoMonitor	15
5.3. SARS-CoV-2	20
6. Seznam změn.....	22
7. Seznam revizí.....	22
8. Přílohy.....	23

LP	Elphogene	Verze č.:8
Laboratorní příručka		Strana / počet stran 3/23

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 sestrám 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 ed.3:2023.

LP	Elphogene	Verze č.:8
Laboratorní příručka		Strana / počet stran 4/23

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 – 18:45
	Sobota – Neděle	10:00 – 17:00
Příjem vzorků:	Pondělí – Pátek	8:00 – 18:45
	Sobota – Neděle	10:00 – 17:00
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:	RNDr. Martina Putzová, Ph.D.	
	Tel: +420 226 203 573	
	Email: info@elphogene.cz	

LP	Elphogene	Verze č.:8
Laboratorní příručka		Strana / počet stran 5/23

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.

V roce 2020 po rozšíření a následném nástupu pandemie viru SARS-CoV-2 se laboratoř zapojila do molekulárně-genetického testování přítomnosti viru SARS-CoV-2, kdy absolvuje pravidelné kontroly kvality (QCMD, WHO).

Kontakty na pracovníky společnosti a laboratoře

Seznam odborných pracovníků:

doc. RNDr. Marek Minárik, Ph.D.:	ředitel
RNDr. Martina Putzová, Ph.D.:	vedoucí laboratoře
	VŠ odborný pracovník s registrací a specializací
	odborný pracovník v laboratorních metodách a
	v přípravě léčivých přípravků
Mgr. Barbora Mináriková (Belšánová):	Odborný pracovník s registrací a specializací v
	oboru klinická genetika, metrolog,
Doc. MUDr. Lenka Foretová, Ph.D:	lékař
	klinický genetik s atestací
Mgr. Petra Kroupová :	Odborný pracovník v laboratorních metodách a
	přípravě léčivých přípravků
	manažer kvality

LP	Elphogene	Verze č.:8
Laboratorní příručka		Strana / počet stran 6/23

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).

2.3. Spektrum nabízených služeb

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

Laboratoř poskytuje tato vyšetření:

Izolace nukleových kyselin (DNA/RNA)

Izolace DNA i RNA

Detekce somatických mutací pomocí denaturační kapilární elektroforézy

- Pomocí denaturační kapilární elektroforézy jsme schopny detekovat jakékoliv 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)

Detekce přítomnosti virové RNA (SARS-CoV-2) s využitím metod real-time PCR

- Pomocí real-time PCR jsme schopni detekovat požadované varianty SARS-CoV-2 metodou diskriminační PCR

3. Preamalytická fáze

3.1. Odběry vzorků mimo Laboratoř

Vyšetření oncoMonitor

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,

LP	Elphogene	Verze č.:8
Laboratorní příručka		Strana / počet stran 7/23

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, buklální stěr, krev odebraná do speciálních transportních zkumavek, separovaná plazma na námi definovaných podmínkách
- archivovaná tkáň ve formě parafínových 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 (DNA, tkáň, krev, buklální 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, buklální 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

LP	Elphogene		Verze č.:8
Laboratorní příručka		Strana / počet stran	8/23

kontaminaci osob nebo dopravních prostředků použitých k přepravě. V případě rozlití je třeba se řídit platnými zásadami dezinfekce a dekontaminace.

LP	Elphogene	Verze č.:8
Laboratorní příručka		Strana / počet stran 9/23

Vyšetření na přítomnost SARS-CoV-2

Odběr vzorků je zajišťován společností vyšetři.mě, která provozuje několik odběrových míst pro testování přítomnosti SARS-CoV-2 v Praze. Vzorky jsou následně v předem určených časech několikrát denně transportovány kurýrní službou do laboratoře.

3.2. Odběry vzorků v Laboratoři

Pracovníci laboratoře neprovádí odběry primárních vzorků.

3.3 Příjem primárních vzorků

Všechny materiál je do Elphogenu přijímán během provozní doby 8:00 – 18:45 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.

3.4 Doprovodné listy ke vzorkům

Nedílnou součástí přijímaného vzorku k vyšetření oncoMonitor 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

Žádanka ke vzorkům na vyšetření přítomnosti SARS-CoV-2 je v elektronické podobě (eŽádanka v registru ISIN) dle požadovaných vládních nařízení.

LP	Elphogene	Verze č.:8
Laboratorní příručka		Strana / počet stran 10/23

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, zabarvení 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**.

Seznam vzorků pro vyšetření přítomnosti SARS-CoV-2 jsou zadavatelem odesílány ve formě soboru, který je následně administrativním pracovníkem importován do aplikace Elphogene. Podrobný postup identifikace a příjem vzorku je zaznamenán v SOP 02 Vyšetření na přítomnost RNA viru SARS-CoV-2 metodou real-time PCR (RT-PCR)

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.

LP	Elphogene	Verze č.:8
Laboratorní příručka		Strana / počet stran 11/23

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, buňkové stěry, 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.

Vzorky pro vyšetření přítomnosti SARS-CoV-2 jsou krátkodobě uchovávány v lednici při 4-8°C, následně jsou archivovány po dobu 14 dnů v mrazicím boxu, pro případ vyžádání si vzorku k dalším analýzám Státním zdravotním ústavem. Po uplynutí této doby jsou vzorky zlikvidovány. Všechny pozitivní vzorky jsou odesílány do SZU na případné celogenomové sekvenování.

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

LP	Elphogene	Verze č.:8
Laboratorní příručka		Strana / počet stran 12/23

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

Výsledkové zprávy vyšetření přítomnosti SARS-CoV-2 jsou ve formě odkazu na stažení zprávy odesílány na e-mail klienta. Klient si zprávu stáhne po zadání svého rodného číslo, nebo zadáním čísla e-žádanky. Zpráva o výsledku je také zaslána formou textové zprávy na uvedené telefonní číslo.

Výsledková zpráva obsahuje:

- identifikaci laboratoře
- identifikaci testovaného vzorku (jméno, příjmení, číslo pojištěnce, evidenční označení vzorku)

LP	Elphogene	Verze č.:8
Laboratorní příručka		Strana / počet stran 13/23

- specifikaci vyšetřovaného materiálu a metodiky vyšetření
- informace o datu a místu narození klienta a číslo cestovního dokladu
- číslo eŽádanky v registru ISIN
- identifikaci odběrového místa a data a času odběru
- výsledek vyšetření
- potvrzení o výsledku pro cestovní účely

Výsledky jsou ihned po odeslání zaslány automaticky na UZIS, kde si klient taktéž může stáhnout výsledek.

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, 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.:8
Laboratorní příručka		Strana / počet stran 14/23

5 Seznam jednotlivých vyšetření

5.1 *Izolace nukleové kyseliny*

oncoMonitor

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
- bukalní stěr
- plazma

SARS-CoV-2

Popis:

Izolace RNA se provádí jako výchozí krok pro vyšetření přítomnosti viru SARS-CoV-2 z oropharyngeálních či nasopharyngeálních stěrů. K izolaci je ve většině případů používán komerční kit a izolátor od společnosti Zybio. Tento způsob umožňuje izolaci 15 vzorků stěrů v jedné izolační destičce. Je-li počet vzorků stěrů přijatých laboratoří nízký, pak mohou být vzorky zpracovány manuálně kitem od společnosti AmoyDx („kolonková“ metoda).

Materiál pro izolaci RNA

- oropharyngeální / nasopharyngeální stěr

LP	Elphogene	Verze č.:8
Laboratorní příručka		Strana / počet stran 15/23

5.2 oncoMonitor

Popis akreditovaných vyšetřovaných mutací:

EGFR (exon 19, 20 a 21)^{Akreditované vyšetření}

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.

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)^{Akreditované vyšetření}

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

LP	Elphogene	Verze č.:8
Laboratorní příručka		Strana / počet stran 16/23

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 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 parafínových bločků či řezů
- buněčný nátěr na cytologickém skle
- periferní krev

LP	Elphogene	Verze č.:8
Laboratorní příručka		Strana / počet stran 17/23

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 graduujícího 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**

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 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

LP	Elphogene	Verze č.:8
Laboratorní příručka		Strana / počet stran 18/23

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 parafínových bločků či řezů
- buněčný nátěr na cytologickém skle
- periferní krev

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 Craf. 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 prognózu 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**

LP	Elphogene	Verze č.:8
Laboratorní příručka		Strana / počet stran 19/23

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

Biologický materiál:

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

LP	Elphogene	Verze č.:8
Laboratorní příručka		Strana / počet stran 20/23

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

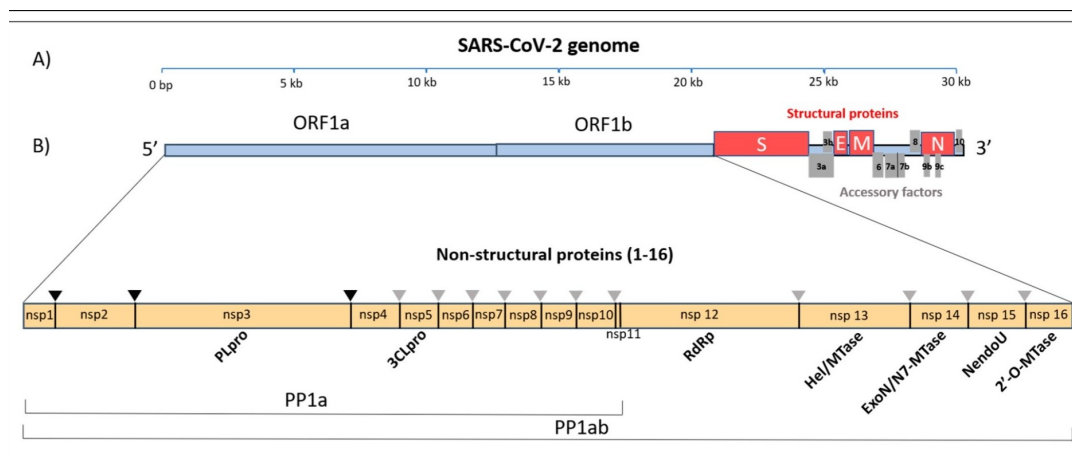
Odběr do speciálních odběrových zkumavek STRECK, které zaručují stabilitu volné cirkulující DNA po dobu osmi dnů. Personál spolupracujících pracovišť je instruován pracovníky laboratoře jak má provádět odběry krve, aby byl vzorek stabilní. Laboratoř dodává spolupracujícím pracovištím odběrové soupravy, které obsahují podrobný manuál pro odběr krve, průvodku a informovaný souhlas. Jakmile je vzorek odebrán, laboratoř je informována a do pěti dnů od odběru, je vzorek transportován do laboratoře, kde dochází k separaci plazmy.

Provádí se: 1x týdně

Doba odezvy od dodání vzorku: 25 pracovních dnů

5.3 SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 je velký obalený virus, jeho genom tvoří ssRNA. Po vstupu do buňky slouží tato ss RNA jako mRNA, z níž jsou translatovány virové proteiny.



Obr. 1 – Struktura genomu viru SARS-CoV-2

Zdroj: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/5/1267/htm>

LP	Elphogene	Verze č.:8
Laboratorní příručka		Strana / počet stran 21/23

Různé komerčně dostupné kity pro detekci přítomnosti virové RNA využívají amplifikaci různých částí virového genomu. Kity užívané v naší laboratoři jsou:

- 1) Amoy Dx Novel Coronavirus (20149-nCoV) Detection Kit
- 2) Zybio PCR Kit 3 (SARS-CoV-2 Nucleic Acid Detection Kit)
- 3) DBdirect™ Covid-19 Multiplex RT-PCR Kit

Amoy Dx Novel Coronavirus (2019-nCoV) Detection Kit

Kit využívá metodiku real-time RT PCR – kombinuje reverzní transkripci s následnou PCR amplifikací. K detekci virové RNA je využívána specifická amplifikace oblasti ORF1ab a genu N, kódujícího nukleoprotein. Zároveň dochází k amplifikaci interní kontroly pro ověření kvality RNA a PCR reakce jako takové.

Zybio PCR Kit 3 (SARS-CoV-2 Nucleic Acid Detection Kit)

Kit opět využívá kombinaci reverzní transkripce a následné PCR amplifikace. Během PCR runu je přítomnost virové RNA detekována na základě amplifikace tří virových genů / oblastí genomu: gen N (nukleoprotein), gen E (protein virového obalu) a gen RdRP (RNA dependentní RNA polymeráza). Testovací sada pět zajišťuje ověření kvality vyizolované RNA a průběhu PCR reakce amplifikací interní kontroly.

DBdirect™ Covid-19 Multiplex RT-PCR Kit

Na rozdíl od výše uvedených kitů, sada od společnosti Diana umožňuje detekci virové RNA bez předchozí izolace nukleové kyseliny ze vzorku. Kit v jedné multiplexové reakci zajišťuje amplifikaci dvou virových genů - S genu (spike protein) a genu kódujícího EndoRNAsu. Kit také obsahuje externí RNA kontrolu k ověření účinnosti RT-PCR reakce. Testovací sada je využívána pro vyšetření vzorků slin. Společnost zároveň nabízí různá aditiva, s jejichž pomocí lze cíleně testovat konkrétní mutace, především mutace S:L452R a E484K.

Tímto kitem je validována metodika poolování. Laboratoř Elphogene pooluje maximálně 6 vzorků slin (na základě doporučení MZ z května 2021), aby si zachovala citlivost zpracování.

Referenční hodnoty:

Negativní = virová RNA není ve vzorku detekována

Pozitivní = virová RNA je ve vzorku přítomna

LP	Elphogene	Verze č.:8
Laboratorní příručka		Strana / počet stran 22/23

Metodika: RT-PCR reakce

Biologický materiál:

- oropharyngeální / nasopharyngeální stěr
- sliny

Doba odezvy od dodání vzorku: 48 hodin

6. Seznam změn

č. změny	č. kapitoly	Popis změny	datum	schválil
1.	1	Změna manažera kvality	1.5.2025	

7. Seznam revizí

Datum revize	status	datum příští revize	schválil

LP	Elphogene	Verze č.:8
Laboratorní příručka		Strana / počet stran 23/23

8. Přílohy

Příloha č. 1: Informovaný souhlas

Příloha č. 2: Žádanka Elphogene

Příloha č. 3: Vzor výsledku molekulárně genetické analýzy

Příloha č. 4: Vzor výsledkového protokolu SARS-CoV-2