

Raport z I Spotkania Zespołów Laboratoriów Molekularnych, 16 września 2011 r., Lublin

Wstęp

Tomasz Sacha

I Spotkanie Zespołów Laboratoriów Molekularnych prowadzących diagnostykę molekularną na rzecz Polskich Ośrodków Hematologicznych odbyło się w Lublinie 16 września 2011 r.

Gorące podziękowania należą się firmie Novartis Poland za wsparcie i umożliwienie wzięcia w nim udziału osobom odpowiedzialnym za hematologiczną diagnostykę molekularną w Polsce. Celem tego i kolejnych planowanych spotkań jest bezpośrednia wymiana doświadczeń służąca osiągnięciu jak najwyższego poziomu jakości oznaczeń wykonywanych w laboratoriach. Dlatego bardzo cenny był czynny udział tak wielu osób zaangażowanych w dziedzinę diagnostyki molekularnej. Wszystkim uczestnikom spotkania należą się podziękowania.

W pierwszej części spotkania wystąpił dr Tomasz Szczudło, Dyrektor Medyczny w centrali firmy Novartis, odpowiedzialny między innymi za wprowadzanie innowacji w ramach protokołów klinicznych oraz diagnostyki laboratoryjnej. Przedstawił on strategię rozwoju badań molekularnych w przewlekłej białaczce szpikowej realizowaną przez firmę Novartis, której celem jest upowszechnienie diagnostyki molekularnej tej choroby także w krajach nieposiadających odpowiednio rozwiniętej bazy laboratoryjnej. Ma temu służyć między innymi opracowanie i wdrożenie aparatury wykonującej ilościowe oznaczenia genu *BCR-ABL* w sposób w pełni zautomatyzowany, pozwalający na określenie liczby transkryptu odpowiadającej większej odpowiedzi molekularnej przy czułości 10^{-4} . Wynik uzyskiwany jest w ciągu około dwóch godzin od pobrania materiału.

Dr med. inż. Michał Gniot z Laboratorium Biologii Molekularnej w Poznaniu zaprezentował wyniki określenia ekspresji genu *BCR-ABL* za pomocą zaprojektowanej przez siebie dodatkowej pary starterów, umożliwiającej prowadzenie reakcji multipleks w jednej próbówce (oszczędność oraz minimalizacja ryzyka kontaminacji). Startery rozróżniają transkrypty typu b3a2 i b2a2. Startery te testowano, używając aparatu Light Cycler. Dr med. inż. Michał Gniot zaproponował opracowanie starterów, które będzie można użyć w aparatach wykorzystujących chemię TaqMan. Zespoły kilku laboratoriów wyraziły chęć ich przetestowania.

Niniejszy raport stanowi udokumentowanie przebiegu spotkania wraz z wyborem tabel i rycin prezentowanych podczas prelekcji.

Protokół ilościowej oceny genu *BCR-ABL* u chorych na przewlekłą białaczkę szpikową. Podsumowanie ankiet nadesłanych przez 11 laboratoriów biorących udział w procesie standaryzacji w Polsce
Magdalena Zawada

Obecnie w Polsce w proces standaryzacji zaangażowanych jest 12 laboratoriów: jedno laboratorium referencyjne, 6 laboratoriów ma wyznaczony czynnik korygujący (CF, *conversion factor*), 5 kolejnych laboratoriów w najbliższym czasie otrzyma próbki standaryzacyjne i jeśli ich analiza wypadnie poprawnie, również zostanie wyznaczonych dla nich CF (ryc. 1).

W tabeli 1 zestawiono wyniki ankiet rozesłanych do laboratoriów wykonujących ilościowy pomiar ekspresji genu *BCR-ABL* u chorych na przewlekłą białaczkę szpikową (CML, *chronic myelogenous leukemia*).

Wszystkie laboratoria pracują na podstawie protokołu opublikowanego przez Gaberta i wsp. [1]. Zapis, który pojawił się w tabeli *Second derivative maximum*, wynika z nieporozumienia — laboratorium również pracuje według protokołu Gabert i wsp. Metodyka własna stworzona na bazie protokołu EAC została zaprezentowana przez dr. Michała Gniota z ośrodka poznańskiego. Polega ona na multipleksowej analizie ekspresji genu *BCR-ABL* oraz *ABL* w jednej próbówce przy użyciu zaprojektowanych do tego celu primerów — sondy pozostały te same co w protokole EAC.

Każdy z aparatów używanych w polskich laboratoriach do ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR, *polymerase chain reaction*) posiada rekomendacje panelu ekspertów *European LeukemiaNet* (ELN).

Dyskutowano na temat obecnie najpowszechniej stosowanego genu kontrolnego — *ABL*. Od dawna wiadomo, że u pacjentów diagnostycznych może powodować niedoszacowanie pomiaru liczby kopii genu *BCR-ABL*.

Doktor Tomasz Stokłosa, opierając się na własnych doświadczeniach, sugerował, że bardziej wiarygodny



Rycina 1. Laboratoria zaangażowane w proces standaryzacji

pomiar liczby kopii genu *BCR-ABL* umożliwia zastosowanie genu referencyjnego *GUS*.

W poszczególnych laboratoriach izolację kwasu rybonukleinowego (RNA, *rybonucleide acid*) prowadzi się według dwóch metod: zmodyfikowanej metody Chomczyńskiego (tzw. metoda TRIzolowa) lub metody kolumnkowej, której zaletą jest szybkość przeprowadzenia izolacji (ok. 1 godz.), jednak ilość uzyskiwanego RNA w porównaniu z metodą TRIzolową jest dużo mniejsza. Izolacja metodą TRIzolową zajmuje dużo więcej czasu (ok. 2 dni). Otrzymuje się jednak w sposób powtarzalny większe ilości RNA. Z tego powodu metodę tę rekomenduje panel ekspertów ELN.

Wiele laboratoriów stosuje różne zestawy do przeprowadzania odwrotnej transkrypcji. Wiąże się to z doświadczeniami własnymi laboratoriów oraz wynika z zamawiania odczynników zgodnie z procedurami zamówień publicznych.

Zastosowanie różnych polimeraz może prowadzić do bardzo różnych wyników w późniejszej reakcji RQ-PCR (*real-time quantitative PCR*). Ct (numer cyklu, w którym po raz pierwszy dochodzi do logarytmicznego przyrostu produktu) mogą się różnić nawet o dwa cykle.

Według oceny ELN najprawdopodobniej najlepszą odwrotną transkryptazą jest Superscript III (Invitrogen).

Definicje i sposób wyrażania wyników/remisji molekularnej u chorych na przewlekłą białaczkę szpikową według wytycznych European LeukemiaNet i EUTOS for CML

Magdalena Zawada

Do rutynowych analiz laboratoria muszą używać opracowanych i wystandaryzowanych protokołów. Wyniki należy korygować przy użyciu czynnika korygującego (CF, *conversion factor*) i wyrażać w skali międzynarodowej [15] (tab. 2 i 3).

Krzywa standardowa jest wymagana do obliczenia liczby kopii *BCR-ABL* względem genu kontrolnego (CG, *control gene*). Do wyznaczenia krzywej należy stosować DNA plazmidowe. Nie jest zalecane stosowanie rozcieńczeń linii komórkowej lub materiału pacjenta w momencie diagnozy do tworzenia krzywej standardowej (tab. 4, 5).

Tabela 1. Wyniki ankiet rozesyłanych do laboratoriów wykonujących ilościowy pomiar ekspresji genu *BCR-ABL* u chorych na przewlekłą białaczkę szpikową (CML)

	Liczba laboratoriów (12)
Źródła	
Gabert i wsp. [1]	9
Metodyka własna, stworzona z grubsza na bazie protokołu ELN (multiplex)???	1
<i>Second derivative maximum</i> (druga pochodna, wg programu LightCycler 480, Roche)	1
Aparat do ilościowej PCR	
7500 Fast Real-Time PCR System	5
7300 Real-time PCR System	1
Corbett Research Rotor Gene	3
Light Cycler Roche	2
C1000 z głowicą optyczną CFX384 (Bio-Rad)	1
Geny kontrolne	
<i>ABL</i>	10
<i>GUS</i>	1
<i>ABL/GUS?</i>	1
Izolacja/ekstrakcja RNA	
Chomczynski-Sacchi (TRIzol™/TRIPURE™/TRI Reagent™)	9
Metoda kolumnkowa	3
Primery do RT	
Random heksamery	8
Oligo dT	1
Z zestawu Superscript VILO	1
Z zestawu RvertAid Atrand cDNA synthesis Kit	1
Random heksamery i oligo dT	1
Krzywa standardowa	
Plazmid DNA (np. IPSOGEN)	11
RNA lub DNA plazmidowe: RNA izolowane z linii K562	1

Tabela 2. Wytyczne *European LeukemiaNet* (ELN) i *EUTOS for CML* (EAC) dotyczące przeprowadzania analiz

Według ELN oraz EAC (2003)
<i>BCR-ABL/ABL</i> lub <i>BCR-ABL/GUS</i> lub <i>BCR-ABL/ABL</i>
Według ELN (2006) i EAC (2009)
<i>BCR-ABL/ABL</i> × <i>CF</i> × 100%
Na podstawie: Müller MC i wsp. [2], Branford S. i wsp. [3], Gabert i wsp. [1]

Ogromny problem stanowi dla laboratoriów sposób interpretacji wyników *BCR-ABL* przy bardzo niskim poziomie ekspresji tego genu (tab. 6). Mimo wytycznych zawierających sugestie, które z elementów należy brać pod uwagę, wciąż pojawiają się wątpliwości, czy wynik powyżej wartości $Y + 1$ należy uznać za pozytywny, lub jak postąpić w przypadku, gdy reakcja przebiegała w dubletach — w jednej próbce wykrywamy obecność *BCR-ABL*, w drugiej nie.

Istnieje kilka sposobów określania czułości reakcji RQ-PCR. Istotne jest, aby ta czułość była jak największa — od tego zależy wiarygodność wyniku reakcji.

Dyskutowano na temat granicy czułości, jaką stanowi wartość intercept + 1 — niektórzy autorzy wartości uzyskane powyżej tej wartości uznają za niepoliczalne.

Wytyczne panelu ekspertów ELN stanowią, że wynik *BCR-ABL* powinien być wyrażony jako konkretna wartość liczbowa przedstawiona w skali międzynarodowej (tab. 7):

$$\frac{[\text{średnia l. kopii } BCR-ABL]}{[\text{średnia l. kopii } CG]} \times CF \times 100$$

Tabela 3. Wytyczne *European LeukemiaNet* (ELN) dotyczące protokołów laboratoryjnych

Procedury
Krzywa standardowa
Wartości Ct
Czułość reakcji RQ-PCR
Sposób przedstawiania wyników

Tabela 4. Odczyt liczby kopii *BCR-ABL* oraz *ABL* z krzywej standardowej

<i>Slope</i> (współczynnik nachylenia krzywej): -3,3
Intercept (punkt przecięcia z osią Y): 40
Współczynnik korelacji $R^2 = 0,999$
Według <i>EUTOS for CML</i>
Co najmniej 3 rozcieńczenia, rekomendowane są 4
<i>ABL</i> : 10^6 lub $10^5 - 10^3$
<i>BCR-ABL</i> : 10^6 lub $10^5 - 10^1$
<i>Slope</i> : -3,20 – -3,60
$R^2 > 0,980$

Tabela 5. Próg odcięcia (*threshold*)

Automatyczne ustawienia niezalecane (z wyjątkiem aparatów Light Cycler – Roche)
Dla ABI 7900/7500: 0,05–0,1;
Dla Corbet Rotor-Gene: 0,02–0,2
Powyższe wartości muszą pozostać stałe dla wszystkich analiz!!!

Tabela 6. Niewykrywalny/niepoliczalny poziom *BCR-ABL*

Poziom „odcinka”, stanowiący granicę wykrywalności *BCR-ABL* to wartość intercept +1 (zwykle ok. 41–42)

W kontroli negatywnej (NTC) poziom *BCR-ABL* nie może przekroczyć linii odcinka (*threshold*) w żadnym miejscu. Wartość Ct w tej próbce powinna być co najmniej o 2 Ct większa od wartości intercept

Tabela 7. Sposoby określania niskiego poziomu *BCR-ABL*

Ct wyższe niż intercept +1: *BCR-ABL* wykrywalny, ale niepoliczalny
BCR-ABL wykryto na poziomie niższym niż najmniejsze zastosowane rozcieńczenie standardu, np. < 10 *BCR-ABL*, < 4 *BCR-ABL*, < 2 *BCR-ABL*

Dąży się jednak do określania *BCR-ABL* jako konkretnej wartości liczbowej w skali IS:

$$[\text{średnia } BCR-ABL]/[\text{średnia } ABL] \times CF \times 100$$

Tabela 8. Określenie MoIR, gdy *BCR-ABL* jest niewykrywalne

W laboratoriach rutynowo stosuje się przeprowadzanie analiz w powtórzeniach (duplikaty, tryplikaty) w celu zwiększenia precyzji pomiaru

Powtórzenia zwiększają zasadniczo czułość reakcji RQ-PCR w przypadku, gdy gen *BCR-ABL* jest niewykrywalny (pod warunkiem, że reakcję wykonuje się, wykorzystując ten sam cDNA)

Celem jest *ABL* ≥ 32 000 w jednym powtórzeniu z danej próbki cDNA

W przypadku niewykrycia *BCR-ABL* w badanych próbkach bardzo ważne jest określenie czułości testu RQ-PCR. Dąży się do osiągnięcia minimum 32 000 kopii CG w jednym powtórzeniu. Taki wynik pozwala na określenie odpowiedzi molekularnej na poziomie MoIR^{4,5} (tab. 8).

W żadnym wypadku liczba kopii CG nie może być mniejsza niż 10 000. W takiej sytuacji reakcję należy powtórzyć — czułość testu jest zbyt mała, aby wydać wiarygodny wynik (tab. 9).

Wynik negatywny wyrażamy jako NIE WYKRYTO, a nie jako NEGATYWNY, gdyż nie wiadomo, jaki jest w danym momencie poziom choroby resztkowej i czy możemy mówić o wyleczeniu. Przykłady przedstawiono w tabeli 10.

Celem laboratoriów biorących udział w spotkaniu jest dążenie do poprawy jakości wykonywanych analiz. Zalecenia przedstawione w tabeli 11 pozwalają zwiększyć czułość wykonywanych reakcji.

Proces standaryzacji oceny ilościowej ekspresji genu *BCR-ABL* nie kończy się w momencie uzyskania CF i certyfikatu. Jest to proces ciągły, kosztowny, wymagający ciągłego nadzoru i usprawniania protokołów. Jego

Tabela 9. Określenie MoIR, gdy *BCR-ABL* jest niewykrywalne, a wartość próbki z *ABL*

Jeśli *BCR-ABL* nie został wykryty w żadnym z powtórzeń, wynik uznaje się za negatywny w całkowitej liczbie kopii genu *ABL*:

$[\text{negatywny } BCR-ABL]/[\text{suma kopii } ABL \text{ z wszystkich powtórzeń}]$
Próbki z *ABL* < 10 000 (w sumie kopii *ABL*, jeżeli analizę prowadzono w powtórzeniach) nie nadają się do analizy i określenia poziomu MoIR!

Próbki z *ABL* 10 000–32 000: MoIR^{4,0}

Próbki z *ABL* ≥ 32 000: MoIR^{4,5}

Próbki z *ABL* ≥ 100 000: MoIR^{5,0}

Tabela 10. Przykłady przedstawienia wyniku negatywnego

PCR 1: *BCR-ABL* niewykrywalny w 5 μl cDNA *ABL* = 18 000 kopii w 5 μl cDNA

PCR 1: *BCR-ABL* niewykrywalny w 5 μl cDNA *ABL* = 16 500 kopii w 5 μl cDNA

Wynik: nie wykryto w 34 000 kopii *ABL* = MoIR^{4,5}

PCR 1: *BCR-ABL* niewykrywalny w 5 μl cDNA *ABL* = 45 000 kopii w 5 μl cDNA

Wynik: nie wykryto w 45 000 kopii *ABL* = MoIR^{4,5}

PCR 1: *BCR-ABL* niewykrywalny w 5 μl cDNA *ABL* = 3000 kopii w 5 μl cDNA

PCR 2: *BCR-ABL* niewykrywalny w 5 μl cDNA *ABL* = 3500 kopii w 5 μl cDNA

PCR 3: *BCR-ABL* niewykrywalny w 5 μl cDNA *ABL* = 3000 kopii w 5 μl cDNA

Wynik: nie można określić MoIR (całkowita liczba kopii *ABL* < 10 000)

celem jest uzyskiwanie rzetelnych, w pełni wiarygodnych i porównywalnych w różnych laboratoriach wyników.

Omówienie metodyki procedur stosowanych w ilościowej ocenie ekspresji genu *BCR-ABL*

Sylwia Czekalska

W tej części raportu przedstawiono najnowsze zmiany wprowadzone do metodyki procedur stosowanych w ocenie poziomu ekspresji genu *BCR-ABL* oraz zalecenia dotyczące podstawowych zasad pracy w laboratorium biologii molekularnej.

Pierwszym krokiem na drodze do uzyskania poprawnego wyniku jest prawidłowe pozyskanie komórek (tab. 12). Materiałem biologicznym polecanym do oznaczania poziomu ekspresji genu *BCR-ABL* jest krew obwodowa ze względu na: łatwość pozyskania, mały stopień inwazyjności

Tabela 11. Zwiększenie czułości wykrywania liczby kopii genu kontrolnego

Dopracować protokół izolacji RNA — kluczowy krok!!!
Zwiększyć ilość RNA do przełożenia na cDNA (nie 1 µg, ale 2–5 µg)
Zwiększyć objętość odwrotnej transkryptazy lub zmienić rodzaj enzymu (według <i>EUTOS for CML</i> najlepszy Superscript III?)
Nie rozcieńczać cDNA

Tabela 12. Pozyskiwanie komórek do badań

Krew obwodowa z EDTA jako antykoagulant
Objętość 10–20 ml krwi
Izolacja wykonywana z 20 mln komórek — wymaganą objętość krwi zawierającą podaną liczbę komórek obliczono na podstawie wyniku morfologii pacjenta — parametr WBC lub pomiar w komorze Burkera
Izolacja komórek — wyłącznie metoda lizy erytrocytów
Maksymalna objętość krwi do izolacji — 12 ml
Izolacja w gradiencie gęstości (np. Ficoll™, Histopaque 1077™, Lymphoprep™) — znaczny spadek czułości oznaczeń!

dla pacjenta, przy równoczesnym zapewnieniu dobrego poziomu czułości i wiarygodności badania.

Metodę lizy erytrocytów przeprowadza się za pomocą chlorku amonu (NH₄Cl) — roztwór dostępny komercyjnie lub sporządzany w laboratorium. Przy samodzielnym sporządzaniu roztworu należy zwrócić uwagę na to, że nie wolno poddawać go procesowi sterylizacji przy użyciu autoklawu, a wyłącznie sączeniu przy użyciu sączków miliporowych 0,2 µm. Tylko metoda lizy gwarantuje izolację RNA z komórek jednojądrzastych i wielojądrzastych (tab. 13).

Kilka spośród ośrodków biorących udział w polskiej rundzie standaryzacyjnej *EUTOS for CML* stosuje metodę kolumnkową. Dotychczasowe rundy standaryzacyjne przeprowadzono na podstawie metody Chomczyńskiego/Sacchi. Tylko ta metoda umożliwia przeprowadzenie izolacji RNA z 20 mln komórek WBC (w przypadku kolumnki 10 mln). W dyskusji wyrażono wątpliwości co do zasadności izolacji RNA z tak dużej puli komórek i uzyskiwania, np. 15 µg RNA, podczas gdy do reakcji odwrotnej transkrypcji pobiera się tylko 2 µg. Należy podkreślić, że nie jest celem samym w sobie

Tabela 13. Metody izolacji RNA

Metoda Chomczyńskiego/Sacchi a metoda kolumnkowa
<i>EUTOS for CML</i> — wskazanie na metodę Chomczyńskiego/Sacchi (TriPur™, TRIzol™, TRIAGENT™)

uzyskanie jak największej ilości RNA, ale zwiększenie czułości reakcji poprzez zwiększenie szansy na znalezienie 1 komórki zawierającej gen *BCR-ABL* wśród komórek negatywnych. W przypadku monitorowania choroby resztkowej czułości reakcji ma znaczenie kluczowe. W każdej izolacji RNA wśród puli próbek, z założenia cechujących się obecnością genu *BCR-ABL*, musi znaleźć się próbka bez tego genu, np. komórki zdrowego dawcy, pacjenta z inną chorobą, linia komórkowa, czysty odczynnik. Próbę negatywną wykonuje się w celu sprawdzenia czystości izolacji RNA i przeprowadzonej reakcji odwrotnej transkrypcji (RT, *reverse transcription*).

Uzyskane cDNA poddaje się amplifikacji jako tzw. *non-amplified control* (NAC).

Ważną modyfikacją w procedurze izolacji RNA jest zastosowanie do precypitacji absolutnego alkoholu etylowego zamiast stosowanego dotychczas 2-propylowego (izopropanolu). Ta zmiana ma swoje przełożenie na czułość reakcji RQ-PCR i jest wyrażona większą niż w przypadku zastosowania EtOH liczbą kopii genu kontrolnego *ABL*.

Etap poprzedzający izolację RNA oraz główne zasady izolacji przedstawiono w tabelach 14 i 15. Modyfikacje protokołu komercyjnego zawarto w tabeli 16, a stężenie i czystość izolacji RNA w tabeli 17.

Bardzo istotne jest podkreślenie odrębności reakcji odwrotnej transkrypcji. Niedopuszczalne jest stosowanie protokołów, w których RT jest tylko elementem poprzedzającym reakcję ilościową, którego nie można poddać procesowi standaryzacji. Zaleca się stosowanie odczynnika SUPERCSRITP™, lecz nie jest to wskazanie jednoznaczne (tab. 18). Nie należy stosować oligo dT ze względu na obniżenie wydajności reakcji. Stosowanie inhibitora RN-az jest zalecane, lecz opcjonalne.

Zastosowanie do reakcji odwrotnej transkrypcji 2 µg RNA ma kluczowe znaczenie dla zwiększenia

Tabela 14. Etap poprzedzający izolację RNA

Zawieszenie 20 mln komórek w 1 ml odczynnika (np. TriPur™, TRIzol™, TRIAGENT™), który umożliwia wykonanie izolacji RNA wg zmodyfikowanego protokołu Chomczyńskiego
Solubilizacja — igła strzykawkowa
Przechowywanie: –20°C do około tygodnia, –80°C — jeżeli dłużej
Po rozmrożeniu izolacja RNA! Nie wolno ponownie zamrażać!

Tabela 15. Główne zasady izolacji RNA

Wyciąg — odczynniki organiczne, mikroaerozole
W czasie izolacji próbki muszą znajdować się w lodzie, wirowanie w temperaturze 2–8°C — ryzyko degradacji
Praca w rękawiczkach — RNA-zy
Izolacja kontroli negatywnej

Tabela 16. Modyfikacje protokołu komercyjnego w przypadku izolacji RNA

Po rozmrożeniu inkubacja z wytrząsaniem (37°C, 10 min., 1400 rpm) — schłodzenie na lodzie
Dwukrotna ekstrakcja chloroformem (pierwsza poprzedzona 15-minutowym wytrząsaniem)
Strącanie — schłodzony absolutny EtOH, -20°C, przez noc
Płukanie w 75-procentowym EtOH o temp. -20°C
Suszenie 37°C, 2–5 min.
Zawieszenie w 24 µl lub 21 µl wody wolnej od RNA-z
Inkubacja 65°C, 3 min.

Tabela 17. Metody izolacji RNA — stężenie i czystość

Pomiar spektrofotometryczny
$R = A_{260nm}/A_{280nm} \sim 1,7-2,0$
Jeżeli na podstawie A_{260nm} stężenie RNA > 2 µg/µl — sugerowane rozcieńczenie

Tabela 18. Odczynniki stosowane w odwrotnej transkrypcji (RT)

Zalecane odczynniki
SUPERSCRIPT II™ lub SUPERSCRIPT III™
Mieszanina pdN6 — random hexamery
Inhibitor RN-az
<i>EUTOS for CML</i> : RT jest oddzielną reakcją

uzyskiwanej liczby kopii *ABL*, a tym samym czułości reakcji RQ-PCR.

Etapy odwrotnej transkrypcji przedstawiono w tabeli 19. W tabeli 20 wymieniono odczynniki stosowane w reakcji RQ-PCR, a zasady reakcji wymieniono w tabeli 21.

W czasie spotkania przeprowadzono dyskusję na temat zasadności stosowania *ABL* jako genu kontrolnego i zastąpienia go genem *GUS*. Powodem takiej zmiany ma być utrata u niektórych pacjentów dzięki formy allelu, co utrudnia lub nawet uniemożliwia wykonanie wiarygodnego oznaczenia poziomu ekspresji genu *BCR-ABL*. Ustalono, że temat ten należy przedstawić na forum ELN/EUTOS.

Oddzielenie przestrzenne poszczególnych etapów ma na celu ochronę przed możliwymi kontaminacjami. Jeżeli warunki lokalowe w laboratorium nie pozwalają na zapewnienie odrębnych pomieszczeń, należy wyodrębnić stoły, zestawy pipet, fartuchy przeznaczone wyłącznie do danego etapu badania, ma to szczególnie istotne znaczenie na etapie dodawania kontroli pozytywnej.

Tabela 19. Etapy odwrotnej transkrypcji (RT)

2 µg RNA w 5 µl wody wolnej od RNA-az
Wstępna denaturacja ewentualnych struktur II° w 70°C
Inkubacja w lodzie
15 µl mieszaniny reakcyjnej
Rozcieńczenie 2:3 (20 µl cDNA / 30 µl wody wolnej od RN-az)
Przechowywanie: -20°C

Tabela 20. Odczynniki stosowane w reakcji RQ-PCR

Master Mix z UNG
Startery 30 µM
Sonda FAM — TAMRA 20 µM
Kontrola pozytywna — wystandaryzowany plazmid (np. Ipsogen™)

Tabela 21. Zasady przeprowadzania reakcji RQ-PCR

Reakcja wykonywana w dubletach lub trypletach — zarówno fuzyjny gen badany (<i>BCR-ABL</i>), jak i gen kontrolny (<i>ABL</i>)
NTC
Objętość 5 µl cDNA do 20 µl mieszaniny reakcyjnej
Reakcja wykonywana w systemie FAST nie jest w pełni wystandaryzowana
Szereg rozcieńczeń linii komórkowej lub pacjenta jako kontrola pozytywna — NIE!

Podsumowując najważniejsze wytyczne:

- pierwszy etap — izolację komórek z krwi należy wykonać do 24 godzin od pobrania;
- zachować szczególną ostrożność przy izolacji RNA;
- oddzielić przestrzenie (stoły, zestawy pipet) wszystkie etapy analizy (izolacja komórek, izolacja RNA, składanie mieszaniny reakcyjnej, reakcja RT, dodawanie cDNA i kontrola pozytywna).

Zasady pobierania i przesyłania materiału diagnostycznego do badań w kierunku przewlekłej białaczki szpikowej

Izabela Florek

Na jakość wyniku badania w kierunku przewlekłej białaczki szpikowej może wpływać sposób pobierania i przesyłania materiału diagnostycznego. Według wytycznych Ministerstwa Zdrowia z dnia 21 stycznia 2009 roku dotyczących rozporządzenia w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych (Dz.U. z dnia 11 lutego 2009 r;

Tabela 22. Elementy, które powinien zawierać formularz zlecenia badania laboratoryjnego

Dane pacjenta:
— imię i nazwisko;
— data urodzenia;
— miejsce zamieszkania/oddział szpitalny;
— płeć;
— PESEL;
— nr identyfikacyjny pacjenta (podawany przy braku innych danych)
Dane lekarza zlecającego badanie
Dane jednostki zlecającej badanie
Miejsce przesłania wyniku badania lub dane osoby upoważnionej do odbioru
Rodzaj materiału i jego pochodzenie
Zleczone badania
Tryb wykonywania badania
Data i godzina pobrania materiału do badania
Dane osoby pobierającej materiał do badania
Data i godzina przyjęcia materiału do laboratorium
Istotne dane kliniczne pacjenta

załącznik nr 3) formularz skierowania na badanie molekularne powinien zawierać elementy przedstawione w tabeli 22.

Biorąc pod uwagę specyfikę badań, warto wymagać dodatkowych danych, takich jak:

- zgoda pacjenta na przeprowadzenie badań genetycznych — samo pobranie krwi nie świadczy o tym, że pacjent ma świadomość znaczenia analizy;
- zgoda pacjenta na przechowywanie materiału — jeśli nie ma takiej zgody po zakończeniu analizy molekularnej, należy zniszczyć, zgodnie z zasadami utylizacji odpadów medycznych cały materiał genetyczny uzyskany od pacjenta. Pamiętając o tym, że badania medyczne ciągle się rozwijają, należy wytłumaczyć pacjentowi potencjalne korzyści z przechowywania jego materiału z różnych punktów czasowych trwania choroby, pozwalające naświetlić przebieg choroby i leczenia;
- leukocyty (WBC, *white blood cells*) — ze względu na to, że na podstawie wartości całkowitej liczby leukocytów wylicza się objętość krwi, jakiej należy użyć do izolacji komórek jądrazstych, ten punkt jest szczególnie istotny, ponieważ do izolacji jednej próbki RNA potrzebne jest 20 mln komórek jądrazstych. Elementy, które powinien zawierać formularz zlecenia badania laboratoryjnego, przedstawiono w tabeli 22. Podczas pobierania i przesyłania materiału diagnostycznego mogą wystąpić błędy. Można je podzielić na:
 - przedlaboratoryjne;

— laboratoryjne.

Rodzaje błędów szerzej omówiono w dalszej części raportu.

Przygotowanie materiału do badań obejmuje następujące elementy:

- pobieranie próbek do badań;
- transport i konserwacja;
- opracowanie materiału.

Błąd przedlaboratoryjny

W laboratorium należy mieć świadomość, że uzyskany do analizy materiał może być obciążony błędem. Według Amerykańskiego Towarzystwa Medycznego około 15% próbek jest obciążonych błędem przedlaboratoryjnym. Mogą to być:

- praca personelu medycznego bez rękawiczek;
- używanie podczas pobierania krwi obwodowej od kilku pacjentów jednej pary rękawic;
- próbki krwi nieopisane bezpośrednio przy pacjencie;
- niewymieszanie krwi z antykoagulantem lub pobranie krwi do złego antykoagulantu;
- przelewanie krwi pobranej na heparynę do próbki zawierającej EDTA;
- niezachowanie warunków gwarantujących jałowość materiału (systemy próżniowe skutecznie eliminują ten błąd);
- niewłaściwe pobranie materiału, czego przykładem może być zarówno zbyt długi ucisk stazy mogący prowadzić do hemolizy, jak również stosowanie leków przeciwkrzepliwych.

Pobranie krwi tuż po wlewie heparyny może spowodować inhibicję reakcji PCR. U takich pacjentów krew może być pobrana dopiero po upływie 4–5 godziny od infuzji — a najlepiej tuż przed kolejną. Należy również przypomnieć, że w sytuacji, gdy krew obwodowa jest pobierana z wenflonu, pierwsze 5 ml powinno się odrzucić.

Błąd laboratoryjny

Do błędów laboratoryjnych zalicza się:

- pracę bez rękawic bądź w rękawicach pudrowych;
- nieprawidłowe opisanie materiału, pomylenie próbek;
- nieodpowiednie przechowywanie (RNA powinno być przechowywane na lodzie).

Materiał do analizy molekularnej przewlekłej białaczki szpikowej stanowią pobrane w warunkach jałowych:

- krew obwodowa 10–20 ml;
- szpik kostny 2–4 ml.

Dobór odpowiedniego antykoagulantu może istotnie wpłynąć na jakość otrzymywanych wyników:

- cytrynian trójsodowy jest najlepszym antykoagulantem dla próbek szpiku kostnego (jednak w przypadku omawianych analiz w ramach I Spotkania krew obwodowa jest wystarczającym materiałem do badań nieobciążającym tak jak aspiracja szpiku kostnego);

- heparyna jest antykoagulantem z wyboru w badaniach cytogenetycznych, jednak ze względu na jej możliwość inhibicji reakcji PCR nie zaleca się jej do badań molekularnych;
- do analiz molekularnych używa się EDTA w stosunku 1:9;
- w sytuacji, gdy czas przesłania materiału od momentu pobrania do dostarczenia do laboratorium docelowego jest dłuższy niż 24 godziny, materiał należy zabezpieczyć przy użyciu zestawów pozwalających na stabilizację RNA, na przykład kitu PaxGene.

Czas, w jakim materiał jest dostarczony do laboratorium, istotnie wpływa na jakość otrzymanego RNA. Jeśli materiał jest zabezpieczony w TRIzol w ciągu 24 godzin od momentu pobrania, czas transportu nie ma wpływu na wynik analizy. Po tym czasie drastycznie spada jakość RNA. Drugim czynnikiem w trakcie transportu jest temperatura otoczenia. Ideałem byłoby przesyłanie materiału w specjalnych opakowaniach utrzymujących stałą temperaturę w przedziale około 8°C do temperatury pokojowej.

Jeśli warunki zewnętrzne są zbliżone do temperatury pokojowej, jakość materiału nie ulega pogorszeniu. Jeśli jednak temperatura otoczenia jest wysoka, najlepszym rozwiązaniem są opakowania styropianowe z wkładem chłodzącym o temperaturze około 8°C.

W odwrotnej sytuacji — w okresie zimowym — próbki krwi należy chronić przed zamrożeniem. Materiał powinien dotrzeć do laboratorium i ulec „obróbce” do 24 godzin od chwili pobrania — wówczas niepotrzebna jest stabilizacja RNA.

Jeśli wiadomo, że materiał nie ulegnie „obróbce” w ciągu 24 godzin od pobrania, wskazana jest stabilizacja RNA, na przykład za pomocą zestawu PaxGene™ Blood RNA System (PreAnalytiX). Probówki PaxGene zawierają odczynniki stabilizujące wewnątrzkomórkowe RNA na kilka dni w temperaturze pokojowej lub kilka tygodni w temperaturze 4°C lub zamrożonych. Są idealne w sytuacji, gdy nie ma możliwości natychmiastowego dostarczenia materiału do laboratorium. Należy jednak dążyć do dostarczenia go w ciągu doby.

Standaryzacja badań molekularnych w przewlekłej białaczce szpikowej

Tomasz Sacha

Tę część raportu poświęcono genezie standaryzacji badań molekularnych w przewlekłej białaczce szpikowej w Polsce. Ponadto omówiono obserwacje dotyczące braku możliwości porównania wyników uzyskiwanych przez trzy referencyjne laboratoria wykonujące oznaczenia dla pacjentów leczonych w ramach badania *International Randomized Study of Interferon and ST1571 (IRIS)* porównującego skuteczność imatynibu

z interferonem α stosowanym w skojarzeniu z arabinozydem cytozyny. Realizację procesu rozpoczęto w trzech laboratoriach w Polsce, stopniowo przyłączały się do niego kolejne.

Laboratoria realizujące projekt działają przy:

- Klinice Hematologii AM w Gdańsku: Kierownik Kliniki — prof. dr hab. med. Andrzej Hellmann, główny wykonawca — dr med. Witold Prejzner z zespołem laboratoryjnym;
- Instytucie Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie: Dyrektor Instytutu — prof. dr hab. med. Krzysztof Warzocha, kierownik — dr Katarzyna Borg, wykonawca — dr Iwona Solarska z zespołem laboratoryjnym;
- Katedrze i Klinice Hematologii CMUJ w Krakowie: Kierownik Kliniki — prof. dr hab. med. Aleksander B. Skotnicki, główny wykonawca — dr med. Tomasz Sacha z zespołem laboratoryjnym.

Najważniejsze zalecenia dotyczące metodyki wykonywania PCR zaczerpnięto z materiałów ze spotkania ekspertów w Bethesda skupionych w *European LeukemiaNet (ELN)* (tab. 23 i 24).

W celu zmniejszenia różnic w uzyskiwanych wynikach wprowadzono tak zwaną referencyjną wartość średnią, do której odnoszono kolejne uzyskiwane w toku leczenia wyniki i wyrażano jako „redukcja logarytmiczna”. Trzykrotna redukcja (w stosunku do początkowego

Tabela 23. Standaryzacja wykrywania genu *BCR/ABL* (IRIS)

W każdym z laboratoriów obliczono referencyjną wartość średnią, używając tych samych 30 próbek pobranych od pacjentów w chwili diagnozy

Wyniki wyrażano w odniesieniu do tej wartości jako „redukcja logarytmiczna”

Na podstawie Hughes i wsp. [4]

Tabela 24. Zalecenia rozestane do współpracujących laboratoriów w 2006 r.

Odpowiednia jakość RNA używanego do dalszych analiz

Metodyka PCR

Wydajność etapu odwrotnej transkrypcji i amplifikacji

Wybór odpowiednich genów referencyjnych

Minimalna czułość badania

Sposób wyrażania wyników negatywnych

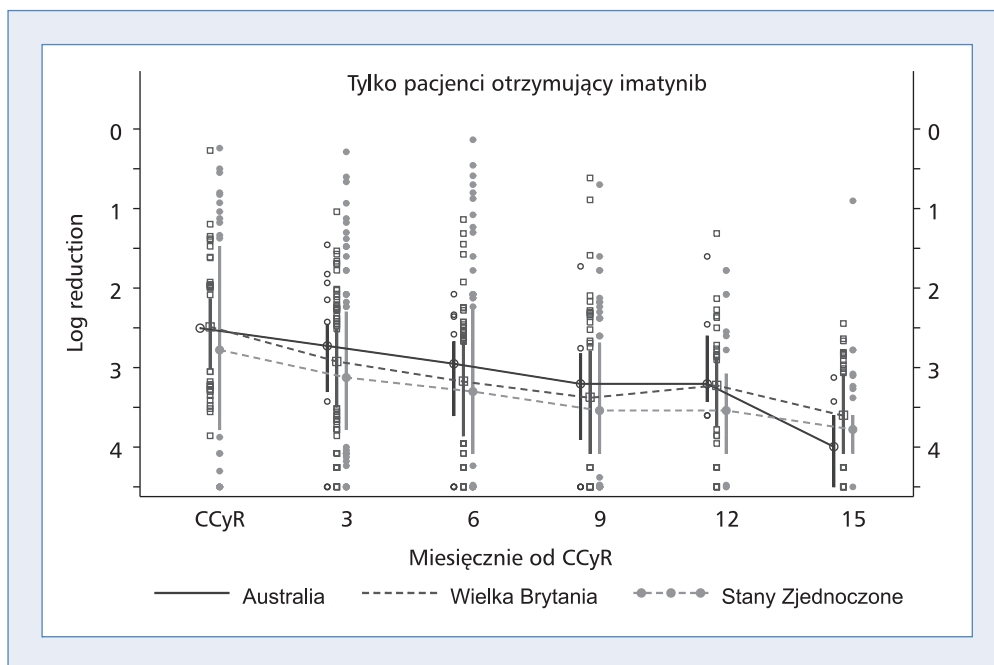
Określenie jakości wykonywanych oznaczeń

Wymagania dla międzynarodowego materiału referencyjnego używanego jako pozytywnej kontroli

Wyrażanie wyników przy użyciu skali międzynarodowej

Rozestane do współpracujących laboratoriów w 2006 r.

Na podstawie Hughes i wsp. [4]



Rycina 2. Standaryzowana redukcja logarytmiczna — różne laboratoria

poziomu 100%) odpowiada większej odpowiedzi molekularnej (0,1%) (ryc. 2).

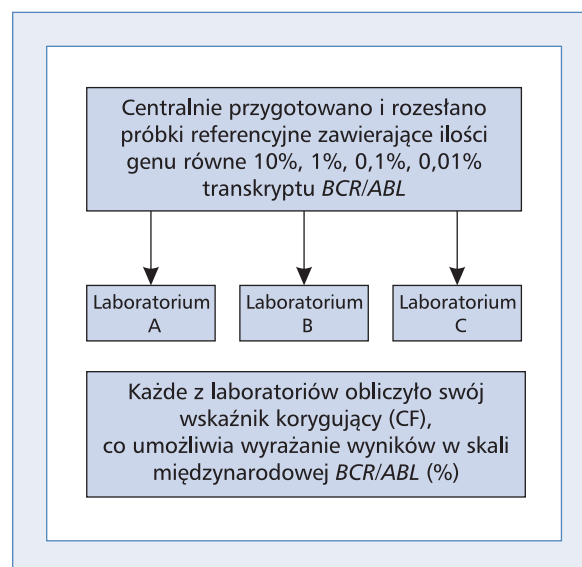
Po wprowadzeniu referencyjnej wartości średniej poprawiła się nieco spójność uzyskiwanych wyników.

Po przeanalizowaniu próbek referencyjnych przygotowanych przez Centralne Laboratorium Referencyjne każda z biorących udział pracowni miała możliwość wyznaczenia wskaźnika korygującego (CF, *correction factor*), co umożliwiało wyrażanie wyników badania w skali międzynarodowej oraz poprawiło zgodność wyników z różnych laboratoriów (ryc. 3 i 4).

W tabeli 25 przedstawiono sposób wyrażania wyniku po uwzględnieniu indywidualnego czynnika korygującego.

Laboratoria w Polsce wykorzystują różne platformy diagnostyczne. Wszystkie aparaty są zalecane przez ekspertów ELN.

Wraz z poprawą wyników leczenia przewlekłej białaczki szpikowej zmieniają się zakładane cele pierwotne w badaniach klinicznych nad skutecznością leczenia. W ślad za tym muszą nastąpić modyfikacje metody RQ-PCR (*real time quantitative polymerase chain reaction*) zwiększające jej czułość oraz zmiany definicji całkowitej odpowiedzi molekularnej (CMR, *complete molecular response*) (tab. 26). Proponuje się, aby określenie CMR zastąpić pojęciem odpowiedź molekularna z redukcją liczby transkryptu o 4 log (MoIR⁴) i odpowiednio o 4,5 log (MoIR^{4,5}). Planuje się kolejne rundy standaryzacyjne poświęcone opracowaniu definicji molekularnej 4 i 4,5 log oraz możliwości wykonywania miarodajnych

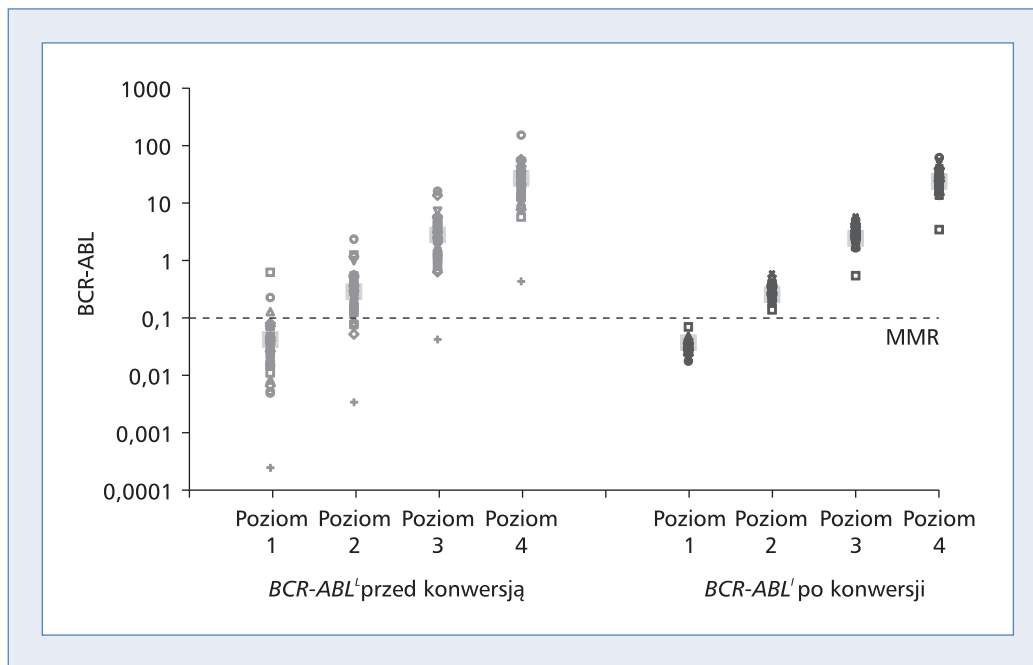


Rycina 3. Wyznaczenie wskaźnika korygującego (CF) przez każde z laboratoriów

oznaczeń przez różne laboratoria minimalnej choroby resztkowej na tym poziomie.

Piśmiennictwo

1. Gabert J., Beillard E., van der Velden V.H. i wsp. Standardization and quality control studies of „real-time” quantitative reverse



Rycina 4. Poziomy BCR-ABL przed i po konwersji

Tabela 25. Sposób wyrażania wyniku po uwzględnieniu indywidualnego czynnika korygującego

Obliczyć średnią wartość referencyjną dla każdego laboratorium, używając tych samych 30 próbek pobranych od pacjentów przed leczeniem

Wyrazić wyniki w odniesieniu do tej wartości referencyjnej jako „redukcja logarytmiczna”

3-krotna redukcja logarytmiczna = 0,44% BCR/ABL/ABL w Krakowie

MMR = 3 krotna redukcja logarytmiczna = 0,1%

0,1% / 0,44% = 0,2263 (czynnik korygujący dla laboratorium w Krakowie)

transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia — a Europe Against Cancer program. *Leukemia* 2003; 17: 2318–2357.

- Müller M.C., Cross N.C., Erben P. i wsp. Harmonization of molecular monitoring of CML therapy in Europe. *Leukemia* 2009; 23: 1957–1963.
- Branford S., Cross N.C., Hochhaus A. i wsp. Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* 2006; 20: 1925–1930.
- Hughes T.P., Kaeda J., Branford S. i wsp. Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2003; 349: 1423–1432.

Tabela 26. Definicja i ocena całkowitej odpowiedzi molekularnej (CMR)*

Definicja CMR

CMR^{4.0}-MoIR^{4.0} = wykrywana choroba ≤ 0,01% BCR-ABLIS lub niewykrywana choroba w cDNA z liczbą transkryptu ABL ≥ 10 000

CMR^{4.5}-MoIR^{4.5} = wykrywalna choroba ≤ 0,0032% BCR-ABLIS lub niewykrywalna choroba w cDNA z liczbą transkryptu ABL ≥ 32 000

Ostateczna definicja CMR będzie uwzględniała możliwość wykrycia najmniejszej liczby transkryptu BCR/ABL w każdym laboratorium

Aktualnie: określenie i standaryzacja liczby kopii genu ABL

*Stworzona dla celów badania (ma charakter prowizoryczny)

Tomasz Sacha

Adres do korespondencji:

Dr med. Tomasz Sacha
Pracownia Diagnostyki Molekularnej
Kliniki Hematologii
ul. Kopernika 19, 31-501 Kraków
Tel./faks: +48 (12) 424 76 41
e-mail: diagmol@cm-uj.krakow.pl