



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Studies

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta
Katedra laboratorních metod a informačních systémů

Bakalářská práce

Stanovení množství transkriptu bcr/abl u chronické myeloidní leukemie

Vypracovala: Kamila Pytlová
Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Ondřej Scheinost

České Budějovice 2016

Abstrakt

Tato bakalářská práce se v teoretické části zabývá onemocněním chronická myeloidní leukémie (CML), která tvoří asi 25% leukémií dospělého věku, s maximálním výskytem ve věkové skupině mezi 50 - 70. rokem života. S nízkou frekvencí se vyskytuje i u dětí a mladistvých. Chronická myeloidní leukémie je charakterizována přítomností hybridního genu bcr/abl, který vzniká v důsledku reciproké translokace t(9;22)(q34;q11) karyotypicky detekovatelné jako Ph chromozóm. Gen bcr/abl je typickým znakem CML sloužící k upřesnění diagnózy a sledování úspěšnosti léčby. Kvantifikace je prováděna buď jako relativní (častěji), kdy se množství fluorescence testovaného vzorku porovnává s množstvím fluorescence jiného genu, nebo absolutní, kdy množství DNA odečítáme z kalibrační křivky, která nám poskytne výsledek DNA o dané koncentraci.

Cílem této práce je srovnat různé způsoby kvantifikace transkriptu bcr/abl. Snaha o kvantifikaci tohoto transkriptu probíhá již dlouhou dobu, zapojili se zde organizace z celého světa. Nejcitlivější metodou pro zjištění přítomnosti této aberace je reverzní transkriptázová polymerázová řetězová reakce (RT-PCR) detekující transkript bcr/abl. Druhým cílem této práce je podat přehled problematiky a provést jeden ze způsobů relativní kvantifikace genu bcr/abl. Posledním cílem je seznámení se s managementem vzorků v laboratoři a verifikací a validací těchto metod.

Klíčová slova

Kvantifikace transkriptu bcr/abl, chronická myeloidní leukémie, izolace RNA, RT-PCR, verifikace

Abstract

This bachelor thesis in the theoretical part deals with the disease chronic myelogenous leukemia (CML), which accounts for about 25% of the leukemia of the adult age, with maximum incidence in the age group between 50.-70. year of life. With low frequency occurs even in children and adolescents. Chronic myeloid leukemia is characterized by the presence of the hybrid gene bcr/abl, that arises as a result of reciprocal translocation t(9;22)(q34;q11) karyotypically detectable as a Ph chromosome. The gene bcr/abl is the hallmark of CML used to refine the diagnosis and monitoring of treatment success. Quantification is carried out either as a relative (often), when the amount of fluorescence of the test gene is compared with the amount of fluorescence of the reference gene, or absolute, when the amount of DNA we are going deduct from the calibration curve, which will provide us with a DNA sample of a given concentration.

The aim of this work is to compare different ways of quantification of the transcript bcr/abl. The pursuit of quantification of this transcript has been going on for a long time, involved here organization from around the world. The most sensitive method for detection of the presence of this aberration is the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) detecting the transcript bcr/abl. The second objective of this work is to give an overview of this issue and perform one of the methods for the relative quantification of the gene bcr/abl. The final objective is to get acquainted with the management of samples in the laboratory, and verification and validation of these methods.

Keywords: Quantification of the transcript bcr/abl, Chronic myeloid leukemia, isolation of RNA, RT-PCR, verification

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 1. 5. 2016

.....

Kamila Pytlová

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce Mgr. Ondřeji Scheinostovi za jeho trpělivost a ochotu poskytnout cenné informace k vypracování této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat pracovníkům laboratoře molekulární biologie a genetiky v Českých Budějovicích. A v neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině za podporu při mých studiích.

Obsah

1. Úvod	7
2. Teoretická část	9
2.1 Historie	9
2.2 Definice CML.....	10
2.3 Patogeneze	10
2.4 Příznaky onemocnění a průběh	11
2.5 Léčba CML	12
2.5.1 Sledování množství transkriptu bcr/abl při léčbě.....	12
2.6 Stanovení diagnózy.....	14
2.6.1 Vyšetření krevního obrazu	14
2.6.2 Krevní nátěr	14
2.6.3 Vyšetření kostní dřeně	14
2.6.4 Další laboratorní vyšetření	14
2.7 Genetické metody pro stanovení diagnózy.....	15
2.7.1 Cytogenetika a molekulární genetika.....	15
2.8 Metody pro monitorování léčby	19
2.8.1 Metoda Real-Time RT-PCR	20
2.8.2 Kompetitivní RT-PCR.....	22
2.9 Izolace RNA.....	22
2.9.1 Způsoby kvantifikace mRNA.....	23
2.10 Detekce transkriptů fúzního genu bcr/abl kvalitativně.....	24
2.11 Monitorování množství bcr/abl transkriptů v České republice.....	25
2.12 Validace a verifikace metod	25

2.12.1 Proč je nutné provádět validaci a verifikaci	26
2.12.2 Kdo provádí verifikace	26
2.12.3 Kdy se provádí validace/verifikace	27
2.12.4 Validace metod molekulární genetiky	27
2.13 Pokusy standardizace ve světě	29
2.14 Standardizace v České republice	31
3. Praktická část	34
3.1 Cíle práce	34
3.2 Hypotéza	34
3.3 Metodika	35
3.3.1 Odběr a transport vzorku	35
3.3.2 Metoda GeneXpert bcr/abl Monitor	36
4. Výsledky	41
4.1	41
4.2 Sledování hladiny transkriptu bcr/abl během léčby	43
4.3 Praktické provedení verifikace	45
5. Diskuse	48
6. Závěr	51
7. Použitá literatura	52

1. Úvod

V teoretické části se zabývám chronickou myeloidní leukémií, která se může vyskytnout v každém věku, i když její výskyt u dětí do 16 let je velmi řídký. CML se nejčastěji vyskytuje ve věku 50-55 let. Toto onemocnění se o něco častěji vyskytuje u mužů, poměr výskytu mezi muži a ženami se udává 1,3 : 1,0. V historii výzkumu nádorových onemocnění byla CML první chorobou, u které byla nalezena typická chromozomální porucha, nazvána dle místa svého objevu tzv. Filadelfský chromozóm (1960). Chronická myeloidní leukémie je myeloproliferativní onemocnění způsobená poruchou pluripotentní kmenové buňky. Při onemocnění je postižená jak myeloidní, (kdy převažuje postižení granulopoezy), tak lymfoidní krvetvorná řada. Onemocnění vzniká v důsledku získané genetické změny, která postihuje kmenovou krvetvornou buňku. Změna je způsobená reciprokou translokací mezi částmi chromozómů 9 (ABL) a 22(BCR). Při vzájemné výměně se vedle sebe dostanou geny ABL1 (ABL1 = Abelson murine leukemia) z chromozómu 9 a gen BCR (BCR= breakpoint cluster region) z chromozómu 22, tyto geny spolu dohromady splynou v nový gen tzv. fúzní BCR-ABL1. Tento fúzní gen kóduje vznik bílkoviny, která se nazývá Bcr- Abl tyrozinkináza. Patologická úloha toho to proteinu spočívá v neustálé aktivaci buněčných reakcí. Tato translokace se vyskytuje téměř u všech pacientů s CML a 30% až 40% u akutního lymfoblastické leukémie. Ph chromozóm a gen bcr/abl slouží zároveň jako marker při upřesňování diagnózy a při sledování úspěšnosti léčby. Nejcitlivější metodou detekující tuto aberaci je reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce, která ve své kvalitativní (RT-PCR) a kvantitativní (Q-RT-PCR) podrobně zjišťuje přítomnost a množství transkriptů bcr/abl. Kvantifikace množství transkriptu bcr/abl je důležitým terapeutickým ukazatelem pro pacienty s chronickou myeloidní leukémií. Dříve každá laboratoř měla své postupy a jednotky. Z toho vyplývala nemožnost srovnat naměřené hodnoty s jinými laboratořemi a to působilo zmatek i mezi hematologickými pracovníky. Hlavní klinická výzva byla vypracovat metodiku, která by včas odhalila nástup recidivy. S vývojem metody RT-PCR tento problém získal řešení. Díky této metodě je možné včas odhalit relaps onemocnění a monitorovat minimální reziduální chorobu u pacientů, kteří podstupují léčbu. Součástí této práce je zhodnocení stavu

standardizace a kvantifikace v České republice a ve světě. Některé laboratoře se spíše zaměřují na způsob absolutní kvantifikace, kdy se zjišťuje počet molekul transkriptu pomocí kalibrační křivky, která se vytvoří z několika standardů o známé koncentraci a následně se se změří vzorek pacienta a vynese se do grafu a odečte se jeho hodnota. Druhý způsob je relativní kvantifikace, tímto způsobem zjistíme relativní číslo, které se vyjádří jako poměr měřeného genu a referenčního genu.

Všechny metody používané v běžné klinické praxi musejí být validovány a verifikovány, stejně tomu je tak i u analýzy lidského genomu metodami molekulární genetiky. Ta se dnes stala nedílnou součástí diagnostiky mnoha onemocnění. Vzhledem k tomu, že v současnosti se dá očekávat zvýšený pohyb pacientů mezi jednotlivými pracovišti – ať už v rámci republiky, nebo i do zahraničí – je i u těchto metod zvýšená potřeba možnosti vzájemné kompatibility výsledků provedených na různých pracovištích. Jejich dostatečná validace by se proto měla stát samozřejmou součástí prováděných metod. Požadavek validace metod je současně jedním z požadavků norem ISO 17025 a ISO 15189. Podle normy je validace potvrzení přezkoušením a poskytnutím objektivního důkazu, že jsou jednotlivé požadavky na specifické cíle použití splněny.

2. Teoretická část

2.1 Historie

V roce 1845 byl poprvé publikován vědecký popis onemocnění, které se dnes nazývá chronická myeloidní leukémie. Toto onemocnění popsali dva lékaři nezávisle na sobě Dr. J.H. Bennett a Dr. R. Virchow. Všimli si enormního zvýšení leukocytů, změnou konsistence krve a zvětšení sleziny (24).

Od roku 1940 probíhali experimenti s chromozómalní analýzou. Teprve velký rozmach technologií v padesátých letech 20. století přinesl další pokrok v poznání tohoto onemocnění (1).

Roku 1960 Novell a Hungerford ve Philadelphii popsali nejprve u dvou mužů a v téže roce u dalších sedmi nemocných s CML ztrátu genetickému materiálu na raménku chromozómu skupiny G. Přestavěný chromozóm 22 byl později nazván chromozóm Philadelphia (Ph^1). Ph^1 proto, že se objevitelé domnívali, že je první ze série charakteristických abnormalit karyotypu, které bude možné nalézt u různých typů leukémií, později se od označení Ph^1 upustilo a označuje se pouze Ph (24). U CML byla prokázána asociace mezi genetickou abnormalitou a maligním onemocněním. Původně se myslelo, že se jedná o aberaci mezi chromozómem 21 a chromozómem 22. Až v roce 1973 zjistila J. Rowleyová, že se jedná o reciprokou translokaci $t(9;22)(q34;q11)$ (31).

2.2 Definice CML

Chronická myeloidní leukémie (CML) je myeloproliferativní choroba vycházející z pluripotentní kmenové buňky, u níž dominuje proliferace myeloidní řady a to zvláště v její granulocytární linii. V průběhu nemoci dochází k postupné diferenciaci maligních buněk. Prohlubuje se jejich autonomie. Při této nemoci dochází ke značné proliferaci a současně i k poruše dělení myeloidních buněk. Porucha zčásti postihuje i červenou a megakaryocytovou řadu (37). CML má typický progresivní průběh, který je charakterizován přechodem z chronické, léčebně dobře kontrolovatelné fáze, do fáze akcelerované a následně fáze terminální – blastické krize. Blastická krize má klinické příznaky již rozvinuté akutní leukémie, je však velmi odolná k léčbě a většinou po krátké době končí smrtí pacienta (23).

2.3 Patogeneze

Příčina, která vyvolává změnu na úrovni kmenové buňky a tvorbu Ph chromozómu, není známa. Za transformaci kmenové buňky je zodpovědný gen *bcr/abl* a jeho produkt, onkoprotein p210. U Ph chromozómu jde o přestavbu, která je výsledkem reciproké translokace mezi chromozómy 9 a 22 [$t(9;22)(q34;q11)$], při které dochází k fúzi protoonkogenu *abl* (Abelsenova myší leukémie) z chromozómu 9 a genu *bcr* (Breakpoint Cluster Region) z chromozómu 22 (12). Výsledkem této fúze je nový fúzní gen *bcr/abl*. Chromozóm 22 se touto translokací zkrátí a chromozóm 9 se naopak prodlouží. Ví se, že vznik tohoto genu je příčina CML (28).

Produktem fyziologického genu je tyrozinkináza. Tyrozinkináza p145 genu *abl* představuje jeden ze signálních proteinů regulace buněčné populace. Fúzní onkogen *bcr/abl* v oblasti exonu *bcr* 12-16 determinuje tvorbu fosfoproteinu s tyrozinkinázovou aktivitou, označovaného jako protein p210 (27).

Abnormální protein p210 vyvolá chaotickou fosforylaci zbytků cytoplazmatických proteinů, které hrají důležitou roli v regulaci adheze, motility, proliferace, diferenciaci a apoptózy. To postupně vede k abnormální aktivaci řady signálních drah a v konečném důsledku ke vzniku nádorového klonu s charakteristickým fenotypem (31).

Při uvedené patologické translokaci se také přenáší c-sis gen z chromozómu 22 na chromozóm 9. Tento gen kóduje růstový faktor nazývaný *platelet derived growth factor*. Zatím není jasné, zda gen c-sis má nějaký význam pro vznik nemoci (1).

Chromozómalní změny Ph chromozómu je možno nalézt v buňkách myeloidní řady, ale i v buňkách řady erytroidní, megakaryocytární, monocytární a v některých lymfocytech. Proč dochází k proliferaci zejména v myeloidní řadě, není známo (29). Onemocnění s podobným krevním obrazem jako chronická myeloidní leukémie, avšak bez cytogenetického průkazu Ph chromozómu, může mít přítomnu translokaci bcr/abl prokazatelnou pomocí PCR a je tedy také nazýváno chronickou myeloidní leukémií. Onemocnění bez průkazu Ph chromozómu a bez průkazu bcr/abl genu jsou řazeny k myelodysplaziím. Mají horší prognózu než CML (1).

2.4 Příznaky onemocnění a průběh

Počáteční chronická fáze nemoci může probíhat dlouho nepozorovaně, bez výrazných klinických příznaků. Chronická fáze trvá průměrně 3 až 4 roky. Vzhledem k výrazné variabilitě nemoci jsou, ale nemocní, u nichž trvá chronická fáze jen několik měsíců, nebo na druhou stranu i 10 let (23). U mnoha nemocných se chronická fáze choroby zjistí při náhodném vyšetření krevního obrazu, nebo je k lékaři přivádí váhový úbytek, noční pocení, únava a nevykonnost či tlak v levém podžebří. Na rozdíl od akutních leukémií zpravidla k obrazu choroby nepatří náchylnost k infekci a krvácení, neboť počty neutrofilních segmentů i trombocytů nejsou zpočátku sniženy. S postupem času se agresivita choroby stupňuje. Zvyšuje se rychlost proliferace buněk a mizí citlivosti leukemických buněk k léčbě. Pacient se postupně dostane do akcelerované fáze. Ve fázi akcelerace se zvyšuje únavnost a nevykonnost, mohou se objevit neinfekční teploty. Progresivně se zvětšující slezina může utlačovat břišní orgány, způsobuje dyspepsii a objevují se v ní bolestivé infarkty (36). Ve fázi akcelerace si nemocní mohou stěžovat na bolestivé subperiostální infiltráty. Bolesti jsou způsobené osteolýzou či extramedulární infiltrací. Pacienti trpí úbytkem hmotnosti často větším než 2kg za měsíc, progresí trombocytopenie, anémie, v periferní krvi přibývá blastů, nebo je patrná eozinofilie či bazofilie, při cytogenetickém vyšetření jsou navíc

zjišťovány nové chromozómalní aberace mimo Ph chromozóm. Histologicky se ve dřeni objevuje kolagenní fibróza. Klesá zdvojovací čas počtů leukocytů v periferní krvi. Nemoc vrcholí blastickým zvratem, který se podobá akutní leukémii (23). V případě blastického zvratu představují blasty a promyelocyty v kostní dřeni více než 50 % všech krevních elementů, nebo samotné blasty tvoří nad 30 % krevních buněk kostní dřene či periferní krve. V blastické krizi se dále zhoršuje celkový stav, neinfekční teploty jsou v této fázi téměř pravidlem. Příznaky zvratu plynou z trombocytopenie (hemoragická diatéza), nedostatku funkčních granulocytů a z anémie. V blastické fázi se může objevit leukemická infiltrace kůže a jiných orgánů, která v chronické fázi nebývá (36). Zvrat může být myeloblastický (60 % blastických zvrátů), lymfoblastický (30 %) nebo myelolymfoblastický (10 %). Velmi vzácný je blastický zvrat s megakaryoblasty nebo erytroblasty. Rozlišit blasty je možné morfologicky, cytochemicky nebo imunofixačně. Asi u 10 až 15 % pacientů choroba přejde v terminální myelofibrózu (1).

2.5 Léčba CML

Jako jeden z mála je tento druh leukémie dobře léčitelný. Nejrozšířenějším lékem je Glivec (Gleevec) s účinnou látkou imatinib. Tento speciálně navržený lék pracuje na principu inhibitoru tyrozin-kináz v kombinaci s cytosinarabinosidem. Dalším perorálním účinným inhibitorem tyrosinkinázy, který je imatinibu strukturálně podobný, ale má vyšší vazebnou afinitu k ATP kapse bcr/abl onkoproteinu, je nilotinib (Tasigna, Novartis). Dasatinib (Sprycel, Bristol-Myers-Squibb) je dalším perorálně účinným tyrosinkinázovým inhibitorem. Liší se od imatinibu schopností vázat se jak na aktivní tak na inaktivní konformaci abl kinázové domény. Jako nejúspěšnější způsob léčby je transplantace krvetvorných buněk (TKB) (37).

2.5.1 Sledování množství transkriptu bcr/abl při léčbě

Díky úspěšné léčbě se množství transkriptu dostává na velmi nízkou a tedy hůře detekovatelnou hladinu. Tuto nízkou hladinu lze stanovit metodou RT-PCR. Aby bylo možné plně využít RT-PCR s ohledem na její prognostický význam, je nutné provádět vyšetření v pravidelných krátkých časových intervalech (20). Harmonogram vyšetření po TKB byl doporučen skupinou EICML (European Investigators of Chronic Myeloid

Leukemia). Je zapotřebí provést předtransplantační vyšetření pomocí kvalitativní, nejlépe multiplex RT-PCR, ta umožní zjistit všechny doposud známé formy přestavby genu bcr/abl. To při dalších vyšetřeních u pacientů s méně častým typem přestavby zabrání falešně negativnímu monitorování po TKB (18).

K prvnímu vyšetření bcr/abl po transplantaci dochází v prvním až druhém měsíci. Toto vyšetření probíhá pomocí kvalitativní RT-PCR, která rozdělí pacienty do rizikových skupin 1) pacient negativní s nízkým rizikem relapsu 2) pacient pozitivní s vysokým rizikem relapsu. Stupeň rizika u jednotlivých pozitivních pacientů však kvalitativní metoda již není schopna určit. Teprve kinetika hladiny bcr/abl (nárůst, setrvalý stav, pokles) naznačí další vývoj onemocnění a tedy i aktuální riziko relapsu (25).

U skupiny pacientů z negativní skupiny se během prvního roku provádějí vyšetření v intervalech 2-3 měsíců. Ve druhém roce po transplantaci je kontrola po šesti měsících z periferní krve (21). Pacienti, u kterých byla v průběhu vyšetřování zjištěna pozitivita, stejně jako pacienti s pozitivitou zjištěnou ihned po TKB, jsou vyšetřováni kvantitativní metodou v pravidelných měsíčních intervalech, aby bylo možno nastupující relaps včas zjistit a zahájit léčbu. Relapsy po TKB bývají velmi rychlé. Kvantitativní testy i po zahájení léčby probíhají v měsíčních intervalech až do vymizení positivity (23).

2.6 Stanovení diagnózy

2.6.1 Vyšetření krevního obrazu

Typickým znakem nemoci je výrazná leukocytóza v periferní krvi, která může dosahovat hodnot až $400 \cdot 10^9/l$. pro chorobu je diagnostický posun doleva, k nevyzrálým formám granulocytů. V diferenciálním krevním obraze jsou zastoupeny všechny stupně vývoje granulocytu, tedy myelocyty, metamyelocyty a tyčky. Velmi často nebývají zmnožené jen krvinky neutrofilní řady, ale jsou zmnožené také bazofilní a eozinofilní granulocyty. Méně často může být i anémie. Uvedené změny v diferenciálním krevním obraze jsou zřetelnější při pohledu na absolutní počty než při pohledu na procentuální zastoupení krvinek (1).

Snížený bývá v 80% případů index alkalické fosfatázy (ALP) v leukocytech, který se normalizuje v remisi onemocnění nebo při infekčních komplikacích či při akceleraci CML. Na rozdíl od CML bývá tento index zvýšen u myelofibrózy.

U chronické neutrofilní (granulocytární) leukémie, která je uváděna v rámci návrhu WHO klasifikace, dochází jen ke zmnožení neutrofilní řady, nikoliv řad ostatních (37).

2.6.2 Krevní nátěr

V krevním nátěru je zřetelné hojné vyplavování nezralých prekurzorů (metamyelocyty, myelocyty), dále bývá přítomno eozinofilie a bazofilie (29).

2.6.3 Vyšetření kostní dřeně

V kostní dřeni je evidentní zmnožení granulopoézy a nezřídka také megakaryocytární řady. Při histologickém vyšetření kostní dřeně je patrný posun doleva, zmnožení myelocytů v myelogramu a zmnožení retikulinových vláken a případně i pseudo-Gau-cherovy buňky (1).

2.6.4 Další laboratorní vyšetření

Pacienti s CML mívají v séru zvýšené koncentrace vitamínu B₁₂, dále laktátdehydro-genázy a kyseliny močové (37).

2.7 Genetické metody pro stanovení diagnózy

2.7.1 Cytogenetika a molekulární genetika

Při stanovení diagnózy máme primárně za úkol zjistit, zda se jedná o gen bcr/abl, proto se využívá metod, které nám převážně určí majoritní klon. Translokační změny lze prokázat metodami klasické cytogenetiky (přítomnost Philadelphia chromozóm, Ph chromozóm (1). Metodou polymerázové řetězové reakce lze prokázat gen bcr/abl s citlivostí 1:100 000 až 1:1 000 000. Velmi důležitou metodou pro stanovení diagnózy je metoda FISH, která objeví i jiné translokace genu bcr/abl. Citlivost metody FISH je 1×10^3 . Metoda RT-PCR detekuje nejen přítomnost aberace jako cytogenetické metody, ale sleduje expresi genu bcr/abl, tedy jeho aktivitu, a tím i aktivitu maligního klonu (16). Citlivost RT-PCR je až 10 000x vyšší než citlivost ostatních metod včetně cytogenetických (23).

2.7.1.1 Metoda FISH

Metoda FISH (fluorescenční in situ hybridizace) je standardní cytogenetické vyšetření, které se používá k upřesnění a doplnění chromozómalního vyšetření, eventuálně k ověření nálezu zjištěného běžným cytogenetickým rozbořem. Metoda využívá procesu denaturace a reasociace DNA (33). Metoda fluorescenční in situ hybridizace spočívá v navázání specifického řetězce DNA, který na sobě nese flourescenční barvivo (DNA sonda), komplementárně k vyšetřovanému úseku DNA. K hybridizaci dochází přímo ve vyšetřovaném biologickém materiálu, tedy v místě (in situ), nikoliv na izolované DNA (5). Při zvýšené teplotě 72-75 °C dojde k rozvolnění vláken DNA sondy i vyšetřovaného vzorku, při následném ochlazení většinou na 37 °C se sonda specificky naváže do vyšetřovaného místa - dochází k hybridizaci. Díky fluorescenčnímu značení sondy se pak ve fluorescenční mikroskopii vyvine barevný signál (33).

2.7.1.2 Metoda PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR, z anglického Polymerase Chain Reaction) je metoda rychlého zmnožení (amplifikace) vybraného úseku DNA. Amplifikovaný úsek DNA je ohraničen primery (oligonukleotidy), což jsou fragmenty DNA o 17 – 28

nukleotidech, které si díky své komplementaritě přisedají právě ke koncům vybraného úseku. Od přisedlých primerů probíhá syntéza DNA (7). Samotnou syntézu provádí termostabilní DNA polymeráza, izolovaná nejčastěji z bakterie *Thermus aquaticus*, odtud označení Taq polymeráza. Jelikož je tento enzym termostabilní, uchovává si svou aktivitu i přes několikeré působení teploty blížíící se teplotě varu při probíhající reakci. Při reakci je využíváno cyklických změn teplot, které umožňují denaturaci DNA (její rozvolnění na jednořetězce), přisedání primerů a syntézu DNA (5).

2.7.1.2.1 Princip PCR

Při PCR je využíváno podobného principu, na jakém dochází k syntéze DNA během replikace DNA v buňce. Základním principem PCR je opakovaná řízená denaturace dvouřetězcové DNA a následná renaturace osamocených řetězců se specifickými oligonukleotidy, které jsou v reakční směsi v nadbytku. Tyto oligonukleotidy slouží následně jako primery pro syntézu nového řetězce DNA. Amplifikace DNA probíhá v opakujících se cyklech, které mají tři kroky (17).

První krok je denaturace, při ní se dvouřetězcová molekula DNA po dobu 20-30 sekund zahřívá na teplotu 94-98 °C. Při této teplotě dochází k rozrušení vodíkových můstků v dvouřetězcové molekule DNA a k rozvolnění této dvoušroubovice. Vzniknou tak dvě jednořetězcové molekuly DNA (19).

Druhým krokem je nasedání primerů (hybridizace), kdy se teplota snižuje na 50 až 60 °C. To umožní nasednutí primerů na specifická místa DNA. Na dvouvláknové úseky DNA/primer se váže DNA polymeráza (16).

Třetím krokem je syntéza DNA (elongace), při níž je teplota zvolená dle použité DNA polymerázy. Nejběžněji to bývá Taq polymeráza, ta má optimální aktivitu při 72 – 80 °C. v tomto kroku dochází k samotné syntéze DNA. Ve směru od 5' konce k 3' konci přirůstá vlákno DNA komplementární k původní molekule DNA (17).

2.7.1.2.3 Komponenty tvořící reakci

Templát

Příliš velké množství templátové DNA způsobuje při reakci problémy a to nespecifické nasedání primerů. Pro PCR reakci často stačí i velmi malé množství nukleové kyseliny, avšak je nutné, aby vzorek nebyl kontaminován žádnou jinou DNA, která by se do vzorku mohla dostat z rukou pracovníka či nedostatečně čistých pomůcek. I nepatrná příměs kontaminující DNA by se mohla natolik namnožit a tím zkreslit pravdivost výsledů. Kromě toho vzorek s templátovou DNA nesmí obsahovat látky, které by mohli inhibovat polymerázu (fenol, ethanol, heparin) (5).

Primery

Jako primery se zpravidla používají oligonukleotidy o délce 17 až 28 nukleotidů. Pro správný průběh reakce musí primery splňovat několik požadavků. Primery musejí být specifické pro amplifikovanou sekvenci a měli by být pokud možno zcela komplementární k úseku, na který mají dosedat. Dalším kritériem je, aby primery k sobě navzájem nebyly komplementární, protože jinak by se mohly chovat jako templář (během PCR se budou tvořit jejich dimery). Dále by neměl obsahovat vnitřně komplementární sekvence, aby nedocházelo k vnitřní hybridizaci (tvoření smyček) (16). Teplota tání primeru by měla být alespoň 50°C. V PCR je zapotřebí dvou primerů, proto je nutné, aby teplota nasedání byla optimální pro oba primery. Teplota nasedání se odvíjí od délky primeru a počtu GC párů (čím větší je délka a obsah GC párů tím je vyšší teplota nasedání). Dále musí být teplota dostatečně vysoká, aby se zabránilo nespecifickému nasedání primerů k templátové DNA. Jeden primer nasedá na 5' konec řetězce genu a v průběhu PCR se elonguje ve směru replikace. Tyto primery se označují jako kódující (forward primer, upstream primer). Druhý primer se označuje jako antikódující (reverse nebo downstream primer) (22).

Polymeráza

Čistě teoreticky by šlo v reakci použít jakoukoliv polymerázu, ale kvůli vysokým teplotám při denaturační fázi, při níž by došlo i k denaturaci enzymu, musela by se polymeráza přidávat v každém cyklu. Proto je výhodné používat termostabilní DNA polymerázu. Nejvýznamnějším zástupcem je tzv. Taq polymeráza, která se izoluje z bakterie *Thermus aquaticus* žijící v horkých pramenech. Její teplotní optimum se pohybuje kolem 75°C, kdy dokáže k primeru přidat asi 150 bází za sekundu. Při teplotě nad 90°C není aktivní, a-však odolá denaturaci (25).

Základní reakční roztok

Základní reakční roztok obsahuje i další součásti. Kromě všech čtyř deoxynukleosidtrifosfátů (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) se do něj přidává pufrující složka a soli, jimiž se navodí vhodná iontová síla prostředí a pH prostředí. Pro správný průběh reakce je zapotřebí hořčnatých iontů Mg^{2+} ty působí jako kofaktor polymerázy. Při nízké koncentraci Mg^{2+} může být nízký výtěžek reakce a naopak při vysoké koncentraci Mg^{2+} může dojít k tvorbě nespecifických produktů (17).

2.7.1.3 Metoda RT-PCR

Metodou reverzní transkripce (RT) je izolovaná RNA přepsána do komplementární DNA (cDNA) a ta se pak použije jako templát pro PCR reakci. I když vlastní přepis RNA do cDNA není zvlášť obtížný, je tato metoda technicky podstatně náročnější než samotná amplifikace DNA. RNA se rychle degraduje účinkem RN-áz, které jsou obecnými kontaminanty vzorků, pomůcek i chemikálií. RN-ázy jsou navíc termostabilní, nepoškodí je ani sterilizace autoklávováním a aktivitu si zachovávají i po čištění materiálu některými denaturačními činidly. Aby se zabránilo degradaci RNA, ošetřují se pomůcky a roztoky inhibitory RN-áz (19).

2.7.1.3.1 Historie metody RT-PCR

Od doby svého uvedení na trh v roce 1977 byl Northern blot značně používán pro RNA kvantifikaci navzdory svým nedostatkům. Šlo o časově náročnou techniku, která vyžadovala pro detekci velké množství RNA, proto byla kvantitativně nepřesná při

nízkém obsahu RNA. Objev reverzní transkriptázy při studii replikace viru v genetickém materiálu vedla k vývoji RT-PCR, která je na rozdíl od vytlačené metody Northern blot dodnes využívána pro detekci a kvantifikaci RNA (10).

Metoda RT-PCR se ukázala jako dobrým měřítkem pro detekci a srovnávání hladiny RNA z několika důvodů. Má širokou škálu měření množství RNA ($>10^7$ násobně) a poskytuje přehled o kvalitativních a kvantitativních datech. Díky své jednoduchosti, senzitivitě a specifitě se RT-PCR používá v široké škále experimentů (22). Běžně se využívá k diagnostice infekčních onemocnění, dále k zjištění nádorových buněk na základě genetické abnormality. Zavedení kvantitativní RT-PCR v klinické mikrobiologii výrazně přispělo ke zlepšení diagnostiky infekčních chorob a k odhalování nově vznikajících onemocnění, jako jsou např. nové kmeny chřipky (19). Metoda má své uplatnění nejen v lékařských oborech, ale i v potravinářství a průmyslu, kde se zkoumá mikrobiální zátěž v potravinách a detekci geneticky modifikovaných organismů (3).

2.7.1.3.2 Výhody RT-PCR

Výhodou této metody je využívání mRNA, která odráží vysokou míru transkripční aktivity maligních buněk a poskytuje tak vyšší senzitivitu. Dále nevyžaduje dělení se buňky, takže vyšetření může být provedeno i tam, kde selže klasická cytogenetika (23).

I přes veškeré výhody by však vyšetření pomocí RT-PCR mělo být v pravidelných intervalech doprovázeno klasickým cytogenetickým vyšetřením, které umožňuje zjistit nově vznikající aberace (10).

2.8 Metody pro monitorování léčby

Při sledování úspěšnosti léčby je sledováno hned několik hledisek. Z klinického hlediska se sleduje stav pacienta, zda nemá nějaké problémy a příznaky rozvíjejícího se relapsu. Dále je pacient sledován hematolog, kdy se sleduje krevní obraz (zastoupení krevních buněk). Pouhé sledování stavu pacienta a zastoupení krevních elementů je nedostačující, protože odhalení relapsu v tomto případě by bylo příliš pozdě. Nemoc by mohla znovu propuknout, proto se dříve využívalo metod cytogenetických, které více

vypovídající o stavu nemoci (16). U pacientů podstupující léčbu je sledována kostní dřeň fluorescenční hybridizací in situ. Tato kontrola poskytuje lékařům přesné posouzení choroby na chromozómní úrovni. Nicméně u léčených pacientů dochází k snížení detekovatelnosti leukemických buněk (Ph⁺) cytogenetická analýza FISH má omezenou mez citlivosti a takže pro poskytnutí správných výsledků se nehodí. Tudíž je zapotřebí sledovat stav nemoci na molekulární úrovni (33). Využívá se více citlivá metoda RT-PCR, která je schopna detekovat jednu leukemickou buňku v přibližně 10⁵ až 10⁶ normálních buňkách. V současnosti je doporučováno pravidelně monitorovat hladinu transkriptů BCR-ABL pomocí real-time RT-PCR (12).

2.8.1 Metoda Real-Time RT-PCR

Cílem je detekovat hledaný znak nádorových buněk na úrovni RNA sekvence (informační RNA – mRNA). K tomu účelu se využívá metoda reverzní transkripce (RT). Pomocí ní je izolovaná RNA přepsána do komplementární DNA (cDNA) a ta se pak použije jako templát pro PCR reakci. Real-Time RT-PCR je metoda umožňující přesnou kvantifikaci hledané cDNA sekvence ve vzorku (36). Využívá se zde několika možností detekce narůstajícího množství ampliconů. Všechny jsou založeny na nárůstu fluorescence reakční směsi. Principiálně nejjednodušší je metoda využívající fluorescenčních barviv, která se interkalují mezi báze DNA (např. Sybr Green), narůstající fluorescence pak odpovídá vzrůstajícímu množství DNA ve vzorku (5).

2.8.1.1. Fluorescenční sondy metody Real-Time PCR

V současné době existuje několik různých typů fluorescenčních DNA sond pro detekci v Real-Time PCR. Nejčastější fluorescenční systémy jsou SyberGreen, Molecular Beacon sonda, TaqMan sonda, Scorpion sonda a FRET (5).

Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) neboli fluorescenční rezonanční přenos energie je princip, na kterém pracují FRET sondy. FRET sondy nebo-li sousedící sondy jsou speciálním podtypem sond, které jsou navrženy tak, aby dvě sondy hybridizovaly vedle sebe na sousedící nukleotidové sekvence, nejčastěji oddělené dvoubázovou mezerou. První sonda se nachází na 3' konci a je značena fluoresceinem nebo fluoroforem s excitačním maximem okolo 480 nm, nazývaným donor. Druhá

sonda bývá označována některým z mnoha barviv s vyšším excitačním a emisním maximem, jako jsou kyaninová barviva Cy3 nebo TAMRA (34). Této sondě se říká akceptor. Ten musí být na 3' konci blokován, aby nedocházelo k prodlužování sondy DNA polymerázou během PCR reakce. Po uskutečnění hybridizace obou sond s DNA řetězcem donor přenáší energii na akceptor, který emituje fluorescenční záření o vyšší vlnové délce (17).

TaqMan sondy jsou oligonukleotidy, které mají zhášec na 3' konci a reportér na 5' konci. Využívají 5'→3' exonukleázové aktivity Taq DNA polymerázy. Sonda se váže na sekvenci mezi oběma primery (5). Zhášec v bezprostřední blízkosti reportéru způsobuje téměř úplnou redukci jeho fluorescence. TaqMan sondy jsou sondami hydrolyzačními, kdy během amplifikace Taq DNA polymeráza přiřazuje volné dNTP od primeru směrem k navázané sondě, kterou od 5' konce štěpí, čímž dojde k přerušení vlivu zhášeče na reportér, který následně emituje fluorescenci (11).

Molecular beacons, neboli molekulární majáky, jsou sondy, které vytváří vlásenku se smyčkou. Vlásenka je tvořena vzájemně komplementárními řetězci, smyčka je komplementární s cílovými sekvencemi. Označení konců sond je stejně jako u ostatních sond na 5' konci je reportér a na 3' konci je zhášec (17). Po navázání sond na DNA prodělávají sondy strukturní změny. V původní konformaci je reportér v bezprostřední blízkosti zhášeče a ten absorbuje jeho emitovanou energii a tím k emisi fluorescence nedochází. V annealing kroku PCR reakce, se reportér dostává z dosahu zhášeče a emituje fluorescenci. Molekulární majáky se mohou stejně jako TaqMan sondy využívat v metodě multiplex PCR (33).

Scorpion sondy jsou podobné molecular beacons. Také tvoří smyčku a vlásenku s reportérem na 5' konci a zhášecem na 3' konci, na rozdíl do molecular beacons jsou spojeny s primerem. K 5' konci primeru je smyčka 3' koncem připojena nejčastěji tzv. HEG (hexethylene glycol) blokátorem, který zabráňuje extenzi řetězce od tohoto místa k 5' konci smyčky (5). Po prvním cyklu během extenze primeru DNA polymerázou smyčka hybridizuje s komplementární sekvencí řetězce, na kterém se nachází, dochází k

uvolnění vlivu zhášedce na reportér a k emisi fluorescence. Případné primer-dimery tak netvoří fluorescenční signál (36).

2.8.2 Kompetitivní RT-PCR

Kompetitivní RT-PCR je kvantitativní metoda, ve které se amplifikuje testovaná DNA spolu s kompetitivní DNA v jedné reakční zkumavce. Kompetitivní templát obsahuje stejné sekvence pro vazbu primerů jako cílová DNA s tím rozdílem, že má jinou velikost. Množství se stanoví pomocí ekvivalentní intenzity PCR- produktů odvozených z cílové DNA a kompetitivní DNA. Touto metodou se dříve prováděla kvantifikace bcr/abl (7).

2.9 Izolace RNA

Izolace RNA. Pro účely reverzní transkripce je nutné nejdříve izolovat RNA z příslušného biologického vzorku. V buňkách se nachází celkem tři druhy RNA (t-RNA, rRNA a mRNA). Většinou je pro účely reverzní transkripce žádoucí pouze mRNA, která kóduje dané geny (6). Pro selektivní izolaci mRNA se využívá zejména její polyadenylace (sekvence A_n , $n \sim 10 - 200$, ozn. polyA) na jejím 3' konci. Nejjednodušší způsob je použití pevného nosiče, na který je kovalentně navázán oligonukleotid polyT, jehož délka se pohybuje v rozmezí 10 – 20 nukleotidů. Přidáním takového nosiče ke směsi různých typů RNA dojde k hybridizaci mRNA k polyT na nosiči pomocí sekvence polyA. Po odmytí nenavázaných RNA jsou hybridizačně navázané molekuly mRNA eluovány pomocí zvýšení teploty nebo iontové síly (7). Operace s RNA jsou oproti operacím s DNA náročnější na čistotu práce a kvalitu používaných reagensů. RNA je oproti DNA značně labilní v důsledku snadné degradace RN-ázy (enzymy specificky štěpící RNA). Tyto enzymy jsou ve značném množství přítomné ve všech biologických systémech. Proto je potřeba dbát na sterilitu používaných chemikálií (15). Tyto enzymy však díky své vysoké stabilitě odolávají i některým sterilizačním krokům a je proto nutné je v příslušných reagensích chemicky inaktivovat pomocí látky DEPC (diethylpyrokarbonát), který je potom odstraněn zahřátím. Samozřejmě při práci s RNA je používání pipet a dalších pomůcek, které

jsou určeny pouze pro tyto účely. Výjimkou není ani vymezení speciálního pracovního stolu nebo laboratoře pro tyto účely (14).

2.9.1 Způsoby kvantifikace mRNA

2.9.1.2 Absolutní kvantifikace

Při absolutní kvantifikaci se přímo stanovuje výchozí počet molekul DNA templátu v porovnání se standardy o známé koncentraci. Standardní křivku získáme tak, že připravíme ředící řadu templátové DNA (například desítkovým ředěním).

S jednotlivými vzorky provedeme Real-Time RT-PCR a pro každé ředění dostaneme určitou hodnotu (25). Z těchto získaných hodnot se připraví standardní kalibrační křivka. Zkoumaný vzorek se zpracuje stejně jako řada standardů. Po vynesení vzorku na kalibrační křivku se odečte hodnota vzorku. Absolutní kvantifikace má jisté nevýhody a to snadné ovlivnění kvality vzorku ať už samotným odběrem či skladováním vzorku a následným transportem materiálu do laboratoře. Dále rychlá degradace RNA pomocí RN-áz, díky tomu se mohou výsledky značně lišit (4).

2.9.1.3 Relativní způsob kvantifikace

Pro určení míry genové exprese se zpravidla používá relativní kvantifikace. Tímto způsobem se zjišťují změny v množství mRNA testovaného genu v porovnání s kontrolou (kalibrátor). Při kvantifikaci je nezbytné vyhodnotit vnitřní referenční gen, který nám určí, do jaké míry bylo u testovaných vzorků použito srovnatelné množství vstupního materiálu (8). Jako vnitřní kontrola jsou používány tzv. housekeeping geny, jejichž transkripce či počet jejich kopií v genomu či testované mRNA by měly být stejné u všech testovaných vzorků. Tímto způsobem dojde k zamezení rozdílů, které by mohli být způsobeny nanesením vzorků v nestejně koncentraci, anebo rychlou degradací pomocí RN-áz. Nejčastěji používanými referenčními geny jsou např. geny aktinu, tubulinu a geny pro ribosomální proteiny (4).

2.10 Detekce transkriptů fúzního genu bcr/abl kvalitativně

Molekulární potvrzení diagnózy CML je založeno na detekci přítomnosti transkriptů fúzního genu bcr/abl ve vzorku krve či kostní dřeně a na určení typu přestavby. Znalost typu přestavby je důležitá pro následující kvantifikaci hladiny transkriptů bcr/abl a zamezení falešně negativních výsledků (13). Pro diagnostické účely je nejvíce rozšířena multiplex reverzně transkriptázová PCR (RT-PCR), jež zachycuje expresi bcr/abl s různými typy přestaveb (major, minor a mikro). V jednom kroku je současně amplifikována oblast cDNA specifická pro jednotlivé přestavby fúzního genu bcr/abl a netranslokovaná oblast kontrolního genu BCR, jejíž pozitivní amplifikace slouží ke kontrole kvality vzorku (3). Přestože je toto vyšetření v laboratořích velice rozšířené, existují ojedinělé případy pacientů nesoucích jedinečné přestavby a jejich správné určení může být problematické. Proto je nutné přistoupit k alternativním postupům umožňujícím jednoznačné ověření typu přestavby. Např. při diagnostickém vyšetření fúzního genu bcr/abl metodou dle Crosse et al je v případě potvrzení proužku o délce $\sim 1\,000$ bp v cDNA vzorku pacienta nutné rozlišit, zda se jedná o přestavbu e19a2 (926 bp), či e6a2 (1 123 bp). Po klasické elektroforetické separaci PCR produktu je určení délky málo přesné a nedostačuje k jasné identifikaci typu přestavby. Pro potvrzení/vyvrácení přestavby e19a2 lze provést PCR reakci s použitím specifických primerů, které množí úsek nesoucí přestavbu mikro (135 bp). Při této PCR je znemožněna amplifikace úseku e6a2 (25).

Kromě multiplex RT-PCR (senzitivita $\sim 10^{-4}$) je možné zjišťovat typ přestavby genu bcr/abl citlivější metodou specifické dvoukolové nested RT-PCR (senzitivita $\sim 10^{-6}$). Inzerce či aberace krátkých sekvencí v místě nasedání primerů, ojedinělé vzácné zlomy či vzácné splicingové varianty však představují riziko nesprávné interpretace během rutinního vyšetřování. U netypických přestaveb genu bcr/abl, na které mohou poukázat neočekávané výsledky screeningových metod, proto hraje významnou roli metoda přímého sekvenování, která odhalí atypické místo zlomu v RT-PCR amplifikovaném transkriptu bcr/abl (21).

2.11 Monitorování množství bcr/abl transkriptů v České republice

Počátky kvantifikace množství mRNA bcr/abl sahají stejně jako jinde ve světě do 90. let 20. století. Metoda byla založena na principu kompetitivní reverzně transkriptázové (RT) PCR. ÚHKT byl prvním pracovištěm v České republice, které v roce 1994 tuto metodu ještě ve vylepšené formě zavedlo. Kvantifikace bcr/abl transkriptů měla v té době své místo především v oblasti monitorování minimální reziduální nemoci u pacientů po transplantaci kostní dřeně (21). V roce 2001 získalo molekulární monitorování hladiny bcr/abl zcela nový rozměr a zásadní místo pro úspěšný management léčby díky vývoji nové instrumentace v oblasti molekulární biologie, který přinesl kvantitativní PCR v reálném čase. Tato technologie je časově a laboratorně méně náročná než původní kompetitivní PCR brzy se rozšířila pro potřeby kvantifikace transkriptů bcr/abl celosvětově. V současnosti je doporučováno pravidelně monitorovat hladinu transkriptů bcr/abl pomocí Real-Time RT-PCR v periferní krvi (23).

2.12 Validace a verifikace metod

Validace metod je v klinických laboratořích vyžadována normami řízení kvality (ISO 17025, ISO 15189). Validace je potvrzení získané prostřednictvím poskytnutí objektivních důkazů, že požadavky na specifické zamýšlené použití nebo specifickou aplikaci byly splněny. Validace potvrzuje, že měřicí postup/měřicí systém/výrobek IVD MD (In vitro diagnostic – medical device) je schopen plnit požadavky na ně kladené. Jinak řečeno, že úroveň měření je dostatečná, postupy měření korektní a s řádně provedenou kalibrací (32). Rozsah a hloubka validace musí vždy odpovídat potřebě získat dostatek údajů k rozhodnutí, zda metoda je skutečně vhodná pro zamýšlený účel (ISO 17025, ISO 15189). Validační plány jsou dány charakterem validované metody. Validace kvalitativní metody vyžaduje významně menší úsilí, než validace metody kvantitativní. Metody validované výrobcem – výrobky IVD MD disponující značením CE vyžadují nižší rozsah validace než metody typu in-house vyvinuté samotnou laboratoří nebo laboratoří modifikované, či z jiné laboratoře přejaté (8).

Verifikaci lze chápat jako potvrzení získané prostřednictvím objektivních důkazů, že data o analytických znacích poskytnutá výrobcem, jinou laboratoří, nebo referenční institucí jsou v dané laboratoři s použitím konkrétního měřicího systému dosažena. Verifikaci pak rozumíme, že měřicí postup/systém/výrobek IVD MD je plně funkční v konkrétní laboratoři. V tomto doporučení budeme operovat s pojmem verifikace pouze v souvislosti s výrobky uvedenými a trh v souladu se zásadami Direktivy IVD 98/79 EC. V ostatních případech použijeme termínu validace (25).

2.12.1 Proč je nutné provádět validaci a verifikaci

Výsledky analytických měření mají mimořádně silný dopad v praxi. V klinické laboratoři mohou rozhodným a někdy i fatálním způsobem ovlivnit zdraví, kvalitu života a někdy i samotný život pacienta. Provádět měření o dostatečné kvalitě je profesionální povinností analytika. Validace poskytuje naprosto nezbytně potřebná data o nejistotě (respektive intervalu spolehlivosti) výsledků měření (30).

2.12.2 Kdo provádí verifikace

2.12.2.1 Výrobce diagnostik

Podle direktivy IVD 98/79 EC musí výrobce uvádět na trh Evropské unie pouze validované měřicí systémy. Postup a rozsah validace IVD MD je dán normou (EN 13612: 2002). Pro výrobce uvádějící své produkty na trh v USA rovněž platí, že tyto jsou validované v rozsahu daném dokumentem Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, vytvořeném následujícími institucemi: US department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation (4).

2.12.2.2 Laboratoře

Konečnou odpovědnost za adekvátní validaci měření však nese samotná laboratoř. Jestliže data validace pocházejí z dokumentace výrobců a jsou podložena experimenty v laboratořích výrobců, profesionálních organizací a v kalibračních/referenčních laboratořích, pak laboratoř musí tato data neustále doplňovat a verifikovat. Hlavními nástroji, kterými toho lze docílit jsou: průběžná edukace pracovníků, provádění pravidelné kontroly kvality (vnitřní i mezilaboratorního porovnávání), vypracování a

revize SOP a jejich validace, při které se rozhodující důraz klade na hodnocení výsledků mezilaboratorních porovnávání a studií, průběžné sledování dokumentů a informací poskytovaných referenčními institucemi a organizacemi typu JCTML (Join Committee for Traceability in Laboratory Medicine), LGC, AOAC, dodržování standardních operačních postupů výrobků splňujících požadavky Direktivy IVD 98/79 EC (4).

2.12.3 Kdy se provádí validace/verifikace

Stavů kdy by se měla provádět v laboratoři validace a verifikace je hned několik například při zavedení nové metody, při pořízení a před aplikací nového analytického měřicího systému do laboratoře, pokud se rozšíří použití stávajících metod o další účel (například rozšíří se měření o další druh biologického materiálu) a ukazuje-li kontrola kvality přetrvávající problém (32).

2.12.4 Validace metod molekulární genetiky

2.12.4.1 Validace kvalitativních metod

Požadovanými parametry validace jsou stanovení specifčnosti a citlivosti tj. určení všech variant (mutací/polymorfismů) testovaného znaku (genu/nukleotidové sekvence), které jsou touto metodou stanoveny, a testování negativní kontroly, tedy DNA/RNA, která neobsahuje prokazovaný znak pro vyloučení falešné pozitivivity.

Specifčnost je pravděpodobnost negativního výsledku testu v případě nepřítomnosti hledané varianty testovaného znaku (8). Je vyjadřována jako poměr mezi správnou negativitou (True Negativity TN) a součtem správné negativity a falešné pozitivivity (False Positivity FP) podle vzorce: $TN/(TN+FP)$ Výsledná hodnota je vyjádřena jako relativní číslo, jehož hodnota se pohybuje v rozmezí 0–1 (v ideálním případě se blíží jedné).

Citlivost je pravděpodobnost pozitivního výsledku testu v případě přítomnosti hledané varianty testovaného znaku. Je vyjadřována jako poměr mezi správnou pozitivitou (True Positivity TP) a součtem správné pozitivivity a falešné negativity (False Negativity FN) podle vzorce: $TP/(TP+FN)$ (24). Výsledná hodnota je vyjádřena jako relativní číslo, jehož hodnota se pohybuje v rozmezí 0–1 (v ideálním případě se blíží

jedné). Stanovení specifčnosti a citlivosti provádíme s použitím certifikovaného referenčního materiálu (CRM), pokud je dostupný. Není-li dostupný CRM, je nutno mít k dispozici vlastní referenční materiál, jehož pozitivita/ negativita byla ověřena jinou nezávislou metodou. Jako referenční materiál lze použít také vzorky z externí kontroly kvality, kde jsou již potvrzené výsledky (8).

Další požadavky na validaci těchto metod je testování opakovatelnosti (opakovat měření jednoho vzorku nejméně 10krát v jednom dni), testování reprodukovatelnosti (porovnání mezi sérií v různých dnech opět 10krát 1 vzorek), stanovení meze detekce (tj. minimální množství testovaného znaku/DNA/RNA/buněk) a stanovení robustnosti, kterou ověřujeme vnímavost metody na případné odchylky od optimálních podmínek jejího provádění (4).

2.12.4.2 Validace kvantitativních metod

Stanovení specifčnosti a citlivosti je stejné jako u validace kvalitativní metody. Změny jsou v následujících parametrech. Testování opakovatelnosti, tj. vzájemné porovnání výsledků v jedné sérii, současně v jednom dni, jedním pracovníkem (minimálně 5krát 1 vzorek ve třech koncentracích na okrajích a ve středu detekčního rozmezí). Testování reprodukovatelnosti, tj. vzájemné porovnání mezi sériemi, v různých dnech, různými pracovníky minimálně 5krát 1 vzorek ve třech koncentracích na okrajích a ve středu detekčního rozmezí (30). Z hodnot dosažených při testování opakovatelnosti a reprodukovatelnosti stanovit přesnost vyjádřenou hodnotou nejistoty měření pomocí vhodného parametru, např. stanovením směrodatné odchylky nebo variačního koeficientu. Do hodnoty nejistoty měření je třeba zohlednit i všechny ostatní složky, které ji mohou podstatným způsobem ovlivnit (např. nejistoty použitých měřidel, systematické odchylky stanovených hodnot, ect) (32).

2.13 Pokusy standardizace ve světě

První studie ve světě byly spíše kvalitativní, používali nested RT-PCR a standardní elektroforézu s agarózovým gelem. Tato metoda poukázala, zda ve vzorku bcr/abl mRNA byla detekována nebo nebyla přítomna. Využití této metody nebylo příliš vhodné pro rozpoznání relapsu nemoci. První pokusy o standardizaci byly zaměřeny především na potřebu odstranit falešně pozitivní výsledky vyplývající z kontaminace. Počáteční kvantitativní postupy byly založeny na použití kompetitivní PCR. Po roce 1990 byla ve vývoji kvantitativní metoda Real-Time-PCR, u které se s určitými změnami zůstává do dnes (25).

Ačkoliv pokračující úsilí směrem k provádění mezinárodní standardizace, existuje mnoho různých forem testování kvantitativní PCR. Kvantitativní PCR má technicky náročný vícestupňový postup, a proto mohou být rozdíly v odběru vzorku, v přípravě buněk, izolaci RNA, RT, výběru vnitřní kontroly a tvorby standardní křivky (19). V roce 2006 proběhl první průzkum, do kterého se zapojilo 34 laboratoří, které testovali dva stejné vzorky s bcr/abl. Průzkum získal 34 různých číselných hodnot v různých jednotkách. V roce 2012 byl znovu pokus srovnání dvou vzorků (jednoho s nízkou koncentrací a druhého s vysokou koncentrací transkriptu bcr/abl) ve více laboratořích, tentokrát se problém a nápadné rozdíly objevili ve vzorku s vysokou koncentrací bcr/abl (2).

Tato rozšířená variabilita způsobuje obrovský zmatek mezi pacienty a hematology v klinické praxi. Neschopnost mezilaboratorní srovnatelnosti činí obtížnější péči o pacienty. Hlavní klinická výzva je vypracovat metodiku pro včasnou detekci recidivy (13).

Několik předních akademických organizací navrhlo doporučení k zlepšení přesnosti a harmonizaci RT-PCR metodě. Bylo navrženo několik kroků v postupu RT-PCR a) řádný odběr vzorků, b) příprava buněk, c) volba enzymů a primerů pro krok RT, d) výběr genu pro vnitřní kontrolu PCR, e) správné postavení standardní křivky PCR (22).

V pre-analytické části je důležitá kontrola množství odebrané krve, počet leukemických buněk ve vzorku a doba transportu vzorku do laboratoře. Tyto těžko kontrolovatelné pre-analytické faktory významně přispívají ke změnám v integritě a množství RNA (16). Analytická část má za úkol určit geny, které jsou vhodné pro vnitřní kontrolu v RT-PCR. Při výběru vhodnosti genů bylo dbáno na tyto kritéria I) výkonost při sériovém testování vzorků, II) možnost využití u reziduální nemoci, III) stabilitě měnících se podmínek v buňkách. Tyto kritéria poskytla informace o vlastnostech kontrolních genů (20).

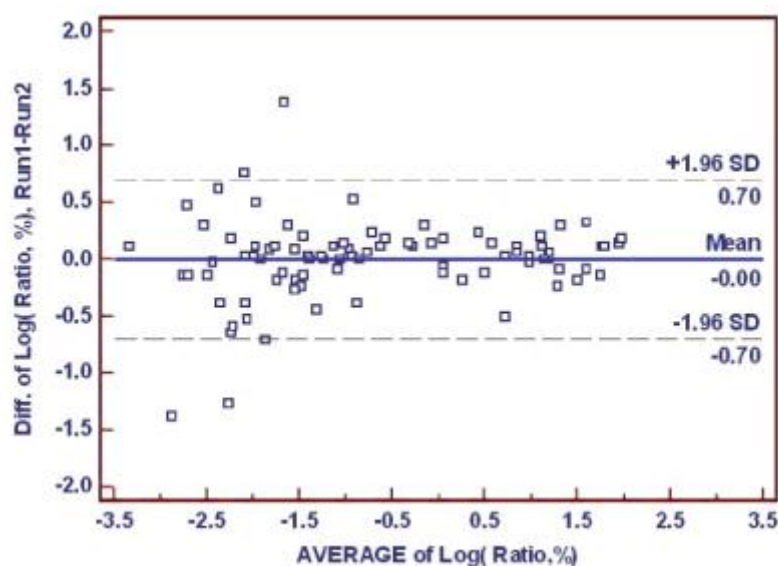
Díky letitým studiím se dospělo k závěru, že standardizaci lze uskutečnit dvěma způsoby. První možností je výměna vzorků prostřednictvím referenční laboratoře, což vede k tvorbě převodních faktorů specifických pro laboratoř. Druhou možností je prostřednictvím referenčních materiálů s předdefinovanými IS hodnotami (20).

Mezinárodní randomizovaná studie léčby pomocí interferonu a STI571 (IRIS) ukázala vysokou účinnost inhibitoru tyrozinkinázy imatinibu v léčbě CML. Tato velká mezinárodní studie zahrnuje porovnávání účinnosti několika druhů léčiv na velkém počtu pacientů (9). Také zde byla hodnocena klinická užitečnost monitorování hladiny BCR-ABL mRNA pomocí RT-PCR, kdy byly výsledky pacientů normalizované podle standardních procesů. Následně bylo navrženo vyjadřování výsledků u monitorování hladiny transkriptu bcr/abl v souladu s mezinárodní stupnicí (IS). Navrhovaný vzorec pro individuální přepočet bcr/abl na procenta v mezinárodním měřítku, je

$$\% \frac{BCR-ABL}{ABL} IS = E_{\Delta Ct} \times 100 \times CF \quad \text{kde } E_{\Delta Ct} \text{ je lot specifická účinnost a CF je}$$

přepočtový koeficient (27).

Metoda GeneXpert BCR/ABL Monitor Assay vydává výsledky v mezinárodní stupnici (IS). K tomu využívá přepočtový koeficient (CF), který byl stanoven na základě studie IRIS (9). Hodnota CF u metody je 0,47 ta byla vypočtena z průměrných hodnot měření. K ověření přepočtového faktoru bylo změřeno > 70 pacientů metodou GeneXpert BCR/ABL monitor (38).



Graf č. 1 : Měření přesnosti s použitím klinických vzorků od pacientů s CML (38).
Test byl prováděn z plné krve odebrané do EDTA.

2.14 Standardizace v České republice

Národní referenční laboratoř (NRL) Ústavu hematologie a krevní transfuze (ÚHK) organizuje každoroční mezilaboratorní porovnávání zkoušek pro oblast kvantitativního stanovení hladiny transkriptů bcr/abl v ČR od roku 2007. ÚHK vystavuje certifikát laboratořím, které úspěšně absolvují MPZ. Platnost certifikátu je 1 rok od data vystavení. V posledních 5 letech se podařilo vytvořit síť českých laboratoří, které poskytují tento typ vyšetření, a navodit úzkou spolupráci mezi laboratořemi a NRL ÚHK, která poskytuje technickou podporu a konzultace včetně praktického školení (23).

V rámci Evropské leukemické sítě (European Leukemia Net – ELN) vznikl projekt EUTOS for CML (European Treatment Outcome Study), který si vytyčil úkol harmonizovat molekulární monitorování hladin bcr/abl transkriptů mezi laboratořemi/centry v Evropě (23). Primárními cíli tohoto projektu byly:

1. standardizace metodik pro kvantifikaci bcr/abl,
2. vytvoření sítě národních referenčních laboratoří, ověření jejich metodik, certifikace, výpočet a validace přepočtových koeficientů

NRL pro DNA diagnostiku v ÚHKT byla v rámci EUTOS pro CML jmenována panelem expertů ELN referenční laboratoří (RL) pro ČR v roce 2008. Přepočtový koeficient (CF), který je počítán a validován na základě výměny 25–30 vzorků CML pacientů mezi RL a testovanou laboratoří, slouží ke zvýšení srovnatelnosti výsledků mezi laboratořemi/centry tak, aby bylo možné mezi sebou porovnávat a vyhodnocovat léčebné výsledky (např. v rámci národních a mezinárodních registrů). K validaci CF mohou přistoupit laboratoře, které uspěly v MPZ, tj. prokázaly technickou způsobilost k provádění kvantitativní Real-Time RT-PCR transkriptů bcr/abl (20). Pouze laboratoře s validovaným CF mohou vydávat výsledky množství bcr/abl v jednotkách IS platných v rozmezí 0,01–10 %. Bylo prokázáno, že přepočtové koeficienty umožňují upravovat výsledky tak, že dochází k výraznému sjednocení hodnot mezi laboratořemi. Přepočtové koeficienty je však nutné každoročně validovat, přičemž u laboratoří s nestabilním CF je validace nutná alespoň 2krát do roka. Ukázalo se, že harmonizace bcr/abl mRNA kvantifikace založená na výše popsaném způsobu výpočtu a validace CF není optimální; (I) proces je zdoluhavý a finančně náročný; (II) vyžaduje účast referenčních laboratoří, přičemž celý proces je otevřený pro limitovaný počet laboratoří; (III) mnoho center čelí problému se získáváním patřičného množství vzorků pacientů pro validaci CF ($n = 25–30$); (IV) není zcela jasné, jak často by měly být CF revalidovány; (V) není zcela jasné, jak postupovat v případě laboratoří, které nedosahují definovaných kritérií pro provádění kvantitativní Real-Time RT-PCR. Proto bylo nutné vyvinout referenční materiály, jež jsou kalibrovány k primárním WHO (World Health Organization) bcr/abl standardům, které proces validace zefektivní, více unifikuji a urychlí (23).

Další možností, jak výrazně snížit problémy s odchylkami měření a jak eliminovat nutnost validace přepočtových koeficientů, je používání plně automatizovaného uzavřeného systému, jako je např. CE-IVD Xpert bcr/abl Monitor test (GX systém), jenž je kompatibilní s automatickým analyzátořem. NRL ÚHKT je jednou ze 4 evropských EUTOS laboratoř, které participují na mezinárodním projektu, jehož cílem je porovnání měření bcr/abl^{IS} GX systémem a metodou Real-Time RT-PCR pro bcr/abl standardizovanou v EUTOS laboratořích (23). Výhoda tohoto automatizovaného systému spočívá ve velké časové úspoře analýzy a nízkých nárocích na objem primárního vzorku krve. Iniciálně se připraví vzorek z 200 µl krve a spolu s dalšími reagensy je převeden do cartridge, která se vkládá do přístroje. Celý proces zakončený vydáním výsledku v hodnotách IS trvá méně než 2 hod. Tento systém bude mít své místo především v laboratořích či klinických pracovištích s nižším průchodem vzorků (21).

3. Praktická část

3.1 Cíle práce

Tato práce se zabývá srovnáním různých způsobů kvantifikace transkriptu bcr/abl u chronické myeloidní leukémie. Cílem práce je podat přehled dané problematiky, podrobně zvládnout a provést jeden ze způsobů relativní kvantifikace genu bcr/abl. Seznámit se s managementem vzorků v laboratoři, seznámit se s verifikací / validací těchto metod. Provést verifikaci použité metody a stanovit jednotlivé parametry testu.

3.2 Hypotéza

Kvantifikace transkriptu bcr/abl pomocí systému GeneXpert bcr/abl Monitor je použitelná metoda pro in vitro diagnostiku – metoda je verifikovatelná.

3.3 Metodika

3.3.1 Odběr a transport vzorku

Odběr krve se provádí v odběrových místnostech anebo v hematologické ambulanci. Krev musí být odebrána do protisrážlivého roztoku. Nejlepším antikoagulans je citrát sodný anebo EDTA. Neosvědčil se odběr do heparinu a v žádném případě nelze provést vyšetření ze zmraženého vzorku (28). Před provedením odběru musí být každá odběrová nádobka náležitě označena datumem odběru a identifikačními údaji osoby, od které byl vzorek odebrán. Vzorek spolu s náležitě vyplněnou žádankou by měl být do laboratoře doručen optimálně do 24 hod a zpracování by mělo být do 48 hodin po odběru. Teplota během transportu by měla být 2-8^o C.

3.3.2 Metoda GeneXpert bcr/abl Monitor

Použití metody

Metoda je založena na principu Real-Time RT-PCR. Test slouží pro monitorování bcr/abl translokace v periferní krvi u pacientů s chronickou myeloidní leukémií (CML).

3.3.2.1 Princip testu

Metoda Xpert bcr/abl Monitor pracuje na principu Real-Time RT-PCR. Provádí se v systému Cepheid GeneXpert Dx. Systém automatizuje a integruje čištění vzorku, amplifikaci nukleových kyselin a detekci cílové sekvence ve vzorku. Systém se skládá z přístroje, počítače a předinstalovaného softwaru, který provádí kontrolu průběhu testu v odebraných vzorcích a dále na zobrazení výsledků. Tento systém vyžaduje na jedno použití jednorázovou kazetu GeneXpert (38).

Souprava obsahuje reakční činidla pro detekci bcr/abl major translokace P210 (b2a2 a b3a2) a ABL transkript jako endogenní kontrolu ve vzorku periferní krve. Množství transkriptu bcr/abl je vyjádřeno jako poměr bcr/abl / abl (38).

Poznámky:

- Bezpečnostní listy (BL) pro všechna činidla uvedené v tomto testu jsou k dispozici na vyžádání u technické podpory Cepheid (38).

3.3.2.2 Skladování a manipulace

- Obsah Xpert bcr/abl Monitor kit se skladuje při teplotě 2-8 ° C.
- Kazeta se nesmí otvírat, dokud vše není připraveno k provedení testu.
- Kazeta a chemikálie se musí použít do 30 minut po otevření obalu.
- Výjimkou je lyzační roztok, který se nesmí použít, pokud jsou reagenty zakalené, anebo vykazují barevné změny (38).

3.3.2.3 Potřebný materiál a přístroje (které nejsou součástí kitu)

- GeneXpert analyzátor, počítač, čtečku čárových kódů
- návod k obsluze
- izolační box s laminárním prouděním vzduchu
- vortex
- mikrocentrifuga (1000 g minimum)
- pipety a pipetovací špičky s filtrem (navrhovaný objem: 200 µl, 1000 µl) -
- 100% ethanol
- Jednorázové rukavice a sterilní pipety

3.3.2.4 Příprava vzorku a plnění kazety

- 1) Na pracovní plochu v izolačním boxu si připravíme lahvičky s proteinázou K a lyzačním činidlem. Činidla před použitím musíme řádně promíchat.
- 2) Do prázdné lahvičky (ta je součástí sady s přesným označením písmenem S, tedy vzorek) o objemu 5 ml dáme 40 µl proteinázy K.
- 3) Dále přidáme 200 µl promíchané krve pacienta a obsah lahvičky zvortexujeme po dobu 5 sekund.
- 4) Takto to inkubujeme při pokojové teplotě po dobu 1 minuty.
- 5) K vzorku v lahvičce přidáme 1 ml lyzačního činidla. Nyní budeme vortexovat po dobu 10 sekund.
- 6) Inkubujeme při pokojové teplotě po dobu 10 minut.
- 7) K vzorku v lahvičce přidáme 1 ml 100% etanolu. Zvortexujeme po dobu 10 sekund a dáme stranou.
- 8) Vyjmeme kazetu z obalu a připravíme si lahvičky s vymývacím činidlem a promývacím činidlem, které je třeba také promíchat.
- 9) Po otevření víčka kazety přidáváme obsah z lahviček do kazety podle označení komůrek.
- 10) Napipetujeme celý obsah z lahvičky se vzorkem do komůrky označené (S).

- 11) Napipetujeme 2,1 ml z lahvičky promývacího činidla do komůrky označené číslo (1).
- 12) Napipetujeme 1 ml z lahvičky proplachovacího činidla do komůrky s číslem (2).
- 13) Napipetujeme 1,4 ml z lahvičky vymývacího činidla do komůrky s číslem (3).
- 14) Zavřeme víko kazety a ujistíme se, že víčko zapadlo pevně na své místo.



Obr (1). Otevřená kazeta s označením jamek

Zdroj: Příručka GeneXpert Dx Systém (38)

3.3.2.5 Spuštění testu.

1. Zapneme počítač a přístroj GeneXpert Dx.
2. Na pracovní ploše počítače spustíme ikonu GeneXpert Dx zástupce.
3. Přihlásíme se k softwaru GeneXpert Dx systém pomocí svého uživatelského jména a hesla.
4. V okně GeneXpert Dx systému poklepeme na tlačítko „vytvořit test“. Zobrazí se nám dialogové okno pro naskenování čárového kódu.
5. Naskenujeme čárový kód z kazety. Dále se nám zobrazí okno „vytvořit test“. Díky čárovému kódu se automaticky vyplní políčka pro následující pole:
Vybrat ID šarže testu a kazety.

6. Do pole identifikace vzorku naskenujeme nebo zadáme číslo vzorku. Ujistíme se, že zadané identifikační číslo vzorku je správné, protože vzorek je s identifikačním číslem spojen i pro výsledky testu.
7. Dalším krokem je spuštění testu poklepnutím na tlačítko Start Test. V dialogovém okně, které se nám objeví, zadáme heslo.
8. Otevřeme si dvířka přístrojového modulu a vložíme kazetu. Po zavření dveří se rozsvítí zelená kontrolka.
9. Po dokončení testu musíme počkat, až systém uvolní zámek dveří.
10. Použité kazety jsou zlikvidovány podle postupů pro nakládání s infekčním odpadem.

3.3.2.6 Výsledné hodnocení

Analyzátor automaticky detekuje relativní hodnoty fúzního transkriptu bcr/abl a provádí kontrolu Ct (číslo cyklu kdy se hodnota měřené fluorescence dostane nad prahovou hodnotu) ABL i bcr/abl a test kvality sond a vnitřní kontroly. Hodnoty ABL Ct musí být v intervalu 12-18 a hodnoty bcr/abl Ct musí být v intervalu 12-32. V případě chyby vy zpracování vydá počítač následující chybová hlášení (38).

Tab. 1 : Chybová hlášení

Výsledek testu	Možné příčiny	Doporučení
bcr/abl invalid	-Vzorek obsahuje příliš bcr/abl nebo ABL transkriptu -Selhání endogenní kontroly ABL: pokud je ABL Ct hodnota < 12 a nebo endpoint < 200 -ABL Ct je v normě, ale ABL endpoint < 200 je způsobeno nestandardní amplifikační křivkou -bcr/abl Ct < 12	-opakujte test s 20 µl původního vzorku v nové cartridgi
	-Špatná kvalita vzorku -RT-PCR inhibice jestliže je ABL Ct > 20 a nebo endpoint < 12	-zkontrolujte kvalitu vzorku -opakujte test se stejným množstvím původního vzorku v nové cartridgi
Error (code 2008)	Tlak překračující limit	-opakujte test s 20µl původního vzorku v nové cartridgi
Error (code 5006, 5007, 5008, 5009)	Selhání v testu sond	-opakujte test se stejným množstvím původního vzorku v nové cartridgi
No result	-Selhání analýzy dat -Přístroj GeneXpert selhal (zkontrolujte podle operačního protokolu řístroje) např.teplotní senzor, pracovní polohu přístroje nebo test integrity cartridge	-opakujte test se stejným množstvím původního vzorku v nové cartridgi
bcr/abl nebyl detekován v detekčním limitu >0,003% IS pro krev s EDTA	Pravděpodobně nedostatečná kvalita vzorku	-opakujte test se stejným množstvím původního vzorku v nové cartridgi

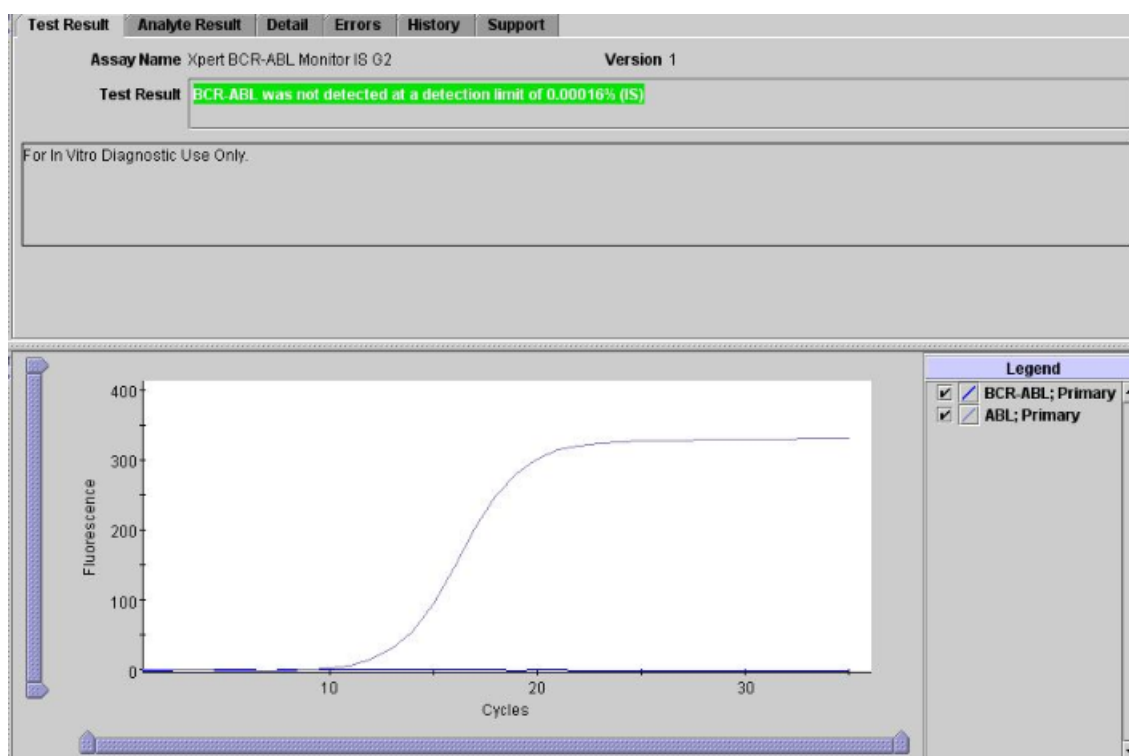
4. Výsledky

4.1

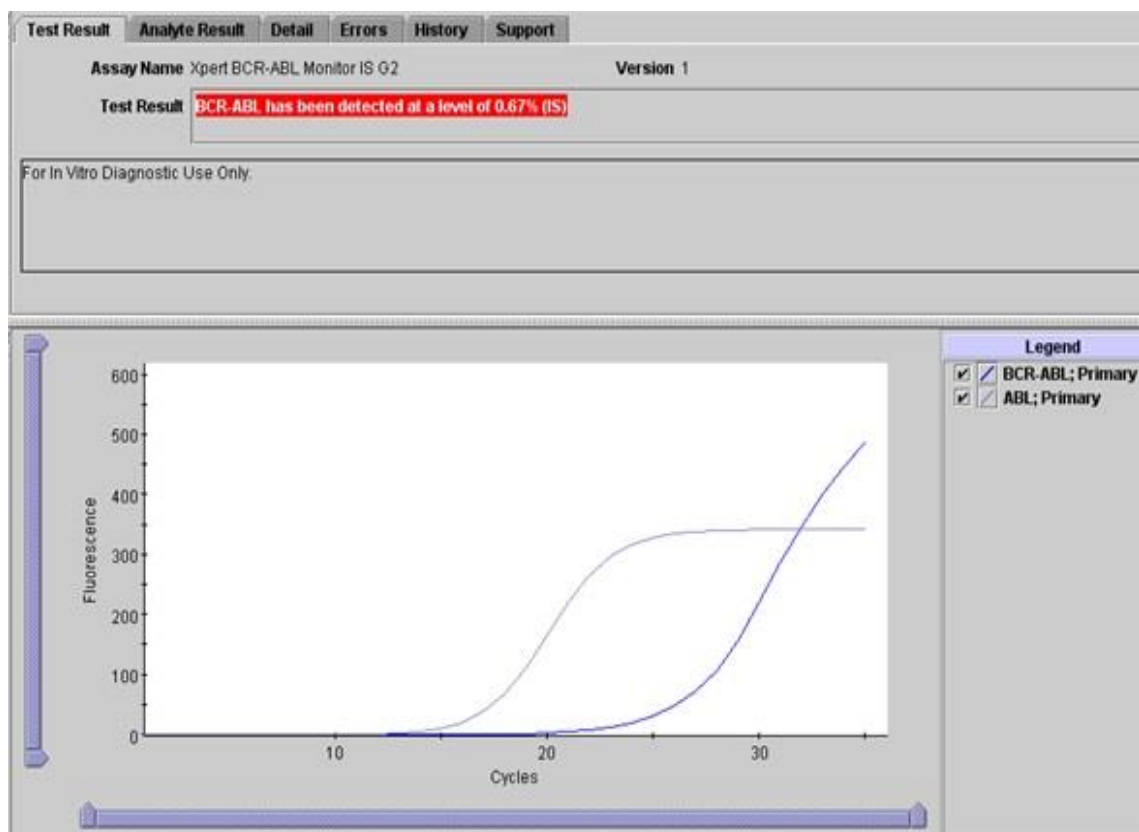
V praktické části této práce jsem pod vedením školitele Mgr. Ondřeje Scheinosta provedla měření v rámci verifikace popsané metody.

Obr. č. 2 - výsledky Real-Time RT-PCR u pacienta

vyšetřovaného na přítomnost transkriptu bcr/abl - negativní výsledek. Osa X: počet cyklů PCR reakce, osa Y: normalizovaná fluorescence. Tmavě modrá křivka: Amplifikace transkriptu bcr/abl. Světle modrá křivka: amplifikace transkriptu abl. Zeleně je zvýrazněno zobrazení konkrétního detekčního limitu při negativním výsledku (zde detekční limit = 0,00016%)



Obr. č. 3 - výsledky Real-Time RT-PCR u pacienta vyšetřovaného na přítomnost transkriptu bcr/abl. Osa X: počet cyklů PCR reakce, osa Y: normalizovaná fluorescence. Tmavě modrá křivka: Amplifikace transkriptu bcr/abl. Světle modrá křivka: amplifikace transkriptu abl. Červeně zvýrazněno je závěrečné vyčíslení kvantity bcr/abl/abl (zde 0,67%) (IS).

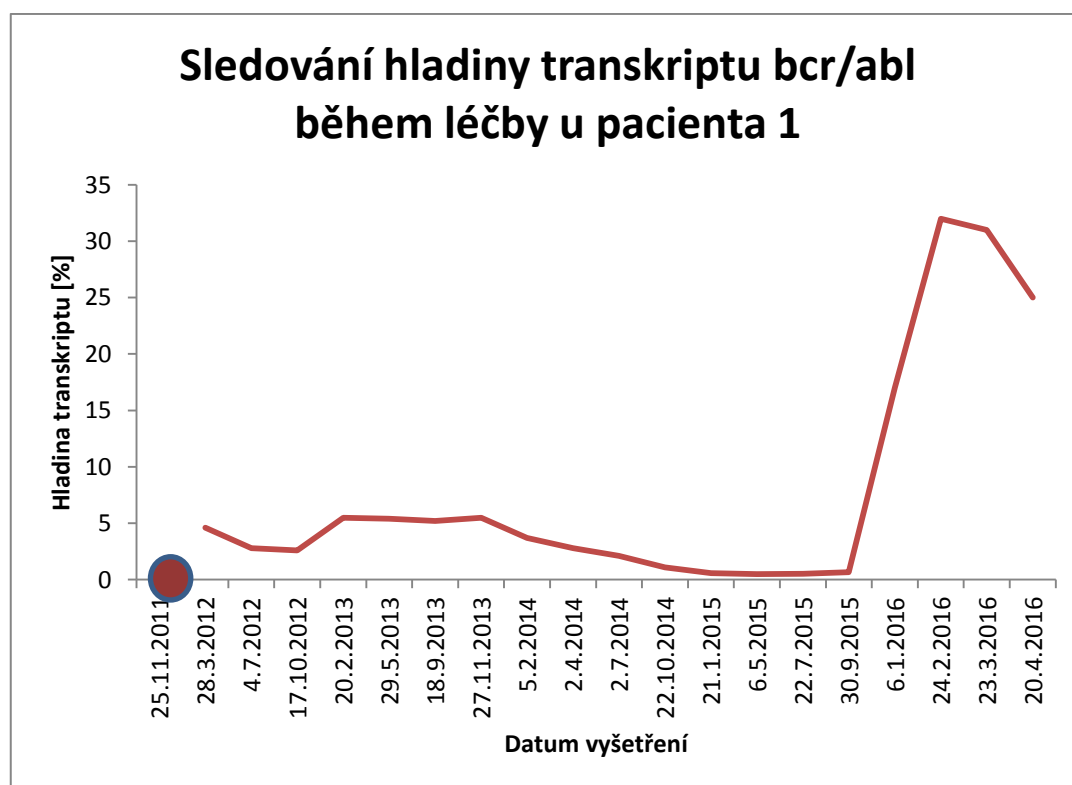


4.2 Sledování hladiny transkriptu bcr/abl během léčby

Pacient 1: žena narozena 1940

Pacientka je sledována od 25. 11. 2011, kdy bylo provedeno vyšetření metodou FISH pro stanovení diagnózy. Naměřená pozitivita klonu byla 95%. Pacientka se začala léčit a hladina transkriptu od té doby byla sledována metodou Real-Time RT-PCR. Pacientka je stále sledována, má stále měřitelnou hladinu transkriptu. Pacientka byla sledována v letech 2012 až 2015 v intervalech 2 až 4 měsíců. Od roku konce roku 2015 je pacientka sledována každý měsíc z důvodu nárůstu množství transkriptu bcr/abl.

Graf 2 : Sledování hladiny transkriptu bcr/abl během léčby

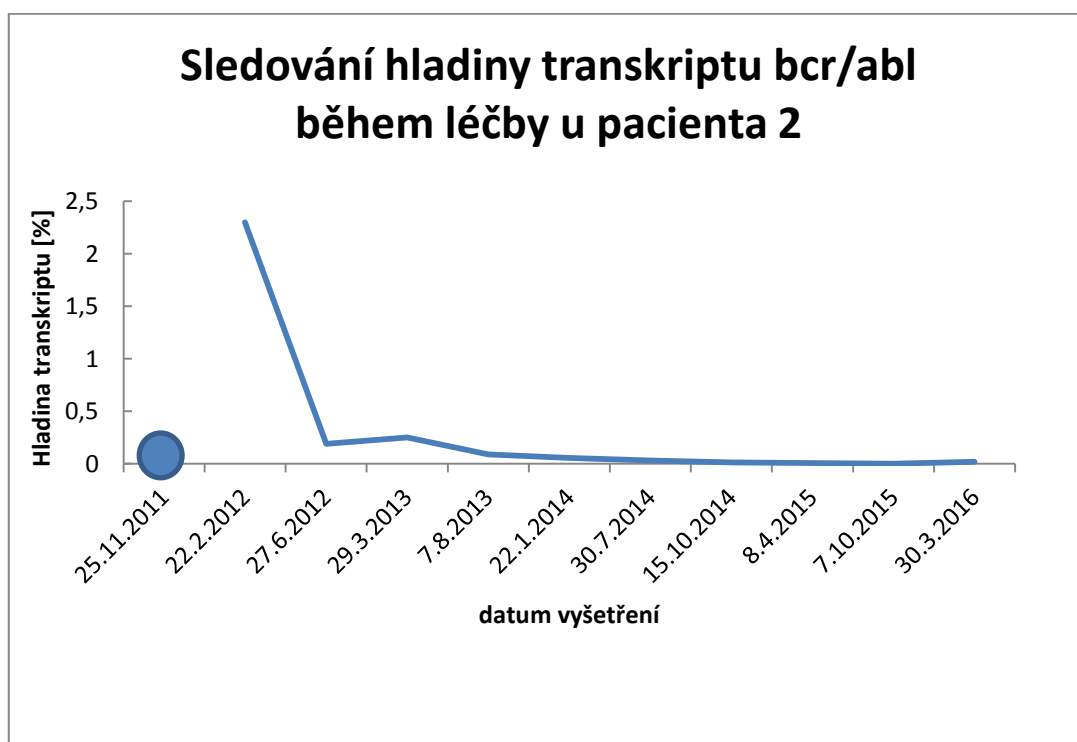


Poznámka: hladina vyšetření ze dne 25. 11. 2011 (měření při stanovení diagnózy) není v grafu uvedena z důvodu rozdílných metod měření.

Pacient 2: muž narozen 1953

U pacienta byla nemoc zjištěna 25. 11. 2011, kdy stejně jako u pacientky 1 byla použita metoda FISH pro stanovení diagnózy. Naměřená pozitivita klonu byla 64%. Pacient 2 byl sledován díky nízkým hodnotám každého půl roku. Při vyšetření 7. 10. 2015 byl zjištěn negativní výsledek (hladina transkriptu byla nižší než detekční limit 0,0013%), ale na kvalitativním testu byla viditelná velmi slabá pozitivita. Přesto pacient musí být sledován dále v půl ročních intervalech. Při poslední kontrole 30. 3. 2016 byla opět zjištěna detekční hladina transkriptu.

Graf 3 : Sledování hladiny transkriptu bcr/abl během léčby



Poznámka: Poznámka: hladina vyšetření ze dne 25. 11. 2011 (měření při stanovení diagnózy) není v grafu uvedena z důvodu rozdílných metod měření.

4.3 Praktické provedení verifikace

Použitá technologie: GeneXpert bcr/abl Monitor

Verifikační charakteristiky:

- A. Opakovatelnost
- B. Reprodukovatelnost
- C. Nejistota
- D. Detekční limit

Výsledky

A. Opakovatelnost

Číslo měření	Naměřená hodnota (%)
1	14
2	10
3	10
4	15

Průměr	12,25
Směrodatná odchylka	2,27
CV% (variační koeficient)	18,59

Vyhodnocení: Opakovatelnost metody je vyhovující.

B. Reprodukovatelnost

Byla měřena v rozmezí 48 hodin (výrobce stanovená stabilita vzorku). Při měření v rámci jednoho dne byl analyzátor mezi měřeními restartován. Stanovení reprodukovatelnosti a dalších parametrů bylo provedeno pouze na vysoké hladině transkriptu bcr/abl.

Den měření	Naměřená hodnota (%)
První den dopoledne	14
První den odpoledne	14
Druhý den dopoledne	19
Druhý den odpoledne	13

Průměr	15
Směrodatná odchylka	2,34
CV%	15,63
CV% výrobce	41,1

Vyhodnocení: reprodukovatelnost metody je hodnocena jako vyhovující. Variační koeficient je nižší než stanovený výrobcem- tam se však jedná o parametr stanovený na velkém počtu vzorků v různých centrech.

C. Nejistota

Vzhledem k tomu, že v rámci verifikace nebyl využit materiál s referenční hodnotou s deklarovanou nejistotou, je kombinovaná nejistota vyjádřena jako Nejistota reprodukovatelnosti a z ní je vypočtena rozšířená nejistota pomocí koeficientu rozšíření $k=2$, což odpovídá 95% hladině spolehlivosti.

$$U_c = 2 \times C_{V_{\text{reprodukovatelnost}}}$$

$$U_c = 31,26 \%$$

D. Detekční limit

Pro každou šarži kitu GeneXpert bcr/abl Monitor je výrobcem stanovena kalibrační křivka a hodnota účinnosti PCR pro stanovené parametry. Tyto hodnoty jsou obsaženy v identifikačním čárovém kódu každé cartridge. Vzhledem k tomu, že se jedná o stanovení mRNA, počítá se s možnou variabilní degradací mRNA a ke každému stanovení je vypočten konkrétní a jedinečný detekční limit, který je uváděn ve výsledku.

Celkový závěr: naměřené hodnoty byly schváleny jako použitelné pro stanovení fúzního genu bcr/abl v klinických vzorcích.

5. Diskuse

Cílem mé práce bylo srovnáním různých způsobů kvantifikace transkriptu bcr/abl u chronické myeloidní leukémie a provést jeden ze způsobů relativní kvantifikace genu bcr/abl a pokusit se jej srovnat s dalším způsobem. Při praktickém provedení jsem se seznámila se s managementem vzorků v laboratoři a provedla jsem verifikaci použité metody a stanovila jsem její jednotlivé parametry testu. Měření pro mou bakalářskou práci jsem prováděla pod odborným dohledem v Nemocnici České Budějovice a.s.

Moje hypotéza ověření kvality verifikace využití metody GeneXpert bcr/abl Monitor pro sledování hladiny transkriptu bcr/abl byla úspěšná. Potvrdila jsem, že naměřené hodnoty byly schváleny jako použitelné pro stanovení fúzního genu bcr/abl v klinických vzorcích.

Chronická myeloidní leukémie je nádorovým onemocněním krvetvorné tkáně, jehož výjimečné postavení mezi ostatními nejen krevními, ale i nádorovými chorobami má hned několik důvodů. V historii výzkumu nádorových onemocnění byla CML první chorobou, u které byla nalezena typická chromozomální porucha, nazvaná dle místa objevu tzv. Filadelfský chromozóm (37). CML je charakterizována přítomností hybridního genu bcr/abl, který vzniká v důsledku reciproké translokace t(9;22)(q34;q11). Gen bcr/abl kóduje hybridní protein s tyrozinkinázovou aktivitou.

Jaké jsou rozdíly v nárocích na metody pro stanovení diagnózy a pro sledování úspěšnosti léčby. Hlavním rozdílem je, že pro stanovení diagnózy využíváme metod cytogenetických a ty jsou pro detekci přítomnosti transkriptů fúzního genu bcr/abl dostačující, ale pro sledování léčby jsou naprosto nevhodné. Nevhodnost těchto metod je z důvodu nízké citlivosti. Pro detekci transkriptu bcr/abl používáme metody PCR s citlivostí 10^2 - 10^5 . Tuto metodu využívají k zjištění transkriptu bcr/abl DNA. Metoda RT-PCR vychází z RNA, která je přepsána na komplementární cDNA její citlivost je až 10 000 vyšší než citlivost cytogenetických metod. Jednou z hlavních výhod metody RT-PCR je využití mRNA, která odráží vysokou míru transkripční aktivity maligních buněk.

Na metody pro sledování úspěšnosti léčby klademe větší nároky na citlivost, potřebujeme přesně znát hladinu transkriptu bcr/abl a k tomu je zapotřebí využívat metody kvantitativní. Dříve se využívala kompetitivní PCR, ale ta vycházela z DNA, hodnocení bylo nepřesné – na základě porovnání intenzity proužků. Kompetitivní PCR je pracná metoda, ale oproti RealTime RT-PCR méně nákladná (23). V současnosti je doporučováno pravidelně monitorovat hladinu transkriptů BCR-ABL pomocí RealTime RT-PCR je to nejcitlivější metoda pro detekci nízké hladiny transkriptu bcr/abl. Metoda RealTime RT-PCR je plně automatizovatelná (systém GeneXpert) a tedy méně pracná, i když poměrně drahá (21).

Podle dostupných literárních pramenů, první pokusy kvantifikace byly na základě vytváření standardní kalibrační křivky, která přímo stanovuje výchozí počet molekul DNA templátu v porovnání se známými standardy (4). Díky možnosti ovlivnění kvality vzorku u absolutní kvantifikace se přešlo k relativnímu způsobu kvantifikace, ta určuje relativní poměr počtu molekul vůči kontrole. U relativní kvantifikace je velmi důležité správně zvolit „housekeeping“ geny (8).

Dříve se validace přepočtového koeficientu se prováděla v pravidelných ročních intervalech na základě výměny 25-30 vzorků. Validaci přepočtového koeficientu mohli provádět pouze laboratoře, které uspěly v MPZ, tj. prokázaly technickou způsobilost k provádění kvantitativní Real-Time RT-PCR transkriptů bcr/abl. Ukázalo se, že takto prováděná validace CF není optimální; (I) proces byl zdoluhavý a finančně náročný; (II) vyžadoval účast referenčních laboratoří, přičemž celý proces byl otevřený pro limitovaný počet laboratoří; (III) mnoho center čelilo problému se získáváním patřičného množství vzorků pacientů pro validaci CF ($n = 25-30$). Proto bylo nutné vyvinout referenční materiál, který je přesně kalibrován. Další možností validace CF využívané v současné době je používání plně automatizovaného uzavřeného systému, jako je např. GeneXpert BCR/ABL Monitor test. Ten umí výrazně snížit problémy odchylky měření a eliminuje nutnost validace přepočtových koeficientů. Využívání automatizovaných kazet vede k zlepšení mezilaboratorní reprodukovatelnosti. Mnoho studií potvrdilo, že tato automatizovaná bcr/abl detekce má

lepší analytický výkon včetně specifčnosti a citlivosti v porovnání s dřívějšími metodami např. kompetitivní PCR.

Metoda GeneXpert BCR/ABL Monitor Assay vydává výsledky v mezinárodní stupnici (IS). K tomu využívá přepočtový koeficient (CF), který byl stanoven na základě studie IRIS (9). Hodnota CF u naší metody je 0,47 ta byla vypočtena z průměrných hodnot měření. K ověření přepočtového faktoru bylo změřeno > 70 pacientů metodou GeneXpert BCR/ABL monitor.

6. Závěr

Více než 95% pacientů s CML má výrazný chromozóm, který je výsledkem reciproké translokace mezi chromozómy 9 a 22. Gen bcr/abl je typickým znakem CML, slouží v upřesnění diagnózy a sledování úspěšnosti léčby. K diagnostice nemoci se využívají klasické cytogenetické metody, které kromě zjištění přítomnosti t(9;22) translokace odhalí i další chromozomální abnormality. Nárůst a vysoká hladina transkriptu bcr/abl jednoznačně signalizují špatnou odpověď na léčbu a špatnou prognózu, naproti tomu pokles a nízká hladina bcr/abl dobrou odpověď na léčbu a dobrou prognózu. V současné době je využívána pro kvantifikaci bcr/abl metoda Real-Time RT-PCR. Je považována za nejcitlivější metodu pro detekci nízkých hladin transkriptu bcr/abl, čehož je nejvíce využíváno při sledování minimální reziduální nemoci (ta je definována jako přetrvávání nízkého počtu nádorových buněk i přes absenci histologického důkazu a klinických příznaků). Test GeneXpert identifikuje bcr/abl ve vzorku plné krve. Díky tomu je možné pacienta pravidelně sledovat v krátkých časových intervalech, které vykazují vysokou prognostickou hodnotu. S předstihem i několika měsíců v porovnání s ostatními metodami je možné odhalit nastupující relaps onemocnění.

7. Použitá literatura

1. Adam, Z. Vorlíček, J. Hematologie II, Přehled maligních hematologických nemocí. Praha: Grada, 2001. s. 70-80 ISBN 978-80-247-2502
2. Baccarani, M., Saglio, G., Goldman, J., Hochhaus, A., Simonsson, B., Appelbaum, F., Apperley, J., Cervantes, F., Cortes, J., Deininger, M., Gratwohl, A., Guilhot, F., Horowitz, M., Hughes, T., Kantarjian, H., Larson, R., Niederwieser, D., Silver, R., Hehlmann, R., and European LeukemiaNet. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. Blood. [online] 2013; 108: 1809–1820 Dostupné z: doi: 10.1182/blood-2013-05-501569.
3. Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using ‘real-time’ quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) – a Europe against cancer program. Leukemia [online] 2003; 17: 2474–2486
4. Brdička, R., Vraná, M., Otáhalová, E., Štambergová, A., Čamajová, J. (2007): Analytická validace metod molekulární genetiky určených pro analýzu lidského genomu. [online] Klinická Biochemie a Metabolismus 15: 58–62.
5. Didenko V. V. (2001) DNA Probes Using Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET): Designs and Applications, Biotechniques, [online] 31, 5, 1106-1121
6. El-Khoury V., Pierson S., Kaoma T., Bernardin F., Berchem G., 2016 Assessing cellular and circulating miRNA recovery: the impact of the RNA isolation method and the quantity of input material, [online] Scientific Reports 1-14 Dostupné z doi: 10.1038/srep19529
7. Fojtu M., Gumulec J., Balvan J., Raudenska M., Sztalmachova M., Polanska H., Smerkova K., Adam V., Kizek R., Masarik M., 2014 Utilization of paramagnetic microparticles for automated isolation of free circulating mRNA as a new tool in prostate cancer diagnostics [online] www.electrophoresis-journal.com 306-315

8. Friedecký, B., Šprongl, L., Kratochvíla, J. ČSKB: Validace a verifikace metod [online]. 2004 [cit. 2009-12-11]. Dostupný z :WWW:<http://www.cskb.cz/cskb.php?pg=doporuceni-validace-a-verifikace-metod>.
9. Hughes P. T., Hochhaus A., Branford S., Müller M. C., Kaeda S. J., Foroni L., Druker J. B., Guilhot F., Larson A. R., O'Brien G. S., Rudoltz M., Mone M., Wehrle E., Modur V., Goldman M. J., Long-term prognostic significance of early molecular response to imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia: an analysis from the International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS), [online] Blood. 2010 Nov 11; 116(19): 3758–3765. Dostupné z : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3266053/#B7>
10. Hughes, T., Deininger, M., Hochhaus, A., Branford, S., Radich, J., Kaeda, J., Baccarani, M., Cortes, J., Cross, N.C., Druker, B.J., Gabert, J., Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting bcr/abl transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. [online]. Blood. 2006; 108: 28–37
11. <http://www.gene-quantification.de/chemistry.html>
12. Ikram Din U., Anwar Ali A., Muhammad S., Muhammad Asif Q., Saeed K., 2015 Cytogenetic and Molecular Analyses of Philadelphia Chromosome Variants in CML (Chronic Myeloid Leukemia) Patients from Sindh using Karyotyping and RT-PCR. [online]. Pak J Med Sci:936-940. Doi: <http://dx.doi.org/10.12669/pjms.314.7261>
13. Jarošová M, Moravcová J, Machová Poláková K. Cytogenetika a molekulární genetika. In: Faber E, Indrák K et al (eds). Chronická myeloidní leukemie. Praha: [online]. Galén 2010: 29–50.
14. Järås, M., Johnels, P., Hansen, N., Ågerstam, H., Tsapogas, P., Rissler, M., Lassen, C., Olofsson, T., Bjerrum, O. W., Richter J., Fioretos, T., 2010 Isolation and killing of candidate chronic myeloid leukemia stem cells by antibody targeting of

IL-1 receptor accessory protein, [online] National Academy of Sciences pp. 16280-16285 Dostupné z : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20805474>

15. Jianhua Zhang, Xianzhou Nie, Sébastien Boquel, Fadi Al-Daoud, Yvan Pelletier, 2015 Increased sensitivity of RT-PCR for Potato virus Y detection using RNA isolated by a procedure with differential centrifugation [online] ELSEVIER 49- 547 Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.07.008>

16. Jurcek T, Razga F, Jeziskova I et al. Failure of molecular diagnostics in chronic myeloid leukemia: an aberrant form of e13a2 bcr/abl transcript causing false-negative results by standard polymerase chain reaction. [online] Leuk Lymphoma 2010; 51: 558–561.

17. Kaltenboeck, B., Wang, Ch. (2005) Advances in Real-Time PCR: Application to clinical laboratory diagnostic, [online] Advances in clinical chemistry, 40, 219-259

18. Kantarjian H., Shchiffer C., Jones D., et al. Monitoring the response and course of chronic myeloid leukemia in the modern era of bcr/abl tyrosine kinase inhibitors: practical advice on the use and interpretation of monitoring methods. [online] Blood 2008; 111: 1774–1780

19. Lawrence, J., David G., Czech J, Min Yu, Loren J. Detection and Quantification of bcr/abl1 Fusion Transcripts by Droplet Digital PCR, 2014 the [online] Journal of Molecular Diagnostics; 174-179

20. Lu Y., Xinlin Ch., Yingfang T., Haixia L., Pengbo Z., Qindong S., Junfeng Z., Yong L. 2011 Selection of housekeeping genes for normalization of RT-PCR in hypoxic neural stem cells of rat in vitro. [online] Springer 569-576 doi: 10.1007/s11033-011-0772-8

21. Machová Poláková, K., Zemanová, K., Součková, M., 2012 Molekulární genetika v diagnostice a léčbě chronické myeloidní leukémie. Časopis lékařů českých 58: 38-45
22. Marcel E., Thérèse G., Coetzer, L., 2004 Real-time quantitative RT-PCR for human telomere elongation reverse transcriptase in chronic myeloid leukemia, [online] ELSEVIER 969-972. doi: 10.1016/j.leukres.2004.01.002
23. Moravcová, J., Brdička, R. 2005. Deset let molekulárního monitorování chronické myeloidní leukémie metodou kvantitativní RT-PCR. [online] Časopis lékařů českých. 144 (1): 32-37
24. Mayer J. 2002. Chronická myeloidní leukémie jako model moderní necytostatické léčby maligních chorob. Od Virchowa po STI 571. [online] Vnitřní lékařství. 48 (1): 45-49
25. Nicholas C., Cross P., Hochhaus A., Martin C. Müller 2014, Molecular monitoring of chronic myeloid leukemia: principles and interlaboratory standardization. [online] Springer 94:219-225 doi: 10.1007/s00277-015-2315-1
26. Nichols J.H. (2009): Verification of method performance for clinical laboratories. [online] Adv Clin Chem 47: 121-137
27. O'Brien S. G., Guilhot F. Goldman J. M., et al. (2008) International randomized study of interferon versus STI571 (IRIS) 7-year follow-up: Sustained survival, low rate of transformation and increased rate of major molecular response (MMR) in patients (pts) with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase (CML-CP) treated with imatinib (IM) Blood 112:abstr 186.
28. Pecka M. Laboratorní hematologie v přehledu, Fyziologie a patofyziologie krevní buňky. Český Těšín: FINIDR, 2006. s. 264-267 ISBN 80-86682-02-1
29. Penka M. Tesařová, E. Hematologie a transfuzní lékařství 1. Praha, Grada 2011, s. 324-326 ISBN 978-80-247-7192-2
30. Racek J., Klinická biochemie 1. vydání Galén 1999 Kontrola kvality laboratorního vyšetření s. 49 – 51

31. SAWYERS C. L., Chronic myeloid leukemia [online] New Engl. J. Med., 1999, roč. 340, s. 1330-1338
32. Suchánek M., Friedecký B., Kratochvíla J., Budina M., Bartoš V.: (2005) Doporučení pro určení odhadů nejistot výsledků měření/klinických testů v klinických laboratořích. [online] Dostupné z: [http://sli-csaki.wz.cz/data/Doporuceni odhadu nejistot.pdf](http://sli-csaki.wz.cz/data/Doporuceni%20odhadu%20nejistot.pdf)
33. Tyagi S., Kramer F. R., (1996) Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization, [online] Nature Biotechnology, 14, 3, 303-308 Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9630890>
34. Thellin O., Zorzi W. B., Lakaye B., De Borman B., Coumans G., Hennen T., Grisar A., Igout E., Heinen O., 1999 Housekeeping genes as internal standards: use and limits, [online] ELSEVIER 291-295
35. Thomas D., Schmittgen B., Zakrajsek A., 2000 Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR, [online] ELSEVIER 69-81 Dostupné z : S0165-022X(00)00129-9
36. Whitcombe, D., Theaker, J., Guy, S. P., Brown, T., Little, S. (1999) Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence, [online] Nature Biotechnology, 17, 8, 804-807
37. Žáčková D., Chronická myeloidní leukémie informace pro pacienty a jejich blízké, 2012 Česká leukemická skupina, [online] Brno s;18-59
38. http://www.diagnostictechnology.com.au/persistent/catalogue_files/products/300-9612bcr/ablpireva2.pdf