


LABORATORNÍ PŘÍRUČKA	 Ustav hematologie a krevní transfuze
ODDĚLENÍ GENOMIKY	13500_LP_15_01

Zpracovatel:	Mgr. Martin Vostrý		
Přezkoumal a schválil:	RNDr. Monika Beličková, Ph.D.		
Garant dokumentu:	RNDr. Monika Beličková, Ph.D.		
Platnost od:	23.05.2022		Hana Feixová
Výtisk č:	2	Počet stran:	16
Verze:	A5	Přijato do evidence:	23.05.2022

SEZNAM ZMĚN A REVIZÍ ŘÍZENÉHO DOKUMENTU

Platnost od:	Verze	Obsah změny/ revize	Schválení revize
30.6.2016	A3	Beze změn	Mgr. Vostrý
10.05.2017	A3	Upřesnění informací v kapitolách 3.6, 10.5.1, 10.5.3, 10.6.3 na straně 5, 12, 13	Mgr. Vostrý
27.6.2018	A3	Úprava kap. 2.2 a 2.4 na str. 3 a 4, kap. 3.6 na str. 5, kap. 10.1.2 na str. 8, kap. 10.2.2 na str. 9, kap. 10.3.1 na str. 10, kap. 10.4.1 na str. 11	Mgr. Vostrý
18.1.2019	A4	Přidána nová SOP13 do kapitol: 2.4, 2.5, 3.6, 10.7 a 12 na stranách 4, 5, 13, 14 a 15	Mgr. Vostrý
28.6.2019	A4	Změna technické vedoucí pro SOP02+10 – str. 3	Mgr. Vostrý
31.3.2020	A4	Změna technické vedoucí pro SOP09+11 – str.4, změny v textu-popis metody v odst.10.3 – str.10, změny v textu v odst.10.4 – str.11; odstranění neakreditované metody ze seznamu vyšetření – str. 4, změna v kap. 12 - str. 15). Vznik přílohy č. 1, F_SMJ_37 list změn a revizí - str.15	Mgr. Vostrý
23.05.2022	A5	Změna v pokynech pro získávání vzorků – str.4, odst. Ochrana informací – str. 8	Mgr. Vostrý
25.05.2023	A5	Str. 3 změna jména technické vedoucí	Mgr. Vostrý

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

ÚVOD

Oddělení genomiky 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). Hlavní odbornou činností Oddělení genomiky je molekulární diagnostika, stanovení hladin expresí prognostických faktorů, monitorování minimální reziduální nemoci a detekce mutací u vybraných hematologických a onkohematologických onemocnění.

Oddělení genomiky se zabývá i výzkumnou činností a slouží jako školící pracoviště.

VŠEOBECNÉ INFORMACE O LABORATOŘI

Základní informace o laboratoři

Název organizace: Ústav hematologie a krevní transfuze, p.o.

Adresa organizace: U Nemocnice 2094/1, 128 00 Praha 2

web: www.uhkt.cz

IČO: 00023736

Název laboratoře: **Oddělení genomiky**

Součást Komplementu laboratoří ÚHKT

Adresa a umístění: U Nemocnice 2094/1, Praha 2, PSČ 128 00,

Provozní doba pro příjem vzorků: 8.00–15:00 hodin (pracovní dny, pondělí až pátek)

Začlenění laboratoře v organizační struktuře ÚHKT a vedení laboratoře

Oddělení genomiky je samostatným oddělením v rámci Výzkumného úseku a je součástí Komplementu laboratoří ÚHKT. Vedení laboratoře:

Vedoucí oddělení: RNDr. Monika Beličková, Ph.D.
Telefon: 221 977 305
FAX: 221 977 371
E-mail: Monika.Belickova@uhkt.cz

Zástupce vedoucí oddělení: Ing. Michaela Dostálová Merkerová, Ph.D.
Telefon: 221 977 231
E-mail: Michaela.Merkerova@uhkt.cz

Zaměření laboratoře

Laboratoř se zabývá molekulárně genetickými analýzami vzorků krve, kostní dřeně, eventuálně jiného biologického materiálu pacientů převážně s hematologickými malignitami a myeloproliferativními syndromy. Většina analýz je založena na různých typech vyšetření polymerázové řetězové reakce (PCR), a na další práci s PCR produkty (sekvenování). Laboratoř provádí základní molekulárně-genetická vyšetření, potřebná pro diagnostiku, prognostiku a sledování minimálního reziduálního onemocnění u vybraných onkohematologických onemocnění. Rovněž výzkumná činnost se týká uvedených onemocnění.

Organizace laboratoře, vnitřní členění a přístrojové vybavení

Všichni pracovníci laboratoří mají vymezené odpovědnosti a pravomoci a jsou definovány instanční vztahy pracovníků. Funkčně je laboratoř členěna na pracovní skupiny podle typu prováděných vyšetření, každá skupina je vedena odborným vedoucím, který je zodpovědný za činnost své pracovní skupiny po odborné i organizační stránce.

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

Pracovní skupiny:

Kvantifikace WT1 a NPM1 (SOP 02, 10)

technická vedoucí Mgr. Ela Cerovská

Telefon: 221 977 231

e-mail: Ela.Cerovska@uhkt.cz

Vyšetření mutací v genu HBB (SOP 06), v genech HBA1 a HBA2 (SOP 12)

technický vedoucí Mgr. Martin Vostrý

Telefon: 221 977 306

e-mail: Martin.Vostrý@uhkt.cz

Vyšetření NPM1 a CEBPA (SOP 09, 11)

technická vedoucí Ing. Eliška Čechová

Telefon: 221 977 231

e-mail: Eliska.Stara@uhkt.cz

Vyšetření variant lidského genomu metodou masivně paralelního sekvenování – myeloidní panel (SOP 13)


technická vedoucí Mgr. Jitka Veselá

Telefon: 221 977 306

e-mail: Jitka.Vesela@uhkt.cz

Laboratoř 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.

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

LABORATORNÍ PŘÍRUČKA	 Ustav hematologie a krevní transfuze
ODDĚLENÍ GENOMIKY	13500_LP_15_01

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

Spektrum nabízených vyšetření

Vyšetření množství transkriptu WT1 (wilms tumor 1)	SOP 02
Vyšetření množství transkriptu NPM1 (nukleofosmin 1)	SOP 10
Vyšetření přítomnosti mutací v genu NPM1 (nukleofosmin 1)	SOP 09
Vyšetření přítomnosti mutací v genu CEBPA (CCAAT/enhancer binding protein alpha)	SOP 11
Vyšetření mutací v genu HBB (hemoglobin beta)	SOP 06
Vyšetření mutací v genech HBA1 a HBA2	SOP 12
Vyšetření variant lidského genomu metodou masivně paralelního sekvenování – myeloidní panel	SOP 13

Oddělení genomiky 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.

Každá zkumavka se vzorkem musí být náležitě označena identifikačními údaji vyšetřované osoby, datem. Vzorky s řádně vyplněnou žádankou (viz kapitola 3.3) musí být dodány na oddělení genomiky, 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 allogenní 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 něm musí být náležitě identifikován lékař oprávněný indikovat vyšetření (včetně adresy klinického žadatele a jeho telefonního, ev. faxového spojení). Žádanka musí obsahovat jednoznačnou identifikaci

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

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. Za podpis informovaného souhlasu s provedeným vyšetřením a archivací biologického materiálu zodpovídá indikující lékař.

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 do laboratoře 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 do laboratoře co nejdříve po jeho odběru. Maximální doba uchování a transportu vzorků periferní krve/kostní dřeně je dva dny od náběru. Pro SOP 06 - Vyšetření mutací v genu HBB a SOP 12 - Vyšetření mutací v genech HBA1 a HBA2 je možné primární vzorek doručit do 14 dnů od jeho odběru. Pro SOP 13 - Vyšetření variant lidského genomu metodou masivně paralelního sekvenování – myeloidní panel je možné primární vzorek doručit do 7 dnů od jeho odběru.

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 jej transportovat při 4°C. Při této teplotě je možné jej skladovat až 14 dnů. Vzorky pro vyšetření WT1, mutovaného NPM1 (SOP02 a 10) lze skladovat při 4°C maximálně 2 dny (o víkendu do rána následujícího pondělí, pro případ nově diagnostikovaného pacienta). Transport vzorku zajišťuje zadavatel a odpovídá za něj. Laboratoř nekontroluje hodinu odběru. Systém vnitřní kontroly vyšetřovaných vzorků je totiž na laboratoři nastaven tak, aby odhalil pochybení v kvalitě vyšetřovaného materiálu.

Ke každému dodanému vzorku je třeba dodat řádně vyplněnou žádanku o vyšetření (viz kapitola 3.3).

Vzorky jsou přijímány v čase 8.00–15.00 hodin v pracovní dny.

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, tj. především z vyhlášky MZ ČR č. 306/2012 Sb. a jejich příloh, kterou se upravují podmínky předcházení vzniku a šíření infekčních onemocnění a hygienické požadavky na provoz zdravotnických zařízení. 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.
- Žádanky 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 rozlití, potřísnění biologickým materiálem nebo jinému znehodnocení vzorku.

ZPRACOVÁNÍ PRIMÁRNÍCH VZORKŮ PŘED DODÁNÍM DO LABORATOŘE


Do laboratoře 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

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

LABORATORNÍ PŘÍRUČKA	 Ustav hematologie a krevní transfuze
ODDĚLENÍ GENOMIKY	13500_LP_15_01

dřeně (zejména v raném období po aHSCT a v průběhu chemoterapie) je žádoucí odebrat větší množství primárního vzorku příslušné tkáně, než je výše uvedeno.

KRITÉRIA PRO PŘIJETÍ A ODMÍTNUTÍ VZORKŮ

Do laboratoře 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 přejímající 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 v laboratoři veden záznam.

Při přijímání nového odběru u dříve odmítnutých vzorků je nutno, 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 genomiky 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 laboratoře. 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.

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

Vedoucí laboratoře je dostupný v laboratoři (tel. 221 977 305).

ŘEŠENÍ STÍŽNOSTÍ

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

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

OCHRANA INFORMACÍ

Všichni pracovníci oddělení genomiky 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.
- V laboratoři 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 množství transkriptu WT1

Princip

Odběr primárních vzorků periferní krve a kostí dřeně se provádí pro účely získání RNA a následně cDNA a následné stanovení hladiny exprese genu *WT1*. Primárně je vyšetření určeno k monitorování hladiny exprese genu *WT1* jakožto markéru minimální reziduální nemoci v období při diagnóze a následně po indukční terapii a po jednotlivých konsolidačních terapiích a dále ve specifikovaných intervalech. Vyšetření umožňuje monitorování úspěšnosti léčby a zejména včasné odhalení nástupu relapsu onemocnění – tj. při nárůstu exprese genu *WT1* nad horní normální limit. Rovněž byl prokázán prognostický vliv míry exprese genu *WT1* před allogenní transplantací a vhodnost sledování exprese genu *WT1* po transplantaci, kde opět nárůst exprese genu *WT1* nad horní normální limit indikuje relaps onemocnění umožňující preemptivní léčbu.

Platnost postupu/faktory ovlivňující vyšetření

Příjem vzorků na určení exprese genu *WT1* není nutno objednávat. Odběry se provádějí podle následovně popsaného harmonogramu. Při diagnóze musí být primární vzorek odebrán před započítáním indukční terapie, následně vždy před započítáním konsolidační terapie. Poté 1x měsíčně v prvním roce léčby a další roky jednou za 3 měsíce. Pokud je pacient indikován k transplantaci je nutno vyšetření provést před přípravnou terapií. Vyšetření se provádí u pacientů s AML a MDS z periferní krve pacientů. Senzitivita stanovení exprese genu *WT1* je vyšší v periferní krvi a je rovněž méně zatěžující pro pacienta než aspirace z kostní dřeně. Dle žádosti zadávajícího lékaře lze provést i vyšetření z kostní dřeně. Vzorek musí pro přípravu lyzátu jako zdroje RNA a následně cDNA pro kvantitativní PCR obsahovat nejméně 106 mononukleárních buněk. Kvalita vzorku je rovněž následně určena kvantifikací kontrolního genu *ABL*, kde je určen minimální limit-počet kopií genu *ABL*.

Informace lze získat na telefonu 221 977 231 (interní linka ÚHKT).

Lyzáty buněk, vyizolovaná RNA a přepsaná cDNA vyizolovaná z primárních vzorků jsou na Oddělení genomiky značeny a uchovány dle platných interních předpisů. Doba skladování těchto vzorků je neomezená. RNA je při skladování více citlivá k degradaci. Vyšetření lze z těchto vzorků případně opakovat.

Typy vzorků, které lze pro vyšetření použít

Primární vzorky:

- periferní krev 5-10 ml odebráno do ACD nebo roztoku EDTA

Zpracované vzorky:

- lyzát buněk,
- izolovaná celková RNA
- přepsaná cDNA

Doba vydání výsledku

20 dní od dodání vzorku

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

VYŠETŘENÍ MNOŽSTVÍ TRANSKRIPTU *NPM1*

Princip

Odběr primárních vzorků periferní krve a kostí dřeně se provádí pro účely získání RNA a následně cDNA a následně stanovení hladiny exprese mutovaného genu *NPM1* –tj. tři majoritní mutace: *NPM1mutA*, *NPM1mutB* a *NPM1mutD*. Vyšetřování jsou pacienti s AML, u nichž byla při diagnóze detekovaná příslušná mutace genu *NPM1*. Primárně je vyšetření určeno k monitorování hladiny exprese mutovaného genu *NPM1* jakožto markéru minimální reziduální nemoci v období při diagnóze a následně po indukční terapii a po jednotlivých konsolidačních terapiích a dále ve specifikovaných intervalech. Vyšetření umožňuje

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

monitorování úspěšnosti léčby a zejména včasné odhalení nástupu relapsu onemocnění – tj. při nárůstu exprese genu *NPM1* nad nulovou hodnotu. Molekulární relaps je dříve detekován v KD. Rovněž byla prokázána vhodnost sledování exprese mutovaného genu *NPM1* po transplantaci, kde opět nárůst exprese mutovaného genu *NPM1* nad nulovou hodnotu indikuje relaps onemocnění umožňující preemptivní léčbu.

Platnost postupu/faktory ovlivňující vyšetření

Příjem vzorků na určení exprese mutovaného genu není nutno objednávat. Odběry se provádějí podle následovně popsaného harmonogramu. Při diagnóze musí být primární vzorek odebrán před započítáním indukční terapie, následně vždy před započítáním konsolidační terapie. Poté 1x měsíčně v prvním roce léčby a další roky jednou za 3 měsíce. Pokud je pacient indikován k transplantaci je nutno vyšetření provést před přípravnou terapií. Podle předběžných výsledků je detekce mutovaného genu *NPM1* senzitivnější v kostní dřeni, proto je vhodné analyzovat vzorky z kostní dřene souběžně s vzorky z periferní krve v době, kdy je indikována punkce KD. Vzorek musí pro přípravu lyzátu jako zdroje RNA a následně cDNA pro kvantitativní PCR obsahovat nejméně 106 mononukleárních buněk. Kvalita vzorku je rovněž následně určena kvantifikací kontrolního genu *ABL*, kde je určen minimální limit-počet kopií genu *ABL*.

Informace lze získat na telefonech telefonu 221 977 231 (interní linka ÚHKT).

Lyzáty buněk, vyizolovaná RNA a přepsaná cDNA vyizolovaná z primárních vzorků jsou na Oddělení genomiky značeny a uchovány dle platných interních předpisů. Doba uchování těchto vzorků je neomezená. Pouze RNA je více citlivá na degradaci. Vyšetření lze z těchto vzorků případně opakovat.

Typy vzorků, které lze pro vyšetření použít

Primární vzorky:

- periferní krev 5-10 ml odebráno do ACD nebo roztoku EDTA
- Kostní dřeň 1–3 ml odebráno do ACD nebo roztoku EDTA
- Zpracované vzorky:
- lyzát buněk,
- izolovaná celková RNA
- přepsaná cDNA

Doba vydání výsledku

20 dní od dodání vzorku

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

VYŠETŘENÍ PŘÍTOMNOSTI MUTACÍ *NPM1*

Princip

Nukleofosmin (*NPM1*) je jedním z nejčastěji mutovaných genů spojeným s akutní myeloidní leukémií (AML). Detekce mutace (jedná se o inzerci 4bp) genu *NPM1* v exonu 12 je založena na PCR z DNA s fluorescenčně

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

značeným primerem. PCR produkt je analyzován kapilární elektroforézou, která probíhá automaticky v genetických analyzátoch ABI3500 nebo ABI3500XL (AB Applied Biosystems) a vyhodnocuje se s použitím softwaru GeneMapper (AB Applied Biosystems). Jedná se o tzv. fragmentační analýzu, kde se alely lokusů projeví jako píky v příslušném velikostním pásmu (bp), určeném prostřednictvím velikostního standardu. Výsledek pacienta z fragmentační analýzy je porovnáván s výsledkem pozitivní a negativní kontroly. Touto metodou nelze určit typ mutace, výsledkem je pouze potvrzená pozitivita nebo negativita mutace v analyzovaném vzorku. Pro přesné určení typu mutace (v případě pozitivního výsledku) je vzorek vyšetřován metodou NGS-myeloidní panel (SOP13). Nejčastějšími mutacemi exonu 12 jsou typ A (c.860_863dup TCTG), typ B (c.863_864ins CATG), typ D (c860_863dup CCTG). Toto vyšetření je důležité pro volbu terapie a pro sledování reziduálního onemocnění u pacientů pomocí real-time PCR, tedy kvantitativního stanovení výskytu patologických klonů s mutovanou NPM1.

Platnost postupu/faktory ovlivňující vyšetření

Protokol o převzetí primárního vzorku (žádanka) je nezbytný pro provedení detekce mutací NPM1. Pro vyšetření je vyžadován vzorek ze záchytu onemocnění před nasazením indukční léčby. Po nasazení léčby hladiny mutací většinou klesají.

Informace lze získat na telefon. číslech 221 977 231

Primární a zpracované vzorky jsou na Oddělení genomiky značeny a uchovány dle platných interních předpisů.

Typy vzorků, které lze pro vyšetření použít

Primární vzorky:

- 3 ml kostní dřeně v dřevěném médiu nebo roztoku EDTA
- periferní krev (5-10 ml odebráno do roztoku EDTA)
- Zpracované vzorky:
- Izolovaná celková DNA

Doba vydání výsledku

20 dnů od dodání primárního vzorku nebo 10 dnů od obdržení DNA.

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

VYŠETŘENÍ PŘÍTOMNOSTI MUTACÍ *CEBPA* (CCAAT/ENHANCER BINDING PROTEIN ALPHA)

Princip

Metoda je založena na sekvenaci PCR produktů DNA genu pro *CEBPA*. Pomocí PCR amplifikujeme překrývající se úseky, které jsou po amplifikaci izolovány pomocí kitu – přečištění na kolonce a následně sekvenovány. Případné mutace jsou detekovány porovnáním sekvence PCR produktu s referenční sekvencí (NM 004364.4). Účelem je detekce pacientů nesoucích mutovanou *CEBPA*. Tito pacienti mají lepší než

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

průměrnou prognózu. I když se kompletní mutace na chemoterapii neliší od pacientů bez mutací, mají pacienti s mutacemi méně relapsů a dosahují lepšího přežití.

Platnost postupu/faktory ovlivňující vyšetření

Protokol o převzetí primárního vzorku (žádanka) je nezbytný pro provedení detekce mutací *CEBPA*. Pro vyšetření je vyžadován vzorek ze záchytu onemocnění, protože citlivost metody klasického Sangerova sekvenování, kterým je vyšetření prováděno, neumožňuje stanovit hladiny mutací pod 15 %. Po nasazení léčby většinou hladiny mutací klesají pod tuto hranici.

Informace lze získat na telefon. číslo 221 977 231

Primární a zpracované vzorky jsou na Oddělení genomiky značeny a uchovány dle platných interních předpisů.

Typy vzorků, které lze pro vyšetření použít

Primární vzorky:

- 3ml kostní dřeně v dřevěném médiu nebo roztoku EDTA
- periferní krev (5-10 ml odebráno do roztoku EDTA)
- Zpracované vzorky:
- Celková DNA

Doba vydání výsledku

20 dnů od dodání primárního vzorku nebo 10 dnů od obdržení celkové DNA.

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

VYŠETŘENÍ PŘÍTOMNOSTI MUTACÍ V GENU *HBB* (HEMOGLOBIN BETA) METODOU PŘÍMÉHO SEKVENOVÁNÍ

Princip

Metoda je založena na sekvenaci genu *HBB*. Pomocí PCR amplifikujeme úsek genu *HBB* zahrnující 3 exony a části 2 intronů, které jsou po amplifikaci sekvenovány. Případné mutace jsou detekovány porovnáním sekvence PCR produktu s referenční sekvencí. Vlivem mutací dochází buď k poruše syntézy β -globinového řetězce, jejímž důsledkem vzniká dědičné onemocnění krve β – talasemie nebo poruše struktury β – globinového řetězce, jejímž důsledkem vzniká dědičné onemocnění krve srpkovitá anémie a jiné strukturální hemoglobinopatie. Tato onemocnění jsou zárodečná a dědí se autosomálně recesivním způsobem.

Platnost postupu/faktory ovlivňující vyšetření

Protokol o převzetí primárního vzorku (žádanka) je nezbytný pro provedení detekce mutací *HBB*. Postup lze užít pro primární vzorky nesrážlivé periferní krve.

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

Informace lze získat na telefonním čísle: 221 977 306.

Primární a zpracované vzorky jsou na Oddělení genomiky značeny a uchovány dle platných interních předpisů.

Typy vzorků, které lze pro vyšetření použít

Primární vzorky:

- Periferní krev

Periferní krev se odebírá v množství 2 ml do protisrážlivého roztoku EDTA, případně ACD. Je nutné dostatečné množství jaderných buněk v krvi při odběru (min. $1,5 \times 10^9/l$ leukocytů, při nižší počtu leukocytů je třeba odebrat větší množství krve, cca 10 ml). Krev v EDTA je možno skladovat při 2-8 °C až 14 dní.

Zpracované vzorky:

- DNA izolovaná ze somatických jaderných buněk

Doba vydání výsledku

20 dnů od dodání primárního vzorku

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

VYŠETŘENÍ PŘÍTOMNOSTI MUTACÍ V GENECH *HBA1* A *HBA2* DETEKČNÍM KITEM A-GLOBIN STRIPASSAY

Princip

Metoda je založena na polymerázové řetězové reakci (PCR) a reverzní hybridizaci. Pomocí PCR amplifikujeme vybrané úseky genů *HBA1*, *HBA2* a přilehlých oblastí za použití biotinylovaných primerů. Při následné reverzní hybridizaci dochází ke specifické vazbě amplifikačních produktů na oligonukleotidové sondy imobilizované na testovacím stripu. Alelově specifická vazba je detekována díky navázaným biotinylovaným sekvencím pomocí streptavidin alkalické fosfatázy a barevného substrátu. Vlivem mutací dochází k poruše tvorby α -globinového řetězce, čímž je poškozena tvorba fetálního i dospělého hemoglobinu. Takto způsobené onemocnění krve, α -talasémie, je zárodečné a dědí se autosomálně recesivním způsobem.

Platnost postupu/faktory ovlivňující vyšetření

Protokol o převzetí primárního vzorku (žádanka) je nezbytný pro provedení detekce mutací *HBA1* a *HBA2*. Postup lze užít pro primární vzorky nesrážlivé periferní krve.

Informace lze získat na telefonním čísle: 221 977 306.

Primární a zpracované vzorky jsou na Oddělení genomiky značeny a uchovány dle platných interních předpisů.

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

Typy vzorků, které lze pro vyšetření použít

Primární vzorky:

- Periferní krev

Periferní krev se odebírá v množství 2 ml do protisrážlivého roztoku EDTA, případně ACD. Je nutné dostatečné množství jaderných buněk v krvi při odběru (min. $1,5 \times 10^9/l$ leukocytů, při nižší počtu leukocytů je třeba odebrat větší množství krve, cca 10 ml). Krev v EDTA je možno skladovat při 2-8 °C až 14 dní.

Zpracované vzorky:

- DNA izolovaná ze somatických jaderných buněk

Doba vydání výsledku

20 dnů od dodání primárního vzorku

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

VYŠETŘENÍ VARIANT LIDSKÉHO GENOMU METODOU MASIVNĚ PARALELNÍHO SEKVENOVÁNÍ – MYELOIDNÍ PANEL**Princip**

Metoda je založena na masivně paralelním sekvenování genů myeloidního panelu, kdy je během jediného experimentu zároveň sekvenováno velké množství vybraných úseků DNA. Ze vstupní DNA je připravena knihovna, která je složena z krátkých úseků zájmu ROI (Region of Interest) o délce několika stovek párů bází. Při přípravě knihovny jsou pro každý vzorek díky značení jednotlivých úseků pomocí index primerů připraveny unikátně značené fragmenty DNA. Tyto krátké fragmenty jsou během sekvenování čteny a zpracovány paralelně za vzniku velkého množství čtení, tzv. readů. Samotné určování bází DNA na přístrojích MiSeq spočívá v sekvenování syntézou využívající DNA polymerázu, která postupně syntetizuje vlákno komplementární k připravenému jednovláknovému templátu sekvenovaného fragmentu. Použité chemické sloučeniny zajistí, že po začlenění každé nové báze do vznikajícího řetězce DNA je přímo z místa začlenění uvolněn světelný fluorescenční signál, který je následně zachycen CCD (charge-coupled device) kamerou a zpracován přístrojem MiSeq. Následně jsou data z přístroje uložena na disk pro uchování NGS dat a vyhodnocena.

Citlivost metody je definována průměrnou hloubkou pokrytí (average depth of coverage), kdy se jedná o průměrný počet kopií vzorku DNA (readů) získaných sekvenováním. Vyšší pokrytí zajistí eliminaci chyb přístroje a zároveň zvýší citlivost metody. Zejména v případě cíleného resequencing (targeted resequencing) menšího počtu přesně definovaných úseků (panely genů) dosahuje hloubky pokrytí (depth of coverage) více než 1000x. Tím lze detekovat somatické mutace v komplexním biologickém vzorku s velkou citlivostí.

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

Platnost postupu/faktory ovlivňující vyšetření

Protokol o převzetí primárního vzorku (žádanka) je nezbytný pro provedení vyšetření variant liského genomu metodou masivně paralelního sekvenování – myeloidní panel. Postup lze užít pro primární vzorky nesrážlivé kostní dřeně a periferní krve.

Vyšetření vzorku je provedeno až po schválení vedoucí laboratoře RNDr. Moniky Belíčkové, PhD.

Informace lze získat na telefonním čísle: 221 977 305

Primární a zpracované vzorky jsou na Oddělení genomiky značeny a uchovány dle platných interních předpisů.

Typy vzorků, které lze pro vyšetření použít

Primární vzorky:

- 1 ml kostní dřeně v dřeňovém médiu nebo roztoku EDTA
- periferní krev (2-5 ml odebráno do roztoku EDTA)

Periferní krev se odebírá v množství 2–5 ml do protisrážlivého roztoku EDTA. Je nutné dostatečné množství jaderných buněk v krvi při odběru (min. $1,5 \times 10^9$ /l leukocytů, při nižším počtu leukocytů je třeba odebrat větší množství krve, cca 10 ml). Krev v EDTA je možno skladovat při 2-8 °C až 14 dní.

Zpracované vzorky:

- DNA izolovaná ze somatických jaderných buněk

Doba vydání výsledku

40 dní od zadání požadavku na vyšetření

Uvedený počet dní znamená počet pracovních dní od schválení vedoucí laboratoře a zahájení vyšetření primárního vzorku (odebraného dle této LP) s řádně vyplněnou žádankou na Oddělení genomiky do data uvolnění výsledku.

SOUVISEJÍCÍ DOKUMENTACE

NRL_02_SOP_14_01 Vyšetření množství transkriptů genu *WT1* pomocí real-time RT-PCR u pacientů s akutními leukémiemi a MDS, MPN

NRL_06_SOP_14_01 Vyšetření mutací v genu *HBB* (Hemoglobin beta) metodou přímého sekvenování

NRL_09_SOP_20_01 Vyšetření přítomnosti mutací v genu *NPM1* pomocí fragmentační analýzy

NRL_10_SOP_14_01 Vyšetření množství transkriptů mutovaného genu *NPM1* pomocí real-time RT-PCR u pacientů s AML

NRL_11_SOP_14_01 Vyšetření přítomnosti mutací v genu *CEBPA* metodou přímého sekvenování

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

NRL_12_SOP_16_01 VYŠETŘENÍ MUTACÍ V GENECH *HBA1* A *HBA2* DETEKČNÍM KITEM A-GLOBIN STRIPASSAY

NRL_13_SOP_18_01 VYŠETŘENÍ VARIANT LIDSKÉHO GENOMU METODOU MASIVNĚ PARALELNÍHO SEKVENOVÁNÍ – MYELOIDNÍ PANEL

13500_F_15_03 ŽÁDANKA

13500_F_20_01 ŽÁDANKA

13500_F_15_05–06 INFORMACE PRO PACIENTY

PŘÍLOHY

Příloha č. 1: F_SMJ_37 List změn a revizí

ROZDĚLOVNÍK

Číslo výtisku	Uložení
1	Portál SMK
2.	WEB ÚHKT