



## Институт за онкологију и радиологију Србије


Пастерова 14, Београд, Србија  
+381 11 2067 100  
[iors@ncrc.ac.rs](mailto:iors@ncrc.ac.rs) [www.ncrc.ac.rs](http://www.ncrc.ac.rs)

Институт за онкологију и радиологију Србије  
Бр. 26-161  
21 SEP 2015 20 год  
БЕОГРАД, Пастерова 14

### ПРОЦЕДУРА ФАРМАКОГЕНОМСКИХ ТЕСТОВА

Ознака процедуре	<b>П.ЕОЛ.07</b>
Верзија	01
Датум усвајања	21.09.2015.
Аутори процедуре	Др сц Емина Малишић Маријана Топаловић, СМЛТ
Носилац процедуре	Др сц мед Мирјана Бранковић Магић
Процедуру одобрио	Проф. др Радан Џодић



 <b>ИНСТИТУТ ЗА ОНКОЛОГИЈУ И РАДИОЛОГИЈУ СРБИЈЕ</b>	Назив процедуре:		Ознака:
	<b>Процедура фармакогеномских тестова</b>		<b>П.ЕОЛ.07</b>
	Датум: 21.09.2015.	Верзија: 01	Страна: 2 од 7

## 1. ДЕФИНИЦИЈЕ И СКРАЋЕНИЦЕ

ИОРС= Институт за онкологију и радиологију Србије

ОЕО: Одељење за експерименталну онкологију

ВМЦ: Војно медицински центар

В.О.К.: Високо образовни кадар - лекари, дипл биолози/молекуларни биолози, дипл биохемичари

## 2. ПРЕДМЕТ

Ова процедура одређује активности, носиоце активности и документацију за спровођење фармакогеномских тестова у Лабораторији за молекуларну генетику ОЕО

## 3. ПОДРУЧЈЕ ПРИМЕНЕ

Подручје примене је Лабораторија за молекуларну генетику ОЕО

## 4. ОДГОВОРНОСТИ

### Шеф лабораторије:


- израда и верификација плана рада В.О.К.
- компјутерско бележење и чување резултата под заштићени шифром, штампање или прослеђивање маил-ом лекарима

### В.О.К.:

- извођење лабораторијских анализа
- контролу резултата лабораторијских анализа
- уписивање резултата у књигу евиденције

**Главни лабораторијски техничар одсека-Лабораторије/ Лабораторијски техничар** је одговоран за:

- складиштење и чување хистолошких калупа пацијената
- пријем пацијената и узимање биолошког материјала
- вођење књиге евиденције пацијената
- извођење дела лабораторијских анализа (изолација лимфоцита, изолација DNK)
- издавање резултата пацијенту и враћање преосталог патохистолошког материјала

 <p><b>ИНСТИТУТ ЗА ОНКОЛОГИЈУ И РАДИОЛОГИЈУ СРБИЈЕ</b></p>	Назив процедуре:		Ознака:
	<b>Процедура фармакогеномских тестова</b>		<b>П.ЕОЛ.07</b>
	Датум: 21.09.2015.	Верзија: 01	Страна: 3 од 7

## 5. ОПИС ПРОЦЕДУРЕ

### 5.1 Израда распореда активности у Лабораторији

Шеф лабораторије израђује недељни распоред рада у лабораторији.

### 5.2 Пријем пацијената

Лабораторијски техничар ОЕО проверава комплетност документације пацијента (Здравствену књижицу и Упут из Дома здравља или са ВМЦ). Податке из књижице уноси у Хелиант као и датум трајања упута. За пацијенте из унутрашњости, у Хелиант се уноси број и датум под којим је првостепена лекарска комисија оверила упут и одобрила дату анализу.

Додатну документацију за ову анализу за лабораторију за Молекуларну генетику чини Захтев за анализу попуњен од лекара или конзилијарна одлука у којој се тражи дата анализа. Ако је пацијенту већ активирао упут на ИОРС-у, лабораторијски техничар додаје наше услуге у Хелианту.

Уколико пацијент плаћа лабораторијске анализе (на пример: долази без упута или живи ван територије Србије), лабораторијски и техничар уписује шифре тражених лабораториских анализа и након завршене анализе пацијента спроводи до Финансијске службе ИОРС-а.

### 5.3 Узимање биолошког материјала


Лабораторијски техничари лабораторије за Молекуларну генетику ОЕО прима биолошки материјал.

Уколико је узорак патохистолошки калуп/плочица одлаже се у коверту. Коверта се обележава са именом и презименом пацијента, одговарајућим лабораторијским бројем, врстом анализе, бројем донетих узорака и бројем њиховог патохистолошког налаза. Коверта се одлаже у одговарајућу тацну. Када се сакупи одређен број узорака (калупа), однесу се у патохистолошку лабораторију како би калупе исекли на листиће (4-5) и припремили их за анализу. У коверти се узорак чува до сечења, а након завршетка анализе се одлаже у посебне кутије обележене именом анализе до враћања пацијенту.

По повратку из патохистолошке лабораторије, коверат са узорком се одлаже у одговарајућу кутију обележену врстом анализе и од ког до ког броја су узорци у кутији. Након урађене анализе, узорак се враћа пацијенту заједно са резултатом.

Ако је материјал плочица, поступак припреме и чувања је исти као и за калуп, само узорковање подразумева коришћење комплетног садржаја са плочице (саструже се скалпелом). Обзиром да се материјал утроши за анализу, нема повратног материјала, изузев ако није реч о већем броју плочица.

Ако је узорак крв узима се у епрувету са EDTA као антикоагулансом избора за анализе у Молекуларној генетици. Епрувета се обележава бројем, именом и презименом пацијента.

 <p><b>ИНСТИТУТ ЗА ОНКОЛОГИЈУ И РАДИОЛОГИЈУ СРБИЈЕ</b></p>	Назив процедуре:		Ознака:
	<b>Процедура фармакогеномских тестова</b>		<b>П.ЕОЛ.07</b>
	Датум: 21.09.2015.	Верзија: 01	Страна: 4 од 7

#### 5.4 Вођење књига евиденције

Лабораторијски техничар ОЕО води књигу евиденције према врсти анализе и у сваку уписује:

- Име, презиме и годиште пацијента;
- Назив установе из које долази;
- Име и презиме лекара који га шаље (нагласити ако је реч о конзилијуму);
- Дијагноза;
- Број и врста узорака који је донео (бр. калупа/бр. плочица) и патохистолошки број узорака или му се узима крв уколико је то потребно за анализу.

#### Извођење лабораторијских анализа

У зависности од врсте анализе један део обавља лабораторијски техничар (изолацију лимфоцита, изолацију DNK) а други део (детекцију мутација, полиморфизама) В.О.К. Пошто не постоји могућност просторног одвајања, делови анализе се временски одвајају уз додатну заштиту од контаминације (стављање фолије, брисање радне површине етанолом).

Узорци DNK се до након изолације чувају на +4°C, а након детекције на -20°C, док се узорци RNK се чувају на -80°C до процесовања.

#### Припрема материјала за EGFR и KRAS анализу

- Узорци се носе у патохистолошку лабораторију ИОРС-а. Калупи се секу на 3-5 листића дебљине 5-10µm и овако исечени листићи се пребацују у пластичне епрувете (са затварачем) од 1,5 ml (отпорне на топлоту од 90°C);
- Поступак са плочицама: материјал се саструже скапелом (ако је у питању цитолошки узорак) или потопи у ксилол 10-ак min, па у апсолутни алкохол 10-ак min, па се са њега свуче љуспица, саструже материјал скапелом.


Из овако припремљених узорака, приступа се изолацији DNK QIAamp DNA FFPE Tissue Kit-om (или DNA Sample Preparation Kit-om) у неколико корака:

- Уклањање парафина из узорка коришћењем ксилола и алкохола
- Центрифугирањем 20 000 g у трајању од по 2 min
- Заостали трагови парафина се даље уклањају инкубацијом узорака на 90 оC са додатком протеиназе К и ATL (TLB) пуфера при чему долази и до парцијалног уклањања формалдехидних промена нуклеинских киселина
- DNK се везује за силика мембрану афинитетних колоница
- Испирање узорака AW1 i AW2 (WB1 i WB2) пуферима кроз овај тип мембране омогућава селективно везивање само DNK молекула на њену површину, док се нечистоће сакупљају на дну пластичне епрувете (са затварачем) и одбацују се
- Одвајање DNK од површине силика мембране постиже се елуцијом са АТЕ (ЕВ) пуфером

#### 5.5 Провера квалитета изоловане DNK

- DNK има максимум апсорпције на 260 nm, а протеини на 280 nm
- Однос A260/A280 за чисту DNK је око 1,8

Изолована DNK се даље користи за детекцију EGFR или KRAS мутација Real-Time PCR-om.

 <b>ИНСТИТУТ ЗА ОНКОЛОГИЈУ И РАДИОЛОГИЈУ СРБИЈЕ</b>	Назив процедуре:		Ознака:
	<b>Процедура фармакогеномских тестова</b>		<b>П.ЕОЛ.07</b>
	Датум: 21.09.2015.	Верзија: 01	Страна: 5 од 7

Напомена: када је узорак недовољан за анализу, што се види из концентације DNK, неопходно је о томе обавестити пацијента или установу која је материјал доставила, како би нам исти доставили нов калуп или плочице.

### 5.5 Детекција мутација у EGFR гену

Присуство мутација у EGFR гену се одређује употребом theascreen EGFR RGQ PCR Kit-a (Qiagen) и cobas® EGFR Mutation Test-a (Roche Molecular Diagnostics). EGFR ген кодира за рецептор за епидермални фактор раста (EGFR). Мутације у тирозин киназном домену EGFR гена се користе за селекцију пацијената са неситноћелијским карциномом плућа (NSCLC) за терапију тирозин киназним инхибиторима.

Therascreen EGFR RGQ PCR Kit омогућава детекцију 29 соматских мутација у EGFR гену и то: 19 делеција у егзону 19, T790M, L858R, L861Q, G719X (G717S, G719A, G719C), S768I и 3 инсерције у егзону 20. Кит се заснива на две технологије: ARMS (Amplification Refractory Mutation System) и Scorpions за детекцију мутација real-time PCR-ом на Rotor-Gene Q апарату. Анализа резултата се врши на основу софтверских података.

Cobas® EGFR Mutation Test детектује 41 мутацију у егзонима 18, 19, 20 и 21 EGFR гена и то: 29 делеција у егзону 19, S768I, две L858R мутације, T790M, G719X (G717S, G719A, G719C), 5 инсерција у егзону 20. Кит се заснива на технологији алел специфичног PCR-а. После припреме изолованих DNK узорака за real-time PCR, амплификација и детекција се врше аутоматски на Cobas z 480 апарату.

### 5.7. Детекција мутација у KRAS гену

Присуство мутација у KRAS гену се одређује употребом Cobas® KRAS Mutation Test. Одсуство мутација у KRAS гену се користи за селекцију пацијената са метастатским карциномом колоректума за терапију anti-EGFR моноклонским антителима.

Cobas® KRAS Mutation Test -ом се детектује 14 мутација у кодонима 12 и 13 (егзон 2) и 7 у кодону 61 (егзон 3). Кит се заснива на TaqMelt PCR технологији. После припреме изолованих DNK узорака за real-time PCR, амплификација и детекција се врше аутоматски на Cobas z 480 апарату.

### 5.8. DPD, MTHFR


Пацијент доноси упут из установе која га шаље или интерклинички упут са ИОРС-а.

Узима му се крв (венепункцијом) и то око 20 ml у епрувете са EDTA као антикоагулансом.

Крв се центрифугира 10 min на 800 g. Након тога се крвна плазму и лимфоцити пренесу на лимфопреп (градијент концентације), па центрифугирају 35 min на 800 g.

Накупљени лимфоцити (у виду прстена) се пребацују у епрувету са 5 ml физиолошког раствора, вортексирају, па центрифугирају 10 min на 800 g. Поступак испирања се понавља два пута. Затим се лимфоцити ресуспендују у 1 ml физиолошког раствора и пребацују у пластичне епрувете са поклопцем, центрифугирају 5 min на 2700 g у миницентрифуги. Одлије се физиолошки раствор и талог лимфоцита се чува на -20°C.

Након изолације лимфоцита, из истих се изолује DNK методом изољавања.

 <p><b>ИНСТИТУТ ЗА ОНКОЛОГИЈУ И РАДИОЛОГИЈУ СРБИЈЕ</b></p>	Назив процедуре:		Ознака:
	<b>Процедура фармакогеномских тестова</b>		<b>П.ЕОЛ.07</b>
	Датум: 21.09.2015.	Верзија: 01	Страна: 6 од 7

Поступак:

- Лизирање еритроцита ;
- Лизирање осталих ћелија;
- Денатурисање протеина;
- Таложeње и пречишћавање DNK;
- Ресуспендовање DNK;
- Мерење концентрације DNK.

### 5.9. Детекција C677T полиморфизма MTHFR гена

C677T полиморфизам у гену за ензим 5,10-metilen-tetrahidrofolat reduktazu (MTHFR) је значајан предиктор токсичности метотрексатом. Wild type (CC) генотип је повезан са нормалном активношћу ензима, док су CT и TT генотипови повезани са 40%, односно 70% смањењем активности ензима и до повећаног нивоа метотрексата у организму.

Полиморфне варијанте C677T MTHFR детектују се PCR-RFLP методом. Процедура се састоји од умножавања дела MTHFR гена PCR -ом, за којом следи дигестија PCR продуката HinfI restriktionom endonukleazom (Fermentas) и раздвајање дигерираних продуката на 8% полиакриламидном гелу.

### 5.10. Детекција IVS14+1G>A полиморфизма DPD гена

IVS14+1G>A полиморфизам гена за dihidropirimidin dehidrogenazu (DPD) је предиктор токсичности 5-fluorouracilom (5-FU). Код wild type (GG) генотипа- активност ензима је 100% очувана, док GA и AA генотипови испољавају смањену, односно потпуно укинуту активност DPD ензима, а самим тиме и токсичности терапије 5-FU услед немогућности разградње овог лека.

Полиморфне варијанте IVS14+1G>A DPD детектују се PCR-RFLP методом. Процедура се састоји од умножавања дела DPD гена PCR-ом, за којом следи дигестија PCR продуката NdeI restriktionom endonukleazom (Fermentas) и раздвајање дигерираних продуката на 8% полиакриламидном гелу.

### 5.11. BCR-ABL


Пацијент доноси упут из установе која га шаље или интерклинички упут са ИОРС-а.

Узима му се крв (венепункцијом) и то око 20 ml у епрувете са EDTA као антикоагулансом.

Крв одстоји 3-4 х на собној температури како би се леукоцити спонтано исталожили а потом центрифугира 10 мин на 800 g. Издвојени слој леукоцита (buffy coat) се скупља Пастеровом пипетом и пребацује у нову епрувету, дода око 5 ml физиолошког раствора и центрифугира 10 min на 800 g. Поступак се понавља неколико пута. На крају се леукоцити пребацују у пластичне епрувете од 1,5 ml, додаје се физиолошки раствор и центрифугира 5 min на 2700 g. Талог леукоцита се лизира са 1 ml TRI REAGENT -а и чува на -20°C до изолације RNK.

Изолација RNK TRISOL-ом

- Лизирање узорака TRISOL-ом
- Раздвајање фаза хлороформом
- RNK преципитација (исопропанол)

 <p><b>ИНСТИТУТ ЗА ОНКОЛОГИЈУ И РАДИОЛОГИЈУ СРБИЈЕ</b></p>	Назив процедуре:		Ознака:
	<b>Процедура фармакогеномских тестова</b>		<b>П.ЕОЛ.07</b>
	Датум: 21.09.2015.	Верзија: 01	Страна: 7 од 7

- Испирање RNK етанолом
- Растварање RNK ампулираном или DEPC водом

Детекција присуства и броја копија BCR-ABL транскрипта

Хромозомска транслокација t(9;22)(q34;q11) којом настаје BCR-ABL фузиони ген има значај у настанку хроничне мијелоидне леукемије (CML). Присуство BCR-ABL гена се користи у детекцији BCR-ABL, док се број копија BCR-ABL гена користи у процени минималне резидуалне болести код пацијената са BCR-ABL на терапији иматинибом.

Из тоталне изоловане RNK, синтетише се cDNA путем реверзна транскриптаза-PCR-а употребом High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-a (Applied Biosystems).

Детекција BCR-ABL фузионог гена врши се nested PCR -ом из синтетисане cDNK пацијената са суспектном BCR-ABL, уз амплификацију ABL-а као контролног гена и K562 BCR-ABL линије. Присуство амплификованих продуката након PCR-а детектује се електрофорезом на агарозном гелу, уз визуализацију етидијум-бромидом.

Праћење одговора на терапију иматинибом код BCR-ABL пацијената врши се квантитативним real-time PCR-ом на Applied Biosystems 7500 Real Time PCR апарату.

Број копија ABL и BCR-ABL се генерише софтверски на основу калибрационих крива које се конструишу употребом серије стандарда (Ipsogen). Анализа одговора на терапију се врши упоређивањем број копија BCR-ABL у односу на ABL. Када је овај однос једнак или мањи од 0,001 сматра се да је постигнут молекуларни одговор.

### **5.12. Уписивање резултата лабораторијских анализа лабораторије**

Резултате уписује у свеску евиденције В.О.К. који је тог дана према унапред направљеном распореду изводио анализу на одговарајућем апарату.

### **5.13 Расподела и издавање резултата готових лабораторијских анализа**

Шеф лабораторије компјутерски бележи и чува резултате који су заштићени шифром, штампа их и прослеђује маил-ом лекарима. Готови резултати се до издавања чувају у одређеним фасциклама под кључем у лабораторији где се врши пријем материјала и издавање резултата.

Лабораторијски техничар издаје резултате пацијенту и враћа преостали патохистолошки материјал, а за стационарне пацијенте носи резултат и патохистолошки материјал и предаје медицинским техничарима на одељењу

## **6. ДОКУМЕНТА И ЗАПИСИ КОЈИ СЕ ЧУВАЈУ**

- Формулари резултата у е-форми
- Копије резултата у е-форми
- Захтеви за анализе