

Zpracovatel:	Mgr. L. Stefflová		
Přezkoumal a schválil:	Mgr. L. Stefflová		
Garant dokumentu:	RNDr. R. Žížková		
Platnost od:	01.01.2023		Hana Feixová
Výtisk č:	2	Počet stran:	10
Verze:	A1	Přijato do evidence:	31.12.2022

SEZNAM ZMĚN A REVIZÍ ŘÍZENÉHO DOKUMENTU

Platnost od:	Verze	Obsah změny/ revize	Schválení revize
01.01.2023	A1	Nový dokument	Mgr. L. Stefflová
01.06.2023	A1	Beze změn	Mgr. L. Stefflová

ÚVOD

Oddělení buněčného chimerizmu je ve struktuře Ústavu hematologie a krevní transfuze (ÚHKT) samostatným oddělením v rámci Výzkumného úseku a je součástí Komplementu laboratoří ÚHKT (zdravotnická laboratoř č. 8081, akreditovaná ČIA dle ČSN EN ISO 15189). Oddělení buněčného chimerizmu je od roku 2013 akreditováno u mezinárodní odborné organizace European Federation for Immunogenetics. V rámci této organizace se pravidelně úspěšně zúčastňujeme mezinárodních kontrol kvality práce pro všechna prováděná vyšetření.

Základním zaměřením oddělení jsou vyšetření pacientů indikovaných k transplantaci hematopoetických kmenových buněk a sledování potransplantačního průběhu. Pro tyto účely provádíme vyšetření buněčného chimerizmu pro monitorování úspěšnosti transplantace pomocí genotypizace a kvantifikace variabilních polymorfizmů typu STR (Short Tandem Repeats) a krátkých inzercí a delecí (indel). V případě vzniku relapsu jsme schopni rozlišit typ relapsu (klasický versus HLA-loss) pro určení následné strategie léčby.

Pro tato vyšetření sloužíme jako referenční pracoviště, zajišťující koordinaci a výměnu informací s ostatními DNA laboratořemi v ČR. Poskytujeme konzultační služby a organizujeme mezilaboratorní porovnávání zkoušek. Všechna vyšetření jsou prováděna metodami molekulární genetiky. Oddělení buněčného chimerizmu slouží i jako školící pracoviště.

VŠEOBECNÉ INFORMACE O ODDĚLENÍ

Základní informace o oddělení

Název organizace: Ústav hematologie a krevní transfuze

Adresa organizace: U Nemocnice 2094/1, 128 20 Praha 2

web: www.uhkt.cz

IČO: 00023736

Název oddělení: Oddělení buněčného chimerizmu

Součást Komplementu laboratoří ÚHKT

Adresa a umístění: U Nemocnice 2094/1, Praha 2, PSČ 128 20,

Provozní doba oddělení: 7.30 – 15.00 hodin (pracovní dny, pondělí až pátek)

Začlenění oddělení v organizační struktuře ÚHKT a vedení oddělení


Oddělení buněčného chimerizmu je samostatným oddělením v rámci Výzkumného úseku a je součástí Komplementu laboratoří ÚHKT.

Vedení oddělení:

Vedoucí Oddělení buněčného chimerizmu: Mgr. Lucie Stefflová

Telefon: 221 977 308

E-mail: Lucie.Stefflova@uhkt.cz

LABORATORNÍ PŘÍRUČKA	 Ustav hematologie a krevní transfuze
ODDĚLENÍ BUNĚČNÉHO CHIMERIZMU	13950_LP_23_01

Zástupce vedoucí Oddělení buněčného chimerizmu: Ing. Kristina Josefusová, DiS.

Telefon: 221 977 117

E-mail: Kristina.Josefusova@uhkt.cz

Technická vedoucí Oddělení buněčného chimerizmu: RNDr. Radka Žižková

Telefon: 221 977 308

E-mail: Radka.Zizkova@uhkt.cz

Zaměření oddělení

Oddělení se zabývá molekulárně genetickými analýzami vzorků periferní krve, kostní dřeně, eventuálně jiného biologického materiálu převážně pacientů indikovaných k transplantaci hematopoetických kmenových buněk a sledováním jejich potransplantačního průběhu.

Většina analýz je založena na různých typech polymerázové řetězové reakce (PCR, kvantitativní real-time PCR) a na další práci s PCR produkty (fragmentační analýza na genetickém analyzátoru). Laboratoř provádí základní molekulárně-genetická vyšetření, potřebná pro diagnostiku, prognostiku a sledování minimálního reziduálního onemocnění u vybraných onkohematologických onemocnění.

Organizace oddělení, vnitřní členění a přístrojové vybavení

Všichni pracovníci oddělení mají vymezené odpovědnosti a pravomoci a jsou definovány instanční vztahy pracovníků. Oddělení je vedeno odborným vedoucím, který je členem vedení laboratoře a je zodpovědný za činnost oddělení po odborné i organizační stránce.

Pracovníci procházejí systémem kontinuálního vzdělávání a podléhají doзору přiměřeného jejich zkušenostem a odpovědnostem. Vedení oddělení odpovídá za vytváření a zajišťování takových technických zdrojů, které jsou nezbytné k zabezpečení požadované kvality prováděných vyšetření.

Oddělení má k dispozici prostory striktně rozdělené na práci v pre-PCR a post-PCR zóně, tak aby nemohlo dojít ke kontaminaci PCR produkty. Tyto zóny jsou jednoznačně definované prostorově a barevně.

Všechny přístroje a pomůcky, jejichž výstupy mohou ovlivnit výsledky prováděných vyšetření, podléhají pravidelným kalibracím, validacím nebo ověřením.

Spektrum nabízených vyšetření

Vyšetření buněčného chimerizmu po alogenní HSCT (transplantaci hematopoetických kmenových buněk) SOP 01, 07

Oddělení buněčného chimerizmu nevyužívá služeb jiných laboratoří pro provádění nabízených vyšetření.

ODBĚR PRIMÁRNÍCH VZORKŮ

Pokyny pro získávání vzorků pacienta

Periferní krev a kostní dřeň se standardně odebírá do protisrážlivého roztoku EDTA, případně ACD. Nelze použít vzorky odebrané do heparinu (heparin inhibuje PCR reakce, vyšetření tedy nelze provést z takto odebraných vzorků).

Přesné požadavky na množství odebíraného materiálu je pro jednotlivá vyšetření v kapitole INFORMACE K NABÍZENÝM VYŠETŘENÍM

Pro vyšetření lze přijímat i jiný biologický materiál dle specifikací uvedených pro jednotlivá vyšetření v kapitole INFORMACE K NABÍZENÝM VYŠETŘENÍM

Každá zkumavka se vzorkem musí být náležitě označena identifikačními údaji vyšetřované osoby a datem odběru. Vzorky s řádně vyplněnou žádankou musí být dodány na Oddělení buněčného chimerizmu, budova C, přízemí.

Pokyny pro přípravu pacienta

Odběr periferní krve ani kostní dřeně pro prováděná vyšetření nevyžaduje zvláštní přípravu pacienta před odběrem. Některá vyšetření nelze provést u pacientů po provedené alogenní transplantaci krvetvorných buněk a po infuzi dárcovských lymfocytů. Specifikace jsou uvedeny u jednotlivých vyšetření v kapitole INFORMACE K NABÍZENÝM VYŠETŘENÍM v části Platnost postupu/faktory ovlivňující vyšetření.

Pokyny pro vyplnění žádanky

Ke každému provedenému odběru je třeba dodat řádně vyplněnou žádanku o vyšetření. Tu je možné najít na internetových stránkách www.uhkt.cz.

V žádance musí být náležitě identifikován lékař oprávněný indikovat vyšetření (včetně adresy klinického žadatele a jeho telefonního, ev. faxového spojení). Žádanka musí obsahovat jednoznačnou identifikaci vyšetřované osoby, včetně čísla zdravotní pojišťovny a číselného označení diagnóz, a údaj o datu a času odběru primárního vzorku.

Informovaný souhlas s vyšetřením

Veškerá vyšetření lze provést pouze na základě informovaného souhlasu pacienta. Požadavky na obsah informovaného souhlasu pro genetická vyšetření jsou specifikována odbornou společností SLG ČLS JEP. Informované souhlasy pro prováděná vyšetření je možné najít na internetových stránkách www.uhkt.cz. K vyšetření je možné přijmout vzorek s informovaným souhlasem dle vzoru zadavatele, pokud obsahuje všechny potřebné údaje dle požadavků SLG ČLS JEP.

Pokud není k žádance přiložen informovaný souhlas pacienta nebo jeho kopie, je třeba vyznačit na žádance požadované nakládání se vzorkem po vyšetření dle aktuálního informovaného souhlasu pacienta. Zadávající lékař je zodpovědný za přenos správné informace o nakládání se vzorkem od pacienta do laboratoře.

!! POKUD PACIENT NESOUHLASÍ S UCHOVÁNÍM VZORKU, PŘÍPADNĚ JEHO DALŠÍM VYUŽITÍM PRO VĚDECKÉ ÚČELY, JE TŘEBA NA ŽÁDANCE ZAŠKRTNOUT „NE“ V PŘÍSLUŠNÉM ŘÁDKU!!!

Pokyny pro činnosti při odběru

Při provedení odběru musí být splněny tyto požadavky:

- Ověření totožnosti pacienta
- Ověření, že pacient splnil požadavky před vyšetřením
- Musí být proveden záznam o totožnosti osoby, která primární vzorek odebrala, datum a čas odběru

Dodání vzorků na oddělení a podmínky transportu

Vzorek musí být pro přepravu zabezpečen tak, aby nemohlo dojít k rozlití, potřísnění biologickým materiálem nebo jinému znehodnocení vzorku.

Vzorek periferní krve/kostní dřeně by měl být doručen na oddělení co nejdříve po jeho odběru. Maximální doba uchování a transportu vzorků periferní krve/kostní dřeně je dva dny od náběru. Není zapotřebí zvláštních opatření pro transport, vzorek se pouze nesmí vystavit zahřátí (např. vystavení slunci, držení v ruce apod.). Přesahuje-li doba od náběru 3 hodiny, je vhodné vzorek transportovat při 4°C. Při této teplotě je možné jej skladovat až 2 dny. Transport vzorku zajišťuje zadavatel a odpovídá za něj. Oddělení nekontroluje hodinu odběru. Systém vnitřní kontroly vyšetřovaných vzorků je totiž na oddělení nastaven tak, aby odhalil pochybení v kvalitě vyšetřovaného materiálu.

Specifikace uchování a přepravy pro jiný biologický materiál, který může být použit pro jednotlivá vyšetření, je uvedena v kapitole INFORMACE K NABÍZENÝM VYŠETŘENÍM.

Ke každému dodanému vzorku je třeba dodat řádně vyplněnou žádanku o vyšetření.

Vzorky jsou přijímány v provozní době oddělení, a to v pracovní dny v čase 7.00–14.30 hodin.

Možné chyby při skladování a transportu:

- použití nevhodné zkumavky
- použití nesprávného protisrážlivého činidla
- nedostatečné označení zkumavek s materiálem
- potřísnění zkumavky s materiálem (anebo průvodní žádanky) krví
- vystavení vzorku teplu, přímému slunečnímu světlu, nebo mrazu

Základní informace k bezpečnosti při práci se vzorky

Obecné zásady strategie bezpečnosti práce s biologickým materiálem vycházejí z příslušných právních předpisů a směrnic. Všichni zaměstnanci jsou povinni postupovat při vyšetřování pacientů tak, aby nedocházelo ke vzniku a šíření nozokomiálních nákaz ve smyslu příslušných ustanovení této vyhlášky.

Na základě této vyhlášky byly stanoveny tyto zásady pro bezpečnost práce s biologickým materiálem:

- Každý vzorek krve je nutné považovat za potenciálně infekční.
- Žadanky ani vnější strana zkumavky nesmí být kontaminovány biologickým materiálem – toto je důvodem k odmítnutí vzorku.

Vzorky jsou přepravovány v uzavřených zkumavkách, které jsou vloženy do stojánku nebo přepravního kontejneru tak, aby během přepravy vzorku do laboratoře nemohlo dojít k rozliti, potřísnění biologickým materiálem nebo jinému znehodnocení vzorku.

ZPRACOVÁNÍ PRIMÁRNÍCH VZORKŮ PŘED DODÁNÍM NA ODDĚLENÍ

Na oddělení mohou být přijímány i vzorky, které byly připraveny z primárního vzorku v jiné laboratoři. K takovým vzorkům je třeba dodat žádanku na vyšetření od zadavatele a současně řádně vyplněnou PRŮVODKU VZORKU. Typy vzorků, které lze přijímat pro jednotlivá vyšetření, jsou uvedeny v kapitole INFORMACE K NABÍZENÝM VYŠETŘENÍM v části Typy vzorků, které lze pro vyšetření použít.

Formulář PRŮVODKA VZORKU je možné najít na internetových stránkách www.uhkt.cz. Všechny nádoby se vzorky připravenými v jiné laboratoři musí být označeny minimálně identifikačními údaji uvedenými v PRŮVODCE VZORKU. Značení zpracovaných vzorků musí být jednoznačné, aby nemohlo dojít k záměně s jinými vzorky.

FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ VYŠETŘENÍ

Předpokladem úspěšného vyšetření primárního vzorku je přítomnost dostatečného množství jaderných buněk v periferní krvi odebírané osoby (minimálně 1.5×10^6 leukocytů/ml). Požadavek dostatečnosti jaderných buněk platí i pro primární vzorky kostní dřeně. V případě hypocelularity periferní krve či kostní dřeně (zejména v raném období po alogenní HSCT a v průběhu chemoterapie) je žádoucí odebrat větší množství primárního vzorku příslušné tkáně, než je níže uvedeno.

KRITERIA PRO PŘIJETÍ A ODMÍTNUTÍ VZORKŮ

Na oddělení mohou být přijaty pouze vzorky, které splňují výše uvedená kritéria. Přehled postupu při nesplnění těchto kritérií uvádí následující tabulka.

Nesoulad v základních identifikačních znacích pro přidělení žádanky ke vzorku biologického materiálu (jméno a příjmení pacienta, rodné číslo pacienta nebo číslo pojistky pacienta)	→ materiál není přijat k dalšímu zpracování
Je porušen obal (část materiálu vytekla při transportu apod.)	→ materiál není přijat k dalšímu zpracování
Není správně proveden odběr	→ materiál není přijat k dalšímu zpracování
Žádanka není řádně vyplněná (schází některé povinné údaje (diagnóza, IČP ordinujícího lékaře, odbornost)	→ biologický materiál je přijat

Ve zvlášť výjimečných případech (např. z důvodu vitální indikace) lze vzorky potřísněné biologickým materiálem či vzorky s menším než doporučeným množstvím materiálu vyšetřit. Pracovník přijímající takové

vzorky o tomto neprodleně informuje ošetřujícího lékaře. Pouze na výslovnou žádost lékaře, který vyšetření požaduje, budou tyto vzorky vyšetřeny. Výše uvedené skutečnosti budou zaznamenány v komentáři a Protokolu o výsledku vyšetření.

Za závazné se vždy považují údaje uvedené na štítku vzorku. O odmítnutí vadných (kolizních) primárních vzorků je na oddělení veden záznam.

Při přijímání nového odběru u dříve odmítnutých vzorků je nutné, aby zadavatel zaslal novou žádanku.

ODBORNÉ KONZULTACE

V případě potřeby jsou zákazníkům poskytovány další konzultace a návody v odborné oblasti související s prováděnými činnostmi.

Pracovníci Oddělení buněčného chimerizmu nekomunikují přímo s pacienty. Výsledky prováděných vyšetření jsou předávány přímo ošetřujícímu lékaři (zákazníkovi), který je rovněž zodpovědný za další komunikaci s pacientem.

Zásadní informace a konzultace k prováděným vyšetřením podává především vedoucí oddělení. Informace a konzultace k jednotlivým vyšetřením podávají vedoucí příslušných pracovních skupin nebo jejich zástupci. Informace ke klinickým interpretacím prováděných vyšetření jsou v kompetenci příslušných lékařů. Informace týkající se technických detailů, především preanalytické fáze – tj. způsobu odběru, transportu vzorků apod. podávají všichni oprávnění pracovníci příslušných pracovních skupin.

Vedoucí oddělení je dostupná v laboratoři (tel. 221 977 308).

ŘEŠENÍ STÍŽNOSTÍ

Stížnosti mohou být adresovány na vedení oddělení, případně další pracovníky. Není-li stížnost k práci oddělení adresována přímo vedoucí oddělení, řeší ji pracovník, který ji přijal a informuje vedoucí oddělení. Výsledek a způsob řešení je evidován. Vždy je nutné jednat s dostatečnou vstřícností.

Drobné připomínky k práci oddělení přijímá a okamžitě řeší kterýkoliv pracovník oddělení a následně informuje svého nadřízeného. Vyřizování všech ostatních stížností je věcí vedoucí laboratoře. Postup se řídí SŘ-ÚHKT Vyřizování stížností.

OCHRANA INFORMACÍ

Všichni pracovníci Oddělení buněčného chimerizmu jsou si vědomi povinnosti zachovávat mlčenlivost o veškerých informacích získaných v průběhu poskytování služby a své povinnosti chovat se tak, aby práva zákazníka a pacienta nebyla poškozena.

Ochrana informací se řídí platnými právními předpisy a vnitřními předpisy ÚHKT. Pravidla pro zachování důvěrnosti informací a ochranu elektronicky ukládaných dat jsou zavedena ve dvou úrovních:

- Každý pracovník se podpisem závazku důvěrnosti a mlčenlivosti zavazuje k mlčenlivosti o skutečnostech, o nichž se dozvěděl v souvislosti s výkonem svého povolání s výjimkou případů, kdy skutečnost sděluje na základě oznamovací povinnosti dle zvláštních předpisů.

- Na oddělení jsou zavedena a dodržována systémová a technická opatření pro zabezpečení důvěrnosti informací, především ochrana písemných i elektronických dokumentů pomocí řízeného přístupu se specifickými oprávněními pro jednotlivé skupiny pracovníků.

INFORMACE K NABÍZENÝM VYŠETŘENÍM

Vyšetření buněčného chimerizmu po alogenní HSCT

Princip

Odběr primárních vzorků periferní krve, kostí dřeně a bukalní sliznice se provádí pro účely získání DNA a stanovení genotypů polymorfních lokusů, krátkých inzercí a delecí (indels) a sex specifických lokusů DNA v rámci vyšetření buněčného chimerizmu po alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk (alHSCT). Vyšetření umožňuje monitorování úspěšnosti alHSCT, zejména pak dynamiku příhojení a aktivitu dárcovského štěpu projevující se jako určitý podíl alogenní krve tvorby, v ideálním případě jako kompletní chimerizmus (CC – 100 % alogenní krve tvorby). Znovuobjevení se autologní krve tvorby, resp. její stoupající podíl – progresivní smíšený chimerizmus (MC) je známkou nebezpečí relapsu onemocnění.

Platnost postupu/faktory ovlivňující vyšetření

Postup lze užít k odběru primárních vzorků nesrážlivé periferní krve nebo kostní dřeně, bukalní sliznice, rovněž pro pořízení krevní skvrny na FTA kartu (pro SOP 01). Primární vzorky se odebírají pro účely:

Vyšetření informativity

tj. výběr polymorfních lokusů DNA (STR, SNP a indels), které se budou u pacienta po alHSCT vyšetřovat. Jedná se o lokusy, kde je možné odlišit konstituční genotyp pacienta a genotyp jeho dárce.

Primární vzorky periferní krve (5–10 ml) se proto odebírají pacientovi před alHSCT a jeho dárce. Je žádoucí provést odběr ve stavu dostatečné buněčnosti krve pacienta, tj. ještě před zahájením přípravného režimu transplantace.

V případě, že nebylo možné zajistit vyšetření informativity u pacienta před alHSCT, odebere se pacientovi po alHSCT primární vzorek, který neobsahuje krevní, či krve tvornou tkáň (stěr buněk vnitřní strany dutiny ústní – bukalní sliznice). Pokud nebylo možné zajistit vyšetření informativity u dárce (u nepříbuzných dárců z ciziny, když nebyl zaslán primární vzorek periferní krve) primární vzorek dárce pro vyšetření informativity pak nahrazuje výplach transplantačního vaku obsahujícího zbytky převážených hematopoetických kmenových buněk.

Monitoring chimerizmu u pacienta po alHSCT

Z principu vyšetření buněčného chimerizmu po HSCT vyplývá jeho velmi variabilní charakter. Postup vyšetření závisí na DNA profilech dárce a příjemce, době vyšetření od transplantace, stavu pacienta i na specifických požadavcích ošetřujících lékařů, tzn., že může být kombinováno vyšetření SOP 07 a SOP 01. Výběr konkrétního postupu může být tedy závislý na diagnóze pacienta, na existenci dalších markerů pro sledování minimální reziduální nemoci, na stavu pacienta, na výsledku předchozího vyšetření atd.

O výběru použitých metod rozhodují s konečnou platností akreditovaní VŠ pracovníci. V zásadě při výběru a kombinaci zkušebních metod přihlíží ke specifickým charakteristikám jednotlivých stanovení.

Dokument zobrazený na [portále SMK](#) je aktuálně platnou verzí, po vytištění slouží pouze pro informativní účely.

Informace lze získat na telefonních číslech 221 977 308, 221 977 117.

Primární a zpracované vzorky jsou v Oddělení buněčného chimerizmu značeny a uchovány dle platných interních předpisů.

Typy vzorků, které lze pro vyšetření použít

Primární vzorky:

- Periferní krev
- Kostní dřeň
- Stěr bukalní sliznice
- Výplach transplantačního vaku
- Suspenze buněčné linie

Primární vzorky periferní krve (5–10 ml) a/nebo kostní dřeně (2–5 ml) se odebírají v dohodnutém časovém sledu pacientovi po aHSCT. Předpokladem úspěšného vyšetření primárního vzorku je přítomnost dostatečného množství jaderných buněk v periferní krvi odebírané osoby (minimálně 1.5×10^6 leukocytů/ml). Požadavek dostatečnosti jaderných buněk platí i pro primární vzorky kostní dřeně. V případě hypocelularity periferní krve či kostní dřeně (zejména v raném období po aHSCT) je žádoucí odebrat větší množství primárního vzorku příslušné tkáně, než je výše uvedeno.

Zpracované vzorky:

- DNA izolovaná ze somatických jaderných buněk
- DNA izolovaná z buněčných frakcí
- DNA izolovaná ze stěru bukalní sliznice
- DNA izolovaná z buněčné linie
- FTA skvrny

Doba vydání výsledku

Běžná doba: 10 dní od dodání vzorku

Statim: 3 dny od dodání vzorku

Uvedený počet dní znamená počet pracovních dní od dodání primárního vzorku (odebraného dle této LP) s řádně vyplněnou žádankou na Oddělení buněčného chimerizmu do data uvolnění výsledku.

Hlášení výsledků

Výsledkové protokoly jsou zasílány v papírové podobě nebo zaheslované v elektronické podobě. Telefonicky se hlásí zadavateli výsledky s požadavkem Statim nebo významné změny v trendu dynamiky buněčného chimerizmu. O důležitosti nahlášení výsledku rozhoduje s konečnou platností akreditovaný VŠ pracovník, oprávněný k uvolnění výsledku.

VYŘIZOVÁNÍ STÍŽNOSTÍ

Stížnosti jsou řešeny v souladu se SŘ Vyřizování stížností a oznámení v ÚHKT. Není-li stížnost k práci oddělení adresována přímo vedoucímu oddělení, řeší ji pracovník, který ji přijal a informuje vedoucího oddělení. Výsledek a způsob řešení je evidován. Vždy se snažíme jednat s dostatečnou vstřícností.

Drobné připomínky k práci oddělení přijímá a řeší kterýkoli pracovník oddělení a následně informuje vedoucího oddělení. Závažnější stížnosti jsou vyřizovány zásadně vedoucím oddělení.

SOUVISEJÍCÍ DOKUMENTACE

NRL_01_SOP_14_01 Vyšetření buněčného chimerizmu po alogenní HSCT analýzou sekvenčních polymorfizmů pomocí elektroforézy

NRL_07_SOP_14_01 Vyšetření buněčného chimerizmu po alogenní HSCT analýzou sekvenčních polymorfizmů pomocí real-time PCR

13950_F_23_01-02 ŽÁDANKY

13950_F_23_03 INFORMACE PRO PACIENTY

13900_F_15_09-10, F_SMJ_87 INFORMOVANÉ SOUHLASY

ROZDĚLOVNÍK

Číslo výtisku	Uložení
1	Portál SMK
2.	WEB ÚHKT