

Zpracovatel:	Mgr. H. Žižková, Ph.D.		
Přezkoumal a schválil:	doc. Mgr. Kateřina Machová Poláková, Ph.D.		
Garant dokumentu:	H. Žižková		
Platnost od:	01.04.2025		Hana Feixová
Výtisk č.:	2	Počet stran:	15
Verze:	A5	Přijato do evidence:	31.03.2025

Seznam změn a revizí řízeného dokumentu

Platnost od:	Verze	Obsah změny/ revize	Schválení revize
01.08.2021	A4	Doplnění seznamu nabízených vyšetření kap. 2.5, 10.2 a 10.4	Žižková
23.05.2022	A4	Formální změna názvu fúzního genu - BCR::ABL1, ostatní beze změn	Žižková
01.07.2023	A4	formální úpravy textu, ostatní beze změn	Žižková
22.07.2024	A4	formální úpravy textu, aktualizace podmínek transportu	Žižková
7.4.2025	A5	Zpracování požadavků normy ČSN EN ISO 15189:2023	

1 ÚVOD

Oddělení molekulární genetiky 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, kontinuálně obhajující nezávislé a nestranné posouzení odborné způsobilosti dle normy ČSN EN ISO 15189, jejíž aplikaci ověřuje Český institut pro akreditaci). Vyšetřovací metody v rozsahu akreditace jsou definovány přílohou Osvědčení o akreditaci v aktuální verzi. Tyto metody mají přiznaný flexibilní rozsah akreditace, o nichž je zadavatel informován prostřednictvím webových stránek (www.uhkt.cz). Zde je k dispozici aktuální Osvědčení o akreditaci, Seznam činnosti prováděných v rámci flexibilního rozsahu a dále v příloze Osvědčení o akreditaci je uveden stupeň volnosti každého vyšetření, v samostatném oddílu i upřesnění rozsahu akreditace.

K zajištění trvalé dostupnosti a integrity uchovaných vzorků a záznamů pacientů v případě uzavření, akvizici, nebo fúze laboratoře bude uzavřena dohoda s partnerskou společností, která převezme veškeré závazky související s uchováním vzorků biologického materiálu a papírové či elektronické dokumentace.


Hlavní odbornou činností Oddělení molekulární genetiky je molekulární monitorování minimální reziduální nemoci (MRN) u pacientů s onemocněním chronické myeloidní leukémie (CML) a Ph+ akutní lymfoblastové leukémie (ALL). Oddělení molekulární genetiky organizuje mezilaboratorní porovnávání zkoušek, slouží jako školící pracoviště, poskytuje konzultační služby a zabývá se i výzkumnou činností.

2 VŠEOBECNÉ INFORMACE O LABORATOŘI

2.1 Základní informace o laboratoři

Název organizace:	Ústav hematologie a krevní transfuze
Adresa organizace:	U Nemocnice 1/2094, 128 00 Praha 2
web:	www.uhkt.cz
IČO:	00023736
Název laboratoře:	Oddělení molekulární genetiky
Adresa a umístění:	U Nemocnice 2094/1, Praha 2, PSČ 128 00, budova C, 1. nadzemní podlaží, místnosti č. C 151–C 186 budova C, 1. podzemní podlaží, místnosti č. CS 17, CS 22, CS 29, CS 34
Vedoucí laboratoře:	doc. Mgr. Kateřina Machová Poláková, Ph.D.
Telefon:	221 977 181
FAX:	221 977 371
E-mail laboratoře:	katerina.machova@uhkt.cz

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

Laboratorní příručka	 Ústav hematologie a krevní transfuze
Oddělení molekulární genetiky	13100_LP_15_01

Provozní doba laboratoře: 8.00–16.00 hodin (pracovní dny, pondělí až pátek)

2.2 Začlenění laboratoře v organizační struktuře ÚHKT a vedení laboratoře

Oddělení molekulární genetiky je součástí Komplementu laboratoří ÚHKT.

2.3 Zaměření laboratoře

Laboratoř se zabývá molekulárně-genetickými analýzami vzorků krve, kostní dřeně, eventuelně jiného biologického materiálu pacientů převážně s chronickou myeloidní leukémií a Ph-positivními akutními leukémiemi. 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. Pracovníci procházejí systémem kontinuálního vzdělávání a podléhají doзору přiměřeného jejich zkušenostem a odpovědnostem. Vedení laboratoře odpovídá za vytváření a zajišťování takových technických zdrojů, které jsou nezbytné k zabezpečení požadované kvality prováděných vyšetření.

Vedoucí laboratoře: doc. Mgr. Kateřina Machová Poláková, Ph.D., Katerina.Machova@uhkt.cz

Technická vedoucí: Mgr. Hana Žižková, Ph.D., Hana.Zizkova@uhkt.cz

Zástupce technické vedoucí: Mgr. Václava Polívková, Ph.D., Vaclava.Polivkova@uhkt.cz

Telefon: 221 977 221, 221 977 397, 221 977 181

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 ověřením.

2.5 Spektrum nabízených vyšetření

Diagnostické vyšetření BCR::ABL1 (fusion gene: breakpoint cluster region – abelson) -

NRL_03_SOP_14_01


Vyšetření hladiny transkriptu BCR::ABL1 - NRL_04_SOP_14_01 a 13100_SOP_21_01

Vyšetření mutací v kinázové doméně BCR::ABL1 - NRL_04_SOP_14_01 a 13100_SOP_19_01

Vyšetření panelu 28 fúzních genů metodou real-time RT-PCR – 13100_SOP_21_02

Oddělení molekulární genetiky nevyužívá služeb jiných laboratoří pro provádění nabízených vyšetření.

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

Laboratorní příručka	 Ústav hematologie a krevní transfuze
Oddělení molekulární genetiky	13100_LP_15_01

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).

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. Vzorky s řádně vyplněnou žádankou (viz kapitola 3.2) musí být dodány na Oddělení molekulární genetiky, budova C, přízemí.

Pokyny pro přípravu pacienta

Odběr periferní krve ani kostní dřeně pro prováděná vyšetření nevyžaduje zvláštní přípravu pacienta před odběrem. Specifikace jsou uvedeny u jednotlivých vyšetření v kapitole INFORMACE K NABÍZENÝM VYŠETŘENÍM v části Platnost postupu/faktory ovlivňující vyšetření.

3.2 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.

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

3.3 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!!!

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

Laboratorní příručka	 Ustav hematologie a krevní transfuze
Oddělení molekulární genetiky	13100_LP_15_01

3.4 Odvolání informovaného souhlasu s uchováním vzorku

Zadavatel zodpovídá za předání informací laboratoři v případě, že dojde k odvolání informovaného souhlasu pacienta v souvislosti s uchováním vzorku.

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 rozlítí, 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. Není zapotřebí zvláštních opatření pro transport, vzorek se pouze nesmí vystavit zahřátí (např. vystavení slunci, držení v ruce apod.) a teplotám pod bodem mrazu. Přesahuje-li doba od náběru 3 hodiny, je vhodné jej transportovat při 4 °C. Při této teplotě je možné jej skladovat až 2 dny. 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 Informovaný souhlas s vyšetřením).

Vzorky jsou přijímány v provozní době laboratoře, a to v pracovní dny v čase 8.00–16.00 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

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. 195/2005 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.

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

Laboratorní příručka	 Ustav hematologie a krevní transfuze
Oddělení molekulární genetiky	13100_LP_15_01

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 rozlítí, 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. 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.

6 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

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

Laboratorní příručka	 Ústav hematologie a krevní transfuze
Oddělení molekulární genetiky	13100_LP_15_01

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.

7 ODBORNÉ KONZULTACE

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

Pracovníci Oddělení molekulární genetiky 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 vedení laboratoře. 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.

Vedoucí laboratoře je dostupný v laboratoři (tel. 221 977 181).


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.

Zaměstnanci oddělení jsou vázáni přísnou mlčenlivostí, ctí práva stěžovatelů a regulačních orgánů. Totožnost zdroje stížnosti zůstává vždy uchováвана v tajnosti a bez písemného souhlasu nemůže být

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

Laboratorní příručka	 Ústav hematologie a krevní transfuze
Oddělení molekulární genetiky	13100_LP_15_01

prolomena. Prošetřování a řešení stížností nesmí vést k diskriminačním opatřením. Řešení stížností provádějí nebo přezkoumávají a schvalují osoby, které nejsou zapojeny do dané stížnosti. Pokud to zdroje neumožní, nesmí žádný alternativní přístup ohrozit nestrannost.

9 OCHRANA INFORMACÍ

Všichni pracovníci laboratoře 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.
- Zaměstnanci pracují v souladu s nastavenými předpisy v oblasti GDPR.

10 INFORMACE K NABÍZENÝM VYŠETŘENÍM

Veškerý materiál, který je dodán do laboratoře, se zpracovává co možno nejdříve s přihlédnutím na pracovní postupy jednotlivých vyšetření. Výsledky se po kontrole odpovědným pracovníkem vydávají v písemné formě, na odděleních klinického úseku ÚHKT jsou k dispozici v elektronické formě, jakmile jsou kontrolujícím uvolněny v UNISu. V případě telefonického sdělení výsledku provede oprávněná osoba laboratoře záznam. Zaznamená datum, čas, kdo výsledek ohlásil a komu byl výsledek ohlášen.

V případě, že byl přijat vzorek nesplňující kritéria pro příjem vzorku ale jedná se o klinicky významný, kritický, nebo nenahraditelný biologický materiál), musí být ve výsledkovém listu po zvážení rizik pro bezpečnost pacienta uvedena tato skutečnost a případně doporučena opatrnost při interpretaci těchto výsledků, které mohou být ovlivněny.

Komplement laboratoří zpřístupní příslušné informace k nabízeným vyšetřením pacientovi a jakémukoli jinému poskytovateli zdravotních služeb na základě žádosti pacienta, nebo na žádost poskytovatele zdravotních služeb, který jedná jménem pacienta.

Laboratorní příručka	 <small>Ústav hematologie a krevní transfuze</small>
Oddělení molekulární genetiky	13100_LP_15_01

10.1 Diagnostické vyšetření BCR::ABL1

10.1.1 Princip

Chronická myeloidní leukémie je charakterizována chromozomální translokací t(9;22)(q34;q11), která na molekulární úrovni dává vznik fúznímu genu BCR::ABL1. Ke štěpení genu BCR dochází v několika oblastech. Nejčastěji je to oblast major (M-BCR), dále pak oblast minor BCR (m-BCR) a oblast mikro (μ -BCR).

Při diagnostickém vyšetření je třeba a) potvrdit přítomnost transkriptu BCR::ABL1, b) určit typ přestavby. To je nutné pro výběr primerů a prób, s jejichž použitím je v průběhu léčby hladina transkriptu fúzního genu BCR::ABL1 monitorována.

Metodu lze tedy použít k průkazu exprese variant fúzního genu BCR::ABL1 pro účely stanovení diagnózy.

10.1.2 Platnost postupu/faktory ovlivňující vyšetření

Postup lze užít pro primární vzorky nesrážlivé periferní krve nebo kostní dřeně a zpracované vzorky (lyzát leukocytů, celková RNA, cDNA).

Pro spolehlivou detekci transkriptu BCR::ABL1 je nutná intaktní RNA. Proto vzorky periferní krve (kostní dřeně) musí být odebírány a transportovány tak, aby nedocházelo k odumírání buněk a nebyly zahájeny degradační procesy (v chladu, nikoli zmrazeny). Vzorky jsou zpracovávány maximálně 3. den po odběru.

Vzorky periferní krve (kostní dřeně) musí být odebírány do protisrážlivého činidla (nejlépe EDTA nebo citrátové antikoagulans, např. ACD, není doporučen heparin!), které zabezpečuje dlouhou životaschopnost leukocytů a zamezuje degradaci vzorku. Nutným předpokladem úspěšného vyšetření primárního vzorku je přítomnost dostatečného množství živých buněk (leukocytů). V případě periferní krve je požadováno množství 5-10 ml, které by mělo zajistit nejméně 2×10^7 leukocytů pro analýzu.

Validní výsledek vyšetření není garantován, pokud byl vzorek odebrán po zahájení léčby.

Informace lze získat na telefonních číslech 221 977 221, 221 977 181, 221 977 397.

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

10.1.3 Typy vzorků, které lze pro vyšetření použít


Primární vzorky:

- Periferní krev
- Kostní dřeň

Zpracované vzorky:

- Lyzát leukocytů
- Celková RNA
- cDNA

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

Laboratorní příručka	 Ustav hematologie a krevní transfuze
Oddělení molekulární genetiky	13100_LP_15_01

10.1.4 Doba vydání výsledku

Běžná doba: 10 dní od dodání vzorku

Statim: 2 dny od dodání vzorku

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

10.2 Vyšetření hladiny transkriptu BCR::ABL1

10.2.1 Princip

Metoda se používá ke stanovení množství transkriptů BCR::ABL1 (varianty major; MBCR::ABL1 nebo varianty minor; mBCR::ABL1) v periferní krvi nebo kostní dřeni pacientů s chronickou myeloidní leukemií (CML) nebo Ph+ akutní lymfoblastickou leukemií (Ph+ ALL). U těchto pacientů je možno pomocí monitorování hladiny transkriptů BCR::ABL1 sledovat průběh onemocnění.

Pro vyšetření je používána metoda real-time RT-PCR (NRL_04_SOP_14_01) umožňující přesnou kvantifikaci amplifikačních produktů a to, jak fúzního genu BCR::ABL1, tak kontrolního genu, na který je množství produktu fúzního genu normalizováno. Výsledky jsou vydávány v mezinárodní stupnici (IS).

Dále je možné použít metodu digitální PCR umožňující velice citlivou a přesnou absolutní kvantifikaci, která je vhodná zejména pro monitorování pacientů v hlubokých molekulárních odpovědích, u kterých je vysazována léčba inhibitory tyrozinových kináz.

10.2.2 Platnost postupu/faktory ovlivňující vyšetření

Postup lze užít pro primární vzorky nesrážlivé periferní krve nebo kostní dřeni a zpracované vzorky (lyzát leukocytů, celková RNA, cDNA).

Pro spolehlivé vyšetření hladiny transkriptu BCR::ABL1 a určení mutací v kinázové doméně BCR::ABL1 je nutná intaktní RNA. Proto vzorky periferní krve (kostní dřeni) musí být odebírány a transportovány tak, aby nedocházelo k odumírání buněk a nebyly zahájeny degradační procesy (v chladu, nikoli zmrazeny).

Vzorky periferní krve (kostní dřeni) musí být odebírány do protisrážlivého činidla (nejlépe EDTA nebo citrátové antikoagulans, např. ACD, není doporučen heparin!), které zabezpečuje dlouhou životaschopnost leukocytů a zamezuje degradaci vzorku. Nutným předpokladem úspěšného vyšetření primárního vzorku je přítomnost dostatečného množství živých buněk (leukocytů). V případě periferní krve je požadováno množství 10 ml, které by mělo zajistit nejméně 2×10^7 leukocytů pro analýzu.

Informace lze získat na telefonních číslech 221 977 221, 221 977 397, 221 977 181.

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

10.2.3 Typy vzorků, které lze pro vyšetření použít

Primární vzorky:

- Periferní krev
- Kostní dřeň

Zpracované vzorky:

- Lyzát leukocytů
- Celková RNA
- cDNA

10.2.4 Doba vydání výsledku

Běžná doba: 20 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 do laboratoře do data uvolnění výsledku.

10.3 Vyšetření mutací v kinázové doméně BCR::ABL1

10.3.1 Princip

Metoda se používá ke zjištění bodových mutací v cDNA kódující BCR::ABL1, které vedou k aminokyselinové záměně v tyrozinkinázové doméně fúzního proteinu BCR::ABL1. Tyto mutace jsou jedním z nejvýznamnějších mechanismů rezistence k cílené léčbě pomocí tyrozinkinázových inhibitorů (TKI) u pacientů s chronickou myeloidní leukémií (CML), případně BCR::ABL1 pozitivní akutní lymfoblastickou leukémií (Ph+ALL) a akutní myeloidní leukémií (Ph+AML). Metoda umožňuje zjištění typu mutace a určení zastoupení BCR::ABL1 transkriptu s mutací z celkové hladiny BCR::ABL1 transkriptu. Detekce bodových mutací kinázové domény BCR::ABL1 je založena na sekvenční analýze úseku cDNA kódujícího kinázovou doménu BCR::ABL1 a porovnání získané sekvence s referenční sekvencí.

10.3.2 Platnost postupu/faktory ovlivňující vyšetření

Postup lze užít pro primární vzorky nesrážlivé periferní krve nebo kostní dřeně a zpracované vzorky (lyzát leukocytů, celková RNA, cDNA).

Pro spolehlivé vyšetření hladiny transkriptu BCR::ABL1 a určení mutací v kinázové doméně BCR::ABL1 je nutná intaktní RNA. Proto vzorky periferní krve (kostní dřeně) musí být odebírány a transportovány tak, aby nedocházelo k odumírání buněk a nebyly zahájeny degradační procesy (v chladu, nikoli zmrazeny).

Vzorky periferní krve (kostní dřeně) musí být odebírány do protisrážlivého činidla (nejlépe EDTA nebo citrátové antikoagulans, např. ACD, není doporučen heparin!), které zabezpečuje dlouhou životaschopnost leukocytů a zamezuje degradaci vzorku. Nutným předpokladem úspěšného vyšetření primárního vzorku je

přítomnost dostatečného množství živých buněk (leukocytů). V případě periferní krve je požadováno množství 10 ml, které by mělo zajistit nejméně 2×10^7 leukocytů pro analýzu. Pokud si zadavatel žádá současně vyšetření hladiny transkriptu BCR::ABL1 a vyšetření mutací v kinázové doméně BCR::ABL1, není pro toto vyšetření nutné dodání většího množství primárního vzorku.

Informace lze získat na telefonních číslech 221 977 221, 221 977 181.

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

10.3.3 Typy vzorků, které lze pro vyšetření použít

Primární vzorky:

- Periferní krev
- Kostní dřev

Zpracované vzorky:

- Lyzát leukocytů
- Celková RNA
- cDNA

10.3.4 Doba vydání výsledku

Běžná doba: 20 dní od dodání vzorku

Statim: 4 dny od dodání vzorku

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

10.4 Vyšetření panelu 28 fúzních genů metodou Real-time RT-PCR

10.4.1 Princip

Pro vyšetření je používán HemaVision®-28Q CE IVD kit, který je určený pro kvalitativní skrínk 28 chromozomálních translokací, které jsou asociovány s chronickou a akutní leukémií. Vyšetření se tedy používá k průkazu exprese fúzních genů uvedených níže pro účely stanovení diagnózy.

HemaVision®-28Q kit umožňuje detekci následujících 28 translokací (fúzí):

t(1;11) (p32;q23.3) (KMT2A-EPS15)

t(1;11) (q21;q23.3) (KMT2A-MLLT11)

t(1;19) (q23;p13) (TCF3-PBX1)

t(3;5) (q25;q34) (NPM1-MLF1)

t(3;21) (q26;q22) (RUNX1-MECOM)

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

t(4;11) (q21;q23.3) (KMT2A-AFF1)
t(5;12) (q33;p13) (ETV6-PDGFRB)
t(5;17) (q35;q21) (NPM1-RARA)
t(6;9) (p23;q34) (DEK-NUP214)
t(6;11) (q27;q23.3) (KMT2A-AFDN)
t(8;21) (q22;q22) (RUNX1-RUNX1T1)
t(9;9) (q34;q34) (SET-NUP214)
t(9;11) (p21.3;q23.3) (KMT2A-MLLT3)
t(9;12) (q34;p13) (ETV6-ABL1)
t(9;22) (q34;q11) (BCR-ABL1)
t(10;11) (p12;q23.3) (KMT2A-MLLT10)
t(11;17) (q23.3;q21) (KMT2A-MLLT6)
t(11;17) (q23;q21) (ZBTB16-RARA)
t(11;19) (q23.3;p13.1) (KMT2A-ELL)
t(11;19) (q23.3;p13.3) (KMT2A-MLLT1)
t(12;21) (p13;q22) (ETV6-RUNX1)
t(12;22) (p13;q11) (ETV6-MN1)
t(15;17) (q24;q21) (PML-RARA)
inv(16) (p13;q22) (CBFB-MYH11)
t(16;21) (p11;q22) (FUS-ERG)
t(17;19) (q22;p13) (TCF3-HLF)
t(X;11) (q13;q23.3) (KMT2A-FOXO4)

10.4.2 Platnost postupu/faktory ovlivňující vyšetření

Postup lze užít pro primární vzorky nesrážlivé periferní krve nebo kostní dřeně.

Pro spolehlivou detekci transkriptu BCR::ABL1 je nutná intaktní RNA. Proto vzorky periferní krve (kostní dřeně) musí být odebírány a transportovány tak, aby nedocházelo k odumírání buněk a nebyly zahájeny degradační procesy (v chladu, nikoli zmrazeny). Vzorky jsou zpracovávány maximálně 3. den po odběru.

Vzorky periferní krve (kostní dřeně) musí být odebírány do protisrážlivého činidla (nejlépe EDTA nebo citrátové antikoagulans, např. ACD, není doporučen heparin!), které zabezpečuje dlouhou životaschopnost

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

leukocytů a zamezuje degradaci vzorku. Nutným předpokladem úspěšného vyšetření primárního vzorku je přítomnost dostatečného množství živých buněk (leukocytů). V případě periferní krve je požadováno množství 5-10 ml, které by mělo zajistit nejméně 2×10^7 leukocytů pro analýzu.

Validní výsledek vyšetření není garantován, pokud byl vzorek odebrán po zahájení léčby.

Informace lze získat na telefonních číslech 221 977 221, 221 977 181, 221 977 397.

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

10.4.3 Typy vzorků, které lze pro vyšetření použít

Primární vzorky:

- Periferní krev
- Kostní dřeň

Zpracované vzorky:

- Lyzát leukocytů
- Celková RNA

10.4.4 Doba vydání výsledku

Běžná doba: 5 dní od dodání vzorku

Statim: 2 dny od dodání vzorku

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

11 ZBYTKOVÁ RIZIKA

Laboratoř si je vědoma existence zbytkových rizik, která se pokusila snížit na minimum. Zbytková rizika jsou dostupná v laboratoři na požádání, pokud je to relevantní v rámci daného vyšetření.

12 SOUVISEJÍCÍ DOKUMENTACE

PŘÍRUČKA KVALITY PRO KOMPLEMENT LABORATOŘÍ PRO ČSN EN ISO 15 189:

SMJ_PK_15_01

STANDARDNÍ OPERAČNÍ POSTUPY:

NRL_03_SOP_14_01

NRL_04_SOP_14_01

13100_SOP_19_01

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

13100_SOP_21_01

13100_SOP_21_02

Průvodka vzorku F_SMJ_88

Žádanky

13 Rozdělovník

Číslo výtisku	Uložení
1	Portál SMK
2.	WEB ÚHKT