


Oddělení genomiky	
Laboratorní příručka	13500_LP_15_01 Verze A4
Výtisk č. 2	

Zpracovatel:	M. Vostrý	Podpis:	
Přezkoumal a schválil:	M. Belíčková	Podpis:	
Garant dokumentu:	M. Belíčková	Podpis:	
Platnost od:	18. 1. 2019	Uvolněno pro systém:	18. 1. 2019
Výtisk č.:	02	Počet stran:	15
Verze:	A4	Přijato do evidence:	18. 1. 2019

ROZDĚLOVNÍK


Uvedte seznam řízených výtisků a osoby, kterým jsou jednotlivé výtisky přiděleny

Č. výtisku	varianta	Držitel	Umístění	Podpis
01	elektronická*	M. Belíčková	M:\skupina\komplement_laboratori	
02	elektronická*	M. Belíčková	www.uhkt.cz	

*Elektronický výtisk dokumentu je na svém místě uložení (viz rozdělovník) veden v aktuální Platné verzi. Po výtiskování slouží pouze pro informativní účely.

Seznam změn a revizí řízeného dokumentu

Platnost od:	Nová verze	Obsah změny/ revize	Podpis garanta	Schválení revize
30.6.2016	A3	Beze změn		
10.05.2017	A3	Upřesnění informací v kapitolách 3.6, 10.5.1, 10.5.3, 10.6.3 na straně 5, 12, 13		
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		
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		
28.6.2019	A4	Změna technické vedoucí pro SOP02+10 – str. 3		
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		


Oddělení genomiky	
Laboratorní příručka Výtisk č. 2	13500_LP_15_01 Verze A4

OBSAH:

1	ÚVOD.....	2
2	VŠEOBECNÉ INFORMACE O LABORATOŘI	3
2.1	ZÁKLADNÍ INFORMACE O LABORATOŘI	3
2.2	ZAČLENĚNÍ LABORATOŘE V ORGANIZAČNÍ STRUKTUŘE ÚHKT A VEDENÍ LABORATOŘE.....	3
2.3	ZAMĚŘENÍ LABORATOŘE	3
2.4	ORGANIZACE LABORATOŘE, VNITŘNÍ ČLENĚNÍ A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	3
2.5	SPEKTRUM NABÍZENÝCH VYŠETŘENÍ	4
3	ODBĚR PRIMÁRNÍCH VZORKŮ.....	4
3.1	POKYNY PRO ZÍSKÁVÁNÍ VZORKŮ PACIENTA	4
3.2	POKYNY PRO PŘÍPRAVU PACIENTA.....	5
3.3	POKYNY PRO VYPLNĚNÍ ŽÁDANKY	5
3.4	INFORMOVANÝ SOUHLAS S VYŠETŘENÍM.....	5
3.5	POKYNY PRO ČINNOSTI PŘI ODBĚRU	5
3.6	DODÁNÍ VZORKŮ DO LABORATOŘE A PODMÍNKY TRANSPORTU	5
3.7	ZÁKLADNÍ INFORMACE K BEZPEČNOSTI PŘI PRÁCI SE VZORKY	6
4	ZPRACOVÁNÍ PRIMÁRNÍCH VZORKŮ PŘED DODÁNÍM DO LABORATOŘE	6
5	FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ VYŠETŘENÍ	6
6	KRITERIA PRO PŘIJETÍ A ODMÍTNUTÍ VZORKŮ	7
7	ODBORNÉ KONZULTACE	7
8	ŘEŠENÍ STÍŽNOSTÍ	7
9	OCHRANA INFORMACÍ.....	8
10	INFORMACE K NABÍZENÝM VYŠETŘENÍM	8
10.1	VYŠETŘENÍ MNOŽSTVÍ TRANSKRIPTU WT1	8
10.2	VYŠETŘENÍ MNOŽSTVÍ TRANSKRIPTU NPM1	9
10.3	VYŠETŘENÍ PŘÍTOMNOSTI MUTACÍ NPM1	10
10.4	VYŠETŘENÍ PŘÍTOMNOSTI MUTACÍ CEBPA (CCAAT/ENHANCER BINDING PROTEIN ALPHA).....	11
10.5	VYŠETŘENÍ MUTACÍ V GENU <i>HBB</i> (HEMOGLOBIN BETA) METODOU PŘÍMÉHO SEKVENOVÁNÍ	12
11	VYŘIZOVÁNÍ STÍŽNOSTÍ.....	14
12	SOUVISEJÍCÍ DOKUMENTACE	14
13	PŘÍLOHY.....	15

1 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	
Laboratorní příručka Nahrazuje stranu: 3 Ze dne: 28.6.2019 Výtisk č. 2	13500_LP_15_01 Verze A4

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

2 VŠEOBECNÉ INFORMACE O LABORATOŘI

2.1 Základní informace o laboratoři

Název organizace: Ústav hematologie a krevní transfuze
Adresa organizace: U Nemocnice 1, 128 20 Praha 2
web: www.uhkt.cz
IČO: 00023736

Název laboratoře: Oddělení genomiky
Součást Komplementu laboratoří ÚHKT
Adresa a umístění: U Nemocnice 1, Praha 2, PSČ 128 20,
Provozní doba pro příjem vzorků: 8.00–15:00 hodin (pracovní dny, pondělí až pátek)

2.2 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

2.3 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.

2.4 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)
Telefon: 221 977 231

technická vedoucí Mgr. Ela Cerovská
e-mail: ela.cerovska@uhkt.cz

Oddělení genomiky	
Laboratorní příručka Nahrazuje stranu: 4 Ze dne: 31.3.2020 Výtisk č. 2	13500_LP_15_01 Verze A4

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.vostry@uhkt.cz

Vyšetření *NPM1* a *CEBPA* (SOP 09, 11) technická vedoucí Ing. Eliška Stará
 Telefon: 221 977 231 e-mail: eliska.stara@uhkt.cz
Vendula.Kucerova@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.

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

2.5 Spektrum nabízených vyšetření


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

Oddělení genomiky nevyužívá služeb jiných laboratoří pro provádění nabízených vyšetření.

3 ODBĚR PRIMÁRNÍCH VZORKŮ

3.1 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).

Oddělení genomiky	
Laboratorní příručka Nahrazuje stranu: 5 Ze dne: 18.1.2019 Výtisk č. 2	13500_LP_15_01 Verze A4

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, pokud se týká SOP09 a SOP 11 do laboratoře č. 334 (Prognostické faktory AML a MDS) ve 2. patře budovy B ÚHK.

3.2 Pokyny pro přípravu pacienta

Odběr periferní krve ani kostní dřeně pro provádění 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.

3.3 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 vyšetřované osoby, včetně čísla zdravotní pojišťovny a číselného označení diagnóz, a údaj o datu a času odběru primárního vzorku.

3.4 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 provádění 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!!!

3.5 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

3.6 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

Oddělení genomiky	
Laboratorní příručka Nahrazuje stranu: ze dne: Výtisk č. 2	13500_LP_15_01 Verze A4

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

3.7 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.


4 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.

5 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 aHSCT a v průběhu chemoterapie) je žádoucí odebrat větší množství primárního vzorku příslušné tkáně, než je výše uvedeno.

Oddělení genomiky	
Laboratorní příručka Nahrazuje stranu: ze dne: Výtisk č. 2	13500_LP_15_01 Verze A4

6 KRITERIA 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 vyšetřena. 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.

7 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.

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

8 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.

Oddělení genomiky	
Laboratorní příručka Nahrazuje stranu: 8 Ze dne: 27.6.2018 Výtisk č. 2	13500_LP_15_01 Verze A4

9 OCHRANA INFORMACÍ

Všichni pracovníci NRL pro DNA diagnostiku 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.

10 INFORMACE K NABÍZENÝM VYŠETŘENÍM

10.1 VYŠETŘENÍ MNOŽSTVÍ TRANSKRIPTU WT1

10.1.1 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.

10.1.2 Platnost postupu/faktory ovlivňující vyšetření

Příjem vzorků na určení exprese genu WT1 není nutno objednávat. Odběry se provádějí podle následovně popsaneho 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 10^6 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.

Oddělení genomiky	
Laboratorní příručka Nahrazuje stranu: 9 Ze dne: 27.6.2018 Výtisk č. 2	13500_LP_15_01 Verze A4

10.1.3 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

10.1.4 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.

10.2 VYŠETŘENÍ MNOŽSTVÍ TRANSKRIPTU NPM1

10.2.1 Princip

Odběr primárních vzorků periferní krve a kostí dřeně se provádí pro účely získání RNA a následně cDNA a následné 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 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.

10.2.2 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 dřeni 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 10^6 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.

10.2.3 Typy vzorků, které lze pro vyšetření použít

Primární vzorky:

Oddělení genomiky	
Laboratorní příručka Nahrazuje stranu: 10 Ze dne: 31.3.2020 Výtisk č. 2	13500_LP_15_01 Verze A4

- 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

10.2.4 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.

10.3 VYŠETŘENÍ PŘÍTOMNOSTI MUTACÍ NPM1

10.3.1 Princip

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

10.3.2 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.


10.3.3 Typy vzorků, které lze pro vyšetření použít

Primární vzorky:

- 3 ml kostní dřeně v dřeňovém médiu nebo roztoku EDTA
- periferní krev (5-10 ml odebráno do roztoku EDTA)

Zpracované vzorky:

- Izolovaná celková DNA

Oddělení genomiky	
Laboratorní příručka Nahrazuje stranu: 11 Ze dne: 31.3.2020 Výtisk č. 2	13500_LP_15_01 Verze A4

10.3.4 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.

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

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

10.4.2 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.

10.4.3 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

10.4.4 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.

Oddělení genomiky	
Laboratorní příručka Nahrazuje stranu 12 Ze dne: 10.5.2017 Výtisk č. 2	13500_LP_15_01 Verze A4

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

10.5.1 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 strukturní hemoglobinopatie**. Tato onemocnění jsou zárodečná a dědí se autosomálně recesivním způsobem.

10.5.2 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.

Informace lze získat na telefonním čísle: 221 977 306.

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

10.5.3 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 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

10.5.4 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.

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

10.6.1 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.

Oddělení genomiky	
Laboratorní příručka Nahrazuje stranu 13 Ze dne: 18.1.2019 Výtisk č. 2	13500_LP_15_01 Verze A4

10.6.2. 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.

10.6.3. 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 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

10.6.4. 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.

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

10.7.1 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 resekvenování (targeted resequencing) menšího počtu přesně definovaných úseků (panelů genů) dosahuje hloubky pokrytí (depth of coverage) více než 1000x. Tím lze detekovat somatické mutace v komplexním biologickém vzorku s velkou citlivostí.

Oddělení genomiky	
Laboratorní příručka Nahrazuje stranu 14 Ze dne: 2.4.2020 Výtisk č. 2	13500_LP_15_01 Verze A4

10.7.2. 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.

10.7.3. Typy vzorků, které lze pro vyšetření použít

Primární vzorky:

- 1 ml kostní dřeně v dřevěném 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

10.7.4. 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.

11 VYŘIZOVÁNÍ STÍŽNOSTÍ


Stížnosti jsou řešeny v souladu s SŘ Vyřizování stížností a oznámení v ÚHKT. 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 se snažíme jednat s dostatečnou vstřícností.

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

12 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

Oddělení genomiky	
Laboratorní příručka Nahrazuje stranu 15 Ze dne: 31.3.2020 Výtisk č. 2	13500_LP_15_01 Verze A4

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

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

13 PŘÍLOHY

Příloha č. 1: F_SMJ_37 List změn a revizí