


Národní referenční laboratoř pro DNA diagnostiku Laboratorní příručka	
Nahrazuje stranu: ze dne: Výtisk č.: 02	NRL_LP_14_01 Verze A1 Platnost od 1. 10. 2014


Zpracovatel:	M. Vraná	Podpis:	
Přezkoumal a schválil:	M. Vraná	Podpis:	
Garant dokumentu:	M. Vraná	Podpis:	
Platnost od:	1. 10. 2014	Uvolněno pro systém:	1. 10. 2014
Výtisk č.:	02	Počet stran:	24
Verze:	A1	Přijato do evidence:	1. 10. 2014

## ROZDĚLOVNÍK


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

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

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

Národní referenční laboratoř pro DNA diagnostiku Laboratorní příručka	 <b>ÚHK</b>
Nahrazuje stranu: ze dne: Výtisk č.: 02	NRL_LP_14_01 Verze A1 Platnost od 1. 10. 2014

<b>ROZDĚLOVNÍK .....</b>	<b>1</b>
<b>1 ÚVOD.....</b>	<b>3</b>
<b>2 VŠEOBECNÉ INFORMACE O LABORATOŘI .....</b>	<b>3</b>
2.1 ZÁKLADNÍ INFORMACE O LABORATOŘI .....	3
2.2 ZAČLENĚNÍ LABORATOŘE V ORGANIZAČNÍ STRUKTUŘE ÚHK A VEDENÍ LABORATOŘE.....	3
2.3 ZAMĚŘENÍ LABORATOŘE .....	3
2.4 ORGANIZACE LABORATOŘE, VNITŘNÍ ČLENĚNÍ A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ .....	4
2.5 SPEKTRUM NABÍZENÝCH VYŠETŘENÍ .....	4
<b>3 ODBĚR PRIMÁRNÍCH VZORKŮ.....</b>	<b>5</b>
3.1 POKYNY PRO ZÍSKÁVÁNÍ VZORKŮ PACIENTA.....	5
3.2 POKYNY PRO PŘÍPRAVU PACIENTA.....	5
3.3 POKYNY PRO VYPLNĚNÍ ŽÁDANKY .....	5
3.4 INFORMOVANÝ SOUHLAS S VYŠETŘENÍM.....	6
3.5 POKYNY PRO ČINNOSTI PŘI ODBĚRU .....	6
3.6 DODÁNÍ VZORKŮ DO LABORATOŘE A PODMÍNKY TRANSPORTU .....	6
3.7 ZÁKLADNÍ INFORMACE K BEZPEČNOSTI PŘI PRÁCI SE VZORKY .....	7
<b>4 ZPRACOVÁNÍ PRIMÁRNÍCH VZORKŮ PŘED DODÁNÍM DO LABORATOŘE .....</b>	<b>7</b>
<b>5 KRITERIA PRO PŘIJETÍ A ODMÍTNUTÍ VZORKŮ .....</b>	<b>7</b>
<b>6 ODBORNÉ KONZULTACE .....</b>	<b>8</b>
<b>7 OCHRANA INFORMACÍ.....</b>	<b>8</b>
<b>8 INFORMACE K NABÍZENÝM VYŠETŘENÍM .....</b>	<b>8</b>
8.1 VYŠETŘENÍ BUNĚČNÉHO CHIMERISMU PO ALOGENNÍ HSCT .....	8
8.2 VYŠETŘENÍ MNOŽSTVÍ TRANSKRIPTU WT1 .....	10
8.3 VYŠETŘENÍ MNOŽSTVÍ TRANSKRIPTU NPM1 .....	11
8.4 DIAGNOSTICKÉ VYŠETŘENÍ BCR-ABL .....	12
8.5 VYŠETŘENÍ MNOŽSTVÍ TRANSKRIPTU BCR-ABL.....	13
8.6 VYŠETŘENÍ MUTACÍ V KINÁZOVÉ DOMÉNĚ BCR-ABL .....	13
8.7 VYŠETŘENÍ GENOTYPU HLA (HUMAN LEUKOCYTE ANTIGENS) PRO POTŘEBY HSCT .....	14
8.8 VYŠETŘENÍ GENOTYPU HLA PRO VAZBU S CHOROBAMI .....	18
8.9 VYŠETŘENÍ GENOTYPU HLA PRO FARMAKOGENETIKU .....	20
8.10 VYŠETŘENÍ PŘÍTOMNOSTI MUTACÍ NPM1 .....	21
8.11 VYŠETŘENÍ PŘÍTOMNOSTI MUTACÍ CEBPA (CCAAT/ENHANCER BINDING PROTEIN ALPHA) .....	22
8.12 VYŠETŘENÍ MUTACÍ V GENU HBB (HEMOGLOBIN BETA) METODOU PŘÍMÉHO SEKVENOVÁNÍ .....	23
<b>9 VYŘIZOVÁNÍ STÍŽNOSTÍ.....</b>	<b>23</b>
<b>10 SOUVISEJÍCÍ DOKUMENTACE .....</b>	<b>23</b>
<b>11 PŘÍLOHY.....</b>	<b>24</b>

Národní referenční laboratoř pro DNA diagnostiku Laboratorní příručka	
Nahrazuje stranu: ze dne: Výtisk č.: 02	NRL_LP_14_01 Verze A1 Platnost od 1. 10. 2014

## 1 ÚVOD

Národní referenční laboratoř pro DNA diagnostiku je zkušební laboratoř č. 1345, akreditovaná Českým institutem pro akreditaci, o.p.s. (ČIA) podle ČSN EN ISO/IEC 17025 a zdravotnická laboratoř č. 8001, akreditovaná ČIA podle ČSN EN ISO 15189.

Hlavní odbornou činností NRL pro DNA diagnostiku je molekulární diagnostika a monitorování vybraných onkohematologických onemocnění a určování genotypů pro účely transplantace hematopoetických kmenových buněk a identifikaci osob. NRL pro DNA diagnostiku je referenční laboratoř v oblasti onkogenetiky, zajišťující koordinaci a výměnu informací s ostatními DNA laboratořemi v ČR, poskytuje konzultační služby a organizuje mezilaboratorní porovnávání zkoušek.

NRL pro DNA diagnostiku 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:	Národní referenční laboratoř pro DNA diagnostiku
Adresa a umístění:	U Nemocnice 1, Praha 2, PSČ 128 20, budova C, 1. nadzemní podlaží, místnosti č. C 151- C 186 budova C, 1. podzemní podlaží, místnosti č. CS 22, CS 29, CS35 budova B, 3. nadzemní podlaží, místnosti č. B 364, B365
Vedoucí laboratoře:	RNDr. Marie Dobrovolná
Telefon:	221 977 484
FAX:	221 977 371
E-mail laboratoře:	marie.dobrovolna@uhkt.cz
Provozní doba laboratoře:	8.00–16.30 hodin (pracovní dny, pondělí až pátek)

### 2.2 Začlenění laboratoře v organizační struktuře ÚHKT a vedení laboratoře


NRL pro DNA diagnostiku je součástí Výzkumného úseku ÚHKT. NRL pro DNA diagnostiku tvoří oddělení molekulární genetiky a oddělení HLA analýzy.

Vedení laboratoře:

Dobrovolná Marie, RNDr.	vedoucí laboratoře
Vraná Milena, Ing.	zástupkyně vedoucího laboratoře, manažerka kvality
Beličková Monika, Mgr.	metroložka
techničti vedoucí pracovních skupin (viz kapitola 2.4)	

### 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 řetězové polymerázové 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

Národní referenční laboratoř pro DNA diagnostiku Laboratorní příručka	
Nahrazuje stranu: ze dne: Výtisk č.: 02	NRL_LP_14_01 Verze A1 Platnost od 1. 10. 2014

onemocnění, určování genotypů hlavního histokompatibilitního systému člověka (HLA) pro účely transplantace hematopoetických kmenových buněk, pro predispozici k vybraným autoimunitním onemocněním a pro farmakogenetiku. Rovněž výzkumná činnost se týká převážně 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 členem vedení laboratoře (viz kapitola 2.2) a je zodpovědný za činnost své pracovní skupiny po odborné i organizační stránce.

Pracovníci procházejí systémem kontinuálního vzdělávání a podléhají dozoru 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:

**Vyšetření chimerismu po HSCT (SOP 01, 07)** technická vedoucí Mgr. Hana Čechová  
Telefon: 221 977 308 e-mail: hana.cechova@uhkt.cz

**Kvantifikace WT1 a NPM1 (SOP 02, 10)** technický vedoucí Mgr. Jaroslav Polák  
Telefon: 221 977 484 e-mail: Jaroslav.polak@uhkt.cz

**Vyšetření a kvantifikace BCR-ABL, detekce mutací v kinázové doméně BCR-ABL (SOP 03, 04)**  
technická vedoucí Mgr. Karla Zemanová. Ph.D.  
Telefon: 221 977 221, 221 977 181 e-mail: karla.zemanova@uhkt.cz

**Vyšetření genotypu HLA (SOP 05)** technická vedoucí RNDr. Marie Dobrovolná  
Telefon: 221 977 484 e-mail: [marie.dobrovolna@uhkt.cz](mailto:marie.dobrovolna@uhkt.cz)

**Vyšetření mutací v genu HBB (SOP 06) a klonality** technická vedoucí Mgr. Monika Belíčková  
Telefon: 221 977 306 e-mail: [monika.belickova@uhkt.cz](mailto:monika.belickova@uhkt.cz)

**Vyšetření NPM1 a CEBPA (SOP 09, 11)** technický vedoucí Ing. Ota Fuchs  
Telefon: 221 977512 nebo 221977313 e-mail: [ota.fuchs@uhkt.cz](mailto:ota.fuchs@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 bb. chimerismu po alogenní HSCT (transplantaci hematopoetických kmenových buněk) SOP 01, 07**

**Vyšetření množství transkriptu WT1 (wilms tumor 1) SOP 02**

**Vyšetření množství transkriptu NPM1 (nukleofosmin 1) SOP 10**

**Diagnostické vyšetření BCR-ABL (fusion gene: breakpoint cluster region – abelson) SOP 03**

**Vyšetření množství transkriptu BCR-ABL SOP 04**

Národní referenční laboratoř pro DNA diagnostiku Laboratorní příručka	
Nahrazuje stranu: ze dne: Výtisk č.: 02	NRL_LP_14_01 Verze A1 Platnost od 1. 10. 2014

<b>Vyšetření mutací v kinázové doméně BCR-ABL</b>	<b>SOP 04</b>
<b>Vyšetření genotypu HLA (human leukocyte antigens) pro potřeby HSCT (hematopoietic stem cell transplantation)</b>	<b>SOP 05</b>
<b>Vyšetření genotypu HLA pro vazbu s chorobami</b>	<b>SOP 05</b>
<b>Vyšetření genotypu HLA pro farmakogenetiku</b>	<b>SOP 05</b>
<b>Vyšetření přítomnosti mutací v genu NPM1 (nukleophosmin 1)</b>	<b>SOP 09</b>
<b>Vyšetření přítomnosti mutací CEBPA (CCAAT/enhancer binding protein alpha)</b>	<b>SOP 11</b>
<b>Vyšetření klonality pomocí STR (Short Tandem Repeats) polymorfismu v genu HUMARA (androgen receptorový gen) *</b>	
<b>Vyšetření mutací v genu HBB (hemoglobin beta)*</b>	<b>SOP 06</b>

\*neakreditované vyšetření

NRL pro DNA diagnostiku 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).**

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

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

Každá zkumavka se vzorkem musí být náležitě označena identifikačními údaji vyšetřované osoby, datem a časem odběru. Vzorky s řádně vyplněnou žádankou (viz kapitola 3.3) musí být dodány do NRL pro DNA diagnostiku, budova C, přízemí, pokud se týká SOP9 a SOP 11 do laboratoře č. 334 (Prognostické faktory AML a MDS) ve 2.patře budovy B ÚHKT.


#### 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](http://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

Národní referenční laboratoř pro DNA diagnostiku Laboratorní příručka	
Nahrazuje stranu: ze dne: Výtisk č.: 02	NRL_LP_14_01 Verze A1 Platnost od 1. 10. 2014

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 prováděná vyšetření je možné najít na internetových stránkách [www.uhkt.cz](http://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 žadance přiložen informovaný souhlas pacienta nebo jeho kopie, je třeba vyznačit na žadance 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 ŽADANCE 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 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.). 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.


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

Ke každému dodanému vzorku je třeba dodat řádně vyplněnou žádanku o vyšetření (viz kapitola 33).

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

Národní referenční laboratoř pro DNA diagnostiku Laboratorní příručka	
Nahrazuje stranu: ze dne: Výtisk č.: 02	NRL_LP_14_01 Verze A1 Platnost od 1. 10. 2014

### 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.

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](http://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 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.



Národní referenční laboratoř pro DNA diagnostiku Laboratorní příručka	
Nahrazuje stranu: ze dne: Výtisk č.: 02	NRL_LP_14_01 Verze A1 Platnost od 1. 10. 2014

## 6 ODBORNÉ KONZULTACE

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

Pracovníci NRL pro DNA diagnostiku 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. 221 977 484).

## 7 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 ÚHK. 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.

## 8 INFORMACE K NABÍZENÝM VYŠETŘENÍM

### 8.1 VYŠETŘENÍ BUNĚČNÉHO CHIMERISMU PO ALOGENNÍ HSCT

#### 8.1.1 Princip

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


#### 8.1.2 Platnost postupu/faktory ovlivňující vyšetření

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

- **Vyšetření informativity**

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



Národní referenční laboratoř pro DNA diagnostiku Laboratorní příručka	
Nahrazuje stranu: ze dne: Výtisk č.: 02	NRL_LP_14_01 Verze A1 Platnost od 1. 10. 2014

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

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

- **Monitoring chimerizmu u pacienta po aHSCT**

Z principu vyšetření buněčného chimerizmu po HSCT vyplývá jeho velmi variabilní charakter.

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

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

### 8.1.3 Typy vzorků, které lze pro vyšetření použít

Primární vzorky:

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

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


Zpracované vzorky:

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

### 8.1.4 Doba vydání výsledku

**Běžná doba:** 10 pracovních dnů od dodání vzorku

**Statim:** 3 pracovní dny od dodání vzorku

Národní referenční laboratoř pro DNA diagnostiku Laboratorní příručka	
Nahrazuje stranu: ze dne: Výtisk č.: 02	NRL_LP_14_01 Verze A1 Platnost od 1. 10. 2014

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

## 8.2 VYŠETŘENÍ MNOŽSTVÍ TRANSKRIPTU WT1

### 8.2.1 Princip

Odběr primárních vzorků periferní krve a kostí dřeně se provádí pro účely získání RNA a následně cDNA a následné stanovení hladiny exprese 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 preemtivní léčbu.

### 8.2.2 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. Po té 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 telefonech 221 977- 484, -231, ev.- 350 (interní linky ÚHK)

Lyzáty buněk, vyizolovaná RNA a přepsaná cDNA vyizolovaná z primárních vzorků jsou v NRL pro DNA diagnostiku 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.

### 8.2.3 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

### 8.2.4 Doba vydání výsledku

20 dní

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

Národní referenční laboratoř pro DNA diagnostiku Laboratorní příručka	
Nahrazuje stranu: ze dne: Výtisk č.: 02	NRL_LP_14_01 Verze A1 Platnost od 1. 10. 2014

## 8.3 VYŠETŘENÍ MNOŽSTVÍ TRANSKRIPTU NPM1

### 8.3.1 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 detekována 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 byl prokázána vhodnost sledování exprese mutovaného genu NPM1 po transplantaci, kde opět nárůst exprese mutovaného genu NPM1 nad nulovou hodnotu indikuje relaps onemocnění umožňující preemtivní léčbu.

### 8.3.2 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. Po té 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 dřeně 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 221 977- 484, -231, ev.- 350 (interní linky ÚHK)

Lyzáty buněk, vyzolovaná RNA a přepsaná cDNA vyzolovaná z primárních vzorků jsou v NRL pro DNA diagnostiku značeny a uchovány dle platných interních předpisů. Doba chování těchto vzorků je neomezená. Pouze RNA je více citlivá na degradaci. Vyšetření lze z těchto vzorků případně opakovat.

### 8.3.3 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

### 8.3.4 Doba vydání výsledku

8.3.5 20 dní

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

Národní referenční laboratoř pro DNA diagnostiku Laboratorní příručka	
Nahrazuje stranu: ze dne: Výtisk č.: 02	NRL_LP_14_01 Verze A1 Platnost od 1. 10. 2014

## 8.4 DIAGNOSTICKÉ VYŠETŘENÍ BCR-ABL

### 8.4.1 Princip

Chronická myeloidní leukemie je charakterizována chromozomální translokací t(9;22)(q34;q11), která na molekulární úrovni dává vznik fúznímu genu BCR-ABL. 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 ( $\mu$ -BCR)

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

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

### 8.4.2 Platnost postupu/faktory ovlivňující vyšetření

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

Pro spolehlivou detekci transkriptu BCR-ABL je nutná intaktní RNA. Proto vzorky periferní krve (kostní dřeně) musí být odebírány a transportovány tak, aby nedocházelo k odumírání buněk a nebyly zahájeny degrační 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  $2 \times 10^7$  leukocytů pro analýzu.

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

### 8.4.3 Typy vzorků, které lze pro vyšetření použít

Primární vzorky:

- Periferní krev
- Kostní dřeň


Zpracované vzorky:

- Lyzát leukocytů
- Celková RNA
- cDNA

### 8.4.4 Doba vydání výsledku

Doba odezvy u diagnostického vyšetření je 10 pracovních dnů od dodání vzorku, u statimového vyšetření jsou to 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 NRL do data uvolnění výsledku.

Národní referenční laboratoř pro DNA diagnostiku Laboratorní příručka	
Nahrazuje stranu: ze dne: Výtisk č.: 02	NRL_LP_14_01 Verze A1 Platnost od 1. 10. 2014

## 8.5 VYŠETŘENÍ MNOŽSTVÍ TRANSKRIPTU BCR-ABL

### 8.5.1 Princip

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

Real-time PCR umožňuje přesnou kvantifikaci amplifikačních produktů jak fúzního genu BCR-ABL, tak kontrolního genu, na který je množství produktu fúzního genu normalizováno.

### 8.5.2 Platnost postupu/faktory ovlivňující vyšetření

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

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

Vzorky periferní krve (kostní dřeň) 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  $2 \times 10^7$  leukocytů pro analýzu.

### 8.5.3 Typy vzorků, které lze pro vyšetření použít

Primární vzorky:

- Periferní krev
- Kostní dřeň

Zpracované vzorky:

- Lyzát leukocytů
- Celková RNA
- cDNA

### 8.5.4 Doba vydání výsledku


Běžná doba 20 dnů, statim 3 dny

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

## 8.6 VYŠETŘENÍ MUTACÍ V KINÁZOVÉ DOMÉNĚ BCR-ABL

### 8.6.1 Princip

Metoda se používá ke zjištění bodových mutací v cDNA kódující BCR-ABL, které vedou k aminokyselinové záměně v tyrozinkinázové doméně fúzního proteinu BCR-ABL. Tyto mutace jsou jedním z nejvýznamnějších mechanismů rezistence k cílené léčbě pomocí tyrozinkinázových inhibitorů (TKI) u pacientů s chronickou myeloidní leukémií (CML), případně BCR-ABL pozitivní akutní lymfoblastickou leukémií (Ph+ALL) a akutní myeloidní leukémií (Ph+AML). Metoda umožňuje zjištění typu mutace a určení zastoupení BCR-ABL

Národní referenční laboratoř pro DNA diagnostiku Laboratorní příručka	
Nahrazuje stranu: ze dne: Výtisk č.: 02	NRL_LP_14_01 Verze A1 Platnost od 1. 10. 2014

transkriptu s mutací z celkové hladiny BCR-ABL transkriptu. Detekce bodových mutací kinázové domény BCR-ABL je založena na sekvenční analýze úseku cDNA kódujícího kinázovou doménu BCR-ABL a porovnání získané sekvence s referenční sekvencí.

### 8.6.2 Platnost postupu/faktory ovlivňující vyšetření

Postup lze užít pro primární vzorky nesrážlivé periferní krve nebo kostní dřeň,

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

Vzorky periferní krve (kostní dřeň) musí být odebrány 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  $2 \times 10^7$  leukocytů pro analýzu. Pokud si zadavatel žádá současně vyšetření hladiny BCR-ABL a vyšetření mutací v kinázové doméně BCR-ABL, není pro toto vyšetření nutné dodání většího množství primárního vzorku.

### 8.6.3 Typy vzorků, které lze pro vyšetření použít

Primární vzorky:

- Periferní krev
- Kostní dřeň

Zpracované vzorky:

- Lyzát leukocytů
- Celková RNA
- cDNA

### 8.6.4 Doba vydání výsledku

Běžná doba 20 dnů, statim 4 dny

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

## 8.7 VYŠETŘENÍ GENOTYPU HLA (HUMAN LEUKOCYTE ANTIGENS) PRO POTŘEBY HSCT


### 8.7.1 Princip

Odběr primárních vzorků se provádí pro účely získání DNA a stanovení přesného genotypu HLA pro potřebu stanovení shody mezi pacientem indikovaným k transplantaci hematopoetických kmenových buněk a jeho dárce.

### 8.7.2 Platnost postupu/faktory ovlivňující vyšetření

**Příjem vzorků na genotypizaci není nutno objednávat. Pro provedení genotypizace je požadována indikace k HSCT.**

Bez této indikace bude provedena pouze izolace DNA. Požadovaná genotypizace bude z této DNA provedena bezprostředně po indikaci k HSCT na základě informace z indikačního semináře ÚHK (u dospělých

Národní referenční laboratoř pro DNA diagnostiku Laboratorní příručka	
Nahrazuje stranu: ze dne: Výtisk č.: 02	NRL_LP_14_01 Verze A1 Platnost od 1. 10. 2014

pacientů). Indikace k HSCT pro dětské pacienty je v kompetenci hlavního transplantologa transplantací jednotky KDHO Motol.

Informace lze získat na telefonech 221 977- 307, -397, ev.- 484 (interní linky ÚHK)  
Vyšetření nelze provést u pacientů po transplantaci hematopoetických kmenových buněk nebo po infuzi dárcovských lymfocytů.

DNA vyzolovaná z primárních vzorků je v NRL pro DNA diagnostiku značena a uchována dle platných interních předpisů. Doba jejího uchování je neomezená. Tuto DNA lze po kontrole kvality (provedené interně) použít pro další genotypizaci HLA vyžádanou zadavatelem. Požadavky na taková vyšetření jsou přijímána na novém Protokolu o převzetí primárního vzorku (žádanka), na základě rozhodnutí interní indikační komise, případně telefonicky od hlavních zadavatelů (transplantologů ÚHK a KDHO Motol, transplantačního koordinátora a koordinátorů registru nepřibuzných dárců)

### 8.7.3 Typy vzorků, které lze pro vyšetření použít

Primární vzorky:

- Periferní krev
- Kostní dřeň
- Stěry bukalních sliznic

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 10 dní.

Zpracované vzorky:

- Fibroblasty kultivované z kožní biopsie
- DNA izolovaná ze somatických jaderných buněk
- DNA izolovaná z buněčných frakcí

### 8.7.4 Odběry u pacientů s nedostatečným množstvím jaderných buněk v krvi

U pacientů s nedostatečným množstvím jaderných buněk v krvi, kde není možné provést izolaci DNA standardním způsobem, je na vyžádání lékaře možno provést stěry bukalní sliznice nebo kultivaci fibroblastů z kožní biopsie.

Stěry bukalní sliznice provádějí pověřeni pracovníci NRL na žádost indikujícího lékaře. Toto vyšetření je třeba předem objednat v NRL na telefonní lince 221977484 nebo 221977397 nebo 221977307. Stěry jsou prováděny v dohodnutém termínu u lůžka pacienta.

Kultivace fibroblastů je prováděna ve spolupráci s Oddělení lékařské cytogenetiky ÚBLG FN Motol. Toto vyšetření je třeba předem telefonicky objednat u vedoucího laboratoře kultivací, kontakt viz níže. Indikující lékař současně informuje NRL pro DNA diagnostiku o požadavku kultivace.

Kultivace zajišťuje: RNDr. Daniel Chudoba


Oddělení lékařské cytogenetiky

ÚBLG FN Motol

e-mail: daniel.chudoba@lfmotol.cuni.cz

tel. 22443- I. 3539, I. 3560



Národní referenční laboratoř pro DNA diagnostiku Laboratorní příručka	
Nahrazuje stranu: ze dne: Výtisk č.: 02	NRL_LP_14_01 Verze A1 Platnost od 1. 10. 2014

### Pokyny pro provedení kožní biopsie pro dlouhodobou kultivaci fibroblastů

- místo odběru musí být desinfikováno pouze alkoholem, protože desinfekční prostředky obsahující jód znemožňují úspěšnou kultivaci
- odběr je nutné provést po vyprchání alkoholu
- odběr je nutné provést za absolutně sterilních podmínek, neboť kůže je následně dlouhodobě kultivována po několik týdnů a i ta nejmenší kontaminace se v tkáňové kultuře pomnoží a dojde ke znehodnocení kultivovaného materiálu
- je vhodné odebrat nejméně 2 x 5 mm kůže bez podkoží, následné vyplavování tuku znehodnocuje kultivační médium a znesnadňuje kultivaci
- odebraný materiál je třeba neprodleně přemístit do transportní nádoby s kultivačním médiem (kultivační plastové lahvičky 25 cm<sup>2</sup> s 10 ml transportního media GPM 3E)
- nikdy se nesmí takto odebraná tkáň transportovat nasucho a ani použití PBS nebo fyziologického roztoku není vhodné
- nádobka s odebraným materiálem by měla být neprodleně transportována do FN Motol, ÚBLG za podmínek, kdy není transportovaný materiál vystaven mrazu nebo vysoké teplotě, doporučujeme používat polystyrénové transportní tašky
- pokud nelze materiál odeslat neprodleně, je nutné uchovávat po dobu před odesláním při teplotě 4 – 8 st. C, nesmí být zmrazen, buňky by byly nevratně poškozeny a kultivace by byla neúspěšná
- příjem materiálu do laboratoře: po - pá: 7:30 - 14:30 h
- vzhledem k délce kultivace (2 týdny - 3 měsíce), která je třeba k namnožení dostatečného množství buněk pro následná vyšetření, je třeba provést odběr v dostatečném předstihu před plánovaným výkonem

#### 8.7.5 Postup HLA vyšetření pro alloHSCT

##### při diagnóze/indikaci k HSCT

1. odběr pacienta: **1x krev do EDTA (2 ml)**

2. nezávislý odběr pacienta: **1x krev do EDTA (2ml)**

*•Oba odběry mohou být v případě potřeby provedeny v jeden den, ale s označením času odběru na zkumavce i protokolu, respektive jasným odlišením obou odběrů (pravá ruka, levá ruka,...).*

Současně vždy odběr **přímých** pokrevních příbuzných:


*(sourozenci, rodiče, případně děti pacienta)*

**2x krev do EDTA (2 ml)**

*•Oba odběry mohou být v případě potřeby provedeny v jeden den, ale s označením času odběru na zkumavce i protokolu, respektive jasným odlišením obou odběrů (pravá ruka, levá ruka,...).*

**- odběr lze po dohodě provést mimo transplantační centra, v místě bydliště příbuzných, musí být dodrženy výše uvedené podmínky odběru a dodání vzorků, organizace takových odběrů je v kompetenci ošetřujícího lékaře daného pacienta**

Z odběrů je provedena izolace DNA a po indikaci k HSCT genotypizace HLA. Standardně je v tomto kroku u pacienta, jeho rodičů a všech sourozenců provedena typizace HLA-A, -B, -DRB1 na úrovni určení alelických

Národní referenční laboratoř pro DNA diagnostiku Laboratorní příručka	
Nahrazuje stranu: ze dne: Výtisk č.: 02	NRL_LP_14_01 Verze A1 Platnost od 1. 10. 2014

skupin (low resolution) a stanovení haplotypů. Při nejasnostech v určení haplotypů je provedena i genotypizace na úrovni určení jednotlivých alel (high resolution).

Ze všech vyšetření v tomto kroku je vydán souhrnný výsledek včetně určení HLA haplotypů pacienta, definování HLA shody s vyšetřenými příbuznými, případně doporučení pro další VYŠETŘENÍ.

Tyto výsledky jsou zasílány zadavateli a ostatním kompetentním osobám účastnícím se procesu vyhledávání dárců dle rozdělovníku.

Kompetentními osobami v procesu vyhledávání dárců jsou:

Dr. Vítek – hlavní transplantolog ÚHK

Prof. Sedláček – hlavní transplantolog KDHO FN Motol

Pí Waldmannová – transplantační koordinátor ÚHK

Mgr. Kuříková – pražský registr nepříbuzných dárců (+ komunikace se zahraničními registry)

Dr. Pittrová – plzeňský registr nepříbuzných dárců

#### **po určení shody/neshody s přímými pokrevními příbuznými**

Nalezen HLA shodný příbuzný dárc → odběry pro konfirmační vyšetření

*Pacient:* **bez odběru**

– vyšetření je provedeno z DNA z dříve dodaného 2. nezávislého odběru pacienta (viz výše)

*Vybraný dárc:* **druhý náběr krve do EDTA** (pokud nebylo provedeno dříve)

Konfirmace je provedena genotypizací na úrovni určení alelických skupin (low resolution) v lokusech HLA-A, -B, -Cw, -DRB1, -DQB1.

Nenalezen vhodný dárc:

→ **hledání v širší rodině (nutná součinnost s oddělením HLA analýzy)**

– Dle dohody na indikačním semináři na základě klinického stavu pacienta a jeho HLA fenotypu/genotypu


*Vybraní dárci:* **1x krev do EDTA (2 ml)**

U dárců je provedena genotypizace HLA-A, -B, -DRB1 na úrovni určení alelických skupin (low resolution), u dárců shodných s pacientem pokračuje typizace jako u dárců nepříbuzných.

→ **nebo indikace k nepříbuzenské alloHSCT**

– *Doplnění vyšetření HLA genotypu na úrovni high resolution z dříve dodaných vzorků pacienta provádí NRL na základě rozhodnutí z indikačního semináře.*

– *Nahlédnutí do registru, výběr a objednání nepříbuzných dárců pro konfirmační vyšetření provádí transplantační koordinátor v součinnosti s Dr. Vítkem/ Doc. Sedláčkem na základě výsledků HLA genotypizace pacienta dodaných z NRL.*

Národní referenční laboratoř pro DNA diagnostiku Laboratorní příručka	
Nahrazuje stranu: ze dne: Výtisk č.: 02	NRL_LP_14_01 Verze A1 Platnost od 1. 10. 2014

### Po nalezení alternativního dárce

Nalezen dárce v širší rodině → odběry pro konfirmační vyšetření:

*Pacient:*           **bez odběru**

–vyšetření je provedeno z DNA z dříve dodaného 2. nezávislého odběru pacienta (viz výše)

*Vybraný dárce:* **druhý náběr krve do EDTA** (pokud nebylo provedeno dříve)

Nalezen vhodný nepříbuzný dárce dle výpisu z registru → odběry pro konfirmační vyšetření:

*Pacient:*           **bez odběru**

–vyšetření je provedeno z DNA z dříve dodaného 2. nezávislého odběru pacienta (viz výše)

*Dárce:* **organizuje transplantační koordinátor ÚHKT - pí Waldmannová**

U pacienta i vybraného dárce je provedena v rámci konfirmačního vyšetření genotypizace lokusů HLA-A, -B, -Cw, -DRB1 a -DQB1 na úrovni určení jednotlivých alel (high resolution). Platí pro dárce v širší rodině i pro nepříbuzné dárce.

#### 8.7.6 Doba vydání výsledku

Běžná doba:       10 dnů 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 NRL do data uvolnění výsledku.

## 8.8 VYŠETŘENÍ GENOTYPU HLA PRO VAZBU S CHOROBAMI

### 8.8.1 Princip


Odběr primárních vzorků se provádí pro účely získání DNA a stanovení přesného genotypu HLA při diagnostice vybraných chorob (viz bod 8.8.2)

### 8.8.2 Platnost postupu/faktory ovlivňující vyšetření

Na našem pracovišti vyšetřujeme HLA pro vazbu především s chorobami uvedenými dále. Pro tato vyšetření pracujeme i jako referenční laboratoř, tj. organizujeme kontroly kvality, poskytujeme konzultace a konfirmační vyšetření u nejasných výsledků.

#### Celiakie

Celiakie je geneticky podmíněné autoimunitní onemocnění. Základním předpokladem vzniku celiakie je přítomnost specifických HLA epitopů, které vážou gliadinové zbytky z lepku přijímaného v potravě a tím spouštějí vlastní onemocnění. Genotyp HLA většiny pacientů s celiakií obsahuje HLA-DQA1\*05 a HLA-DQB1\*02 (cca 95%) nebo HLA-DQA1\*03.01 a DQB1\*03:02. U osob, které nemají žádnou z těchto HLA-DQ alel, je diagnosa celiakie nepravděpodobná, to znamená, vyšetření má vysokou senzitivitu (96%). Proto hlavní význam HLA-DQ typizace pro tuto diagnosu je vyloučení choroby u osob bez predisponujících alel.

Národní referenční laboratoř pro DNA diagnostiku Laboratorní příručka	
Nahrazuje stranu: ze dne: Výtisk č.: 02	NRL_LP_14_01 Verze A1 Platnost od 1. 10. 2014

Uvedené genotypy HLA se však vyskytují i u zdravých osob (cca 20% zdravé populace ČR). Z toho plyne, že přítomnost HLA-DQA1\*05 – DQB1\*02 (DQ2) nebo HLA-DQA1\*03:01 – DQB1\*03:02 (DQ8) nelze interpretovat jako potvrzení této diagnózy bez dalších vyšetření. Dle doporučení Evropské společnosti pro dětskou gastroenterologii, hepatologii a výživu (ESPGHAN) z roku 2012 u pacientů s přesvědčivým klinickým obrazem a vysokou pozitivitou protilátek (TG 2 IgA > 10x nad normu), pozitivita HLA-DQA1\*05 – DQB1\*02 (DQ2) nebo HLA-DQA1\*03:01 – DQB1\*03:02 (DQ8) umožňuje stanovit diagnózu celiakie bez bioptického vyšetření. Tento postup je však v ČR v současné době ve stadiu ověřování platnosti.

V odborné literatuře je sporadicky uváděna diagnosa celiakie i u pacientů, kteří mají přítomnu pouze jednu z predispozičních alel (nejčastěji HLA-DQB1\*02 bez HLA-DQA1\*05). U osob s takovým genotypem proto nelze diagnosu celiakie vyloučit ani potvrdit.

Výhody vyšetření HLA pro diagnostiku celiakie:

- vyšetření se provádí jednou za život
- odběr biologického materiálu nezatěžuje pacienta
- výsledek vyšetření neovlivňuje bezlepková dieta
- nepřítomnost žádné z predisponujících alel (HLA-DQA1\*05/ DQB1\*02; DQA1\*03:01/ DQB1\*03:02) umožňuje vyloučit onemocnění celiakie bez bioptického vyšetření

žádanka o vyšetření a postup pro odběr vzorků, uvedený v Laboratorní příručce (LP), je společný pro všechna vyšetření HLA genotypu – do kolony vyžadované vyšetření uveďte „jiné: diagnostika celiakie“

#### **Narkolepsie**

Neurologické onemocnění s prevalencí 0,02 - 0,067%, v ČR podle epidemiologického odhadu existuje cca 2500-5000 osob s touto chorobou. Jedná se pravděpodobně o autoimunitní onemocnění s určitým dědičným sklonem nastartovaná vnějším faktorem (např. streptokoková infekce) namířené proti hypocretinovým neuronům, které mají budivou funkci.

Narkolepsie s kataplexií vzniká vymizením hypocretinových neuronů jednorázovým autoimunitním procesem, ve kterém HLA systém hraje výraznou roli. HLA-DQB1\*06:02 je přítomen u 85 -100% pacientů s diagnosou narkolepsie s kataplexií. Většina těchto pacientů je současně HLA-DQB1\*06:03 negativních.

Narkolepsie bez kataplexie je předmětem studie mechanismů vzniku. U této diagnózy je vazba s HLA-DQB1 předmětem celosvětových studií.

Vyšetření přítomnosti HLA-DQB1\*06:02 a DQB1\*06:03 je v naší laboratoři prováděno na úrovni genotypizace.


žádanka o vyšetření a postup pro odběr vzorků, uvedený v Laboratorní příručce (LP), je společný pro všechna vyšetření HLA genotypu – do kolony vyžadované vyšetření uveďte „jiné: diagnostika narkolepsie“

#### **HLA-B\*27 – spojeno s Morbus Bechtěrev, Reiterovým syndromem (reaktivní artritida), juvenilní revmatoidní artritidou s uveitidou**

HLA-B\*27 se vyskytuje přibližně u 7 % obyvatel České republiky

u **Morbus Bechtěrev** jej lze prokázat až v 90 % případů. Pravděpodobnost onemocnění Morbus Bechtěrev je až 300krát vyšší oproti osobám, které tento antigen nemají. Přítomnost HLA-B\*27 však ještě neznamená, že nositel bude Bechtěrevovou nemocí postižen, jedná se pouze o zvýšené riziko

**Reiterův syndrom** (reaktivní artritida) – u jedinců HLA-B\*27 pozitivních je vyšší riziko vzniku této choroby, nicméně testování tohoto znaku není součástí doporučených vyšetření.

Národní referenční laboratoř pro DNA diagnostiku Laboratorní příručka	
Nahrazuje stranu: ze dne: Výtisk č.: 02	NRL_LP_14_01 Verze A1 Platnost od 1. 10. 2014

**juvenilní revmatoidní artritida spojená s uveitidou**, v takových případech spojeno s HLA-B\*27 pozitivitou. Testování tohoto znaku je pro tuto diagnosu doporučeno jako doplňkové vyšetření.

Vyšetření přítomnosti HLA-B\*27 je v naší laboratoři prováděno na úrovni genotypizace. Žádanka o vyšetření a postup pro odběr vzorků, uvedený v Laboratorní příručce (LP), je společný pro všechna vyšetření HLA genotypu – do kolony vyžadované vyšetření uveďte „jiné: HLA-B\*27“

#### Další

Na základě požadavku lze provést genotypizaci kteréhokoliv vybraného znaku HLA-A, -B,- Cw, -DRB1, -DQA1 a -DQB1.

V případě požadavku vyšetření dalších HLA znaků ve vazbě s chorobami, kontaktujte prosím RNDr. Marii Dobrovolnou nebo Ing. Milenu Vranou telefonicky nebo e-mailem.

### 8.8.3 Typy vzorků, které lze pro vyšetření použít

Primární vzorky:

- Periferní krev
- Stěry bukalních sliznic

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 x 10<sup>9</sup>/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 10 dní.

Zpracované vzorky:

- DNA izolovaná ze somatických jaderných buněk
- DNA izolovaná z buněčných frakcí

### 8.8.4 Doba vydání výsledku

Běžná doba: 10 dnů 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 NRL do data uvolnění výsledku.

## 8.9 VYŠETŘENÍ GENOTYPU HLA PRO FARMAKOGENETIKU


### 8.9.1 Princip

Odběr primárních vzorků se provádí pro účely získání DNA a stanovení přesného genotypu HLA pro prevenci hypersenzitivní reakce před podáním Abacaviru, případně pro další účely (viz 8.9.2)

### 8.9.2 Platnost postupu/faktory ovlivňující vyšetření

Studium HLA systému začíná být i důležitým nástrojem farmakogenetiky, kdy HLA znak může predikovat odpovídavost/neodpovídavost či senzitivitu pacienta na podání léčebného preparátu

V současné době standardně testujeme přítomnost HLA-B\*57:01 u HIV+ pacientů před podáním Abacaviru pro vyloučení hypersenzitivní reakce na tento lék. Typizace je prováděna z dodané DNA vyšetřovaných pacientů.

Národní referenční laboratoř pro DNA diagnostiku Laboratorní příručka	
Nahrazuje stranu: ze dne: Výtisk č.: 02	NRL_LP_14_01 Verze A1 Platnost od 1. 10. 2014

Na základě požadavku lze provést genotypizaci kteréhokoliv vybraného znaku HLA-A, -B, -Cw, -DRB1, -DQA1 a -DQB1.

V případě zájmu o vyšetření dalších HLA znaků, kontaktujte prosím RNDr. Marii Dobrovolnou nebo Ing. Milenu Vranou telefonicky nebo e-mailem.

### 8.9.3 Typy vzorků, které lze pro vyšetření použít

Primární vzorky:

- Periferní krev
- Stěry bukalních sliznic

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 10 dní.

Zpracované vzorky:

- DNA izolovaná ze somatických jaderných buněk
- DNA izolovaná z buněčných frakcí

### 8.9.4 Doba vydání výsledku

Běžná doba: 10 dnů 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 NRL do data uvolnění výsledku.

## 8.10 VYŠETŘENÍ PŘÍTOMNOSTI MUTACÍ NPM1

### 8.10.1 Princip


Metoda se používá k detekci mutací na C-konci genu pro NPM1, které patří mezi nejběžnější mutace u AML pacientů s normálním karyotypem. Úsek nesoucí mutace je amplifikován pomocí PCR z cDNA pokrývají exony 11 až 12 genu pro NPM1, izolován pomocí gelové elektroforézy a sekvenován. Případná mutace je poté detekována porovnáním sekvence PCR produktu s referenční sekvencí (NM 002520.6). 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.

### 8.10.2 Platnost postupu/faktory ovlivňující vyšetření

Protokol o převzetí primárního vzorku (žádanka) je nezbytný pro provedení detekce mutací NPM1. Pro vyšetření je vyžadován vzorek ze zachytu 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. Vzorek pro přípravu celkové RNA pro PCR a následné sekvenování musí obsahovat nejméně  $3 \times 10^6$  mononukleárních buněk.

### 8.10.3 Typy vzorků, které lze pro vyšetření použít

Primární vzorky:

Národní referenční laboratoř pro DNA diagnostiku Laboratorní příručka	
Nahrazuje stranu: ze dne: Výtisk č.: 02	NRL_LP_14_01 Verze A1 Platnost od 1. 10. 2014

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

Zpracované vzorky:

- Izolovaná celková RNA
- přepsaná reverzní transkriptázou do cDNA.

#### 8.10.4 Doba vydání výsledku

20 pracovních dnů od odběru primárního vzorku nebo 10 dnů od obdržení RNA či cDNA.

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

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

#### 8.11.1 Princip

Metoda je založena na sekvenaci PCR produktů DNA genu pro *CEBPA*. Pomocí PCR amplifikujeme překrývající se úseky, které jsou po amplifikaci izolovány pomocí gelové elektroforézy a 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.

#### 8.11.2 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. Vzorek musí pro přípravu lyzátu jako zdroje DNA pro PCR a následné sekvenování obsahovat nejméně  $10^6$  mononukleárních buněk.

#### 8.11.3 Typy vzorků, které lze pro vyšetření použít

Primární vzorky:

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

Zpracované vzorky:


- Buněčný lyzát ošetřený proteinázou K
- předpřipravená celková RNA
- cDNA (jedná se o gen bez intronů).

#### 8.11.4 Doba vydání výsledku

20 pracovních dnů od odběru primárního vzorku nebo 10 dnů od obdržení celkové RNA nebo cDNA.

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



Národní referenční laboratoř pro DNA diagnostiku Laboratorní příručka	
Nahrazuje stranu: ze dne: Výtisk č.: 02	NRL_LP_14_01 Verze A1 Platnost od 1. 10. 2014

## 8.12 VYŠETŘENÍ MUTACÍ V GENU HBB (HEMOGLOBIN BETA) METODOU PŘÍMÉHO SEKVENOVÁNÍ

### 8.12.1 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  $\beta$ -globinového řetězce, jejímž důsledkem vzniká dědičné onemocnění krve  $\beta$ -**talasemie** nebo poruše struktury  $\beta$ -globinového řetězce, jejímž důsledkem vzniká dědičné onemocnění krve **srpkovitá anémie**. Tato onemocnění jsou zárodečná a dědí se autosomálně recesivním způsobem.

### 8.12.2 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.

### 8.12.3 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 10 dní.

Zpracované vzorky:

- DNA izolovaná ze somatických jaderných buněk

### 8.12.4 Doba vydání výsledku

20 pracovních dnů od odběru primárního vzorku

## 9 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..

## 10 SOUVISEJÍCÍ DOKUMENTACE

NRL\_PK\_14\_01 PŘÍRUČKA KVALITY NRL PRO DNA DIAGNOSTIKU PRO ČSN EN ISO 15 189

NRL\_01\_SOP\_14\_01 – NRL\_12\_14\_01 STANDARDNÍ OPERAČNÍ POSTUPY

Národní referenční laboratoř pro DNA diagnostiku Laboratorní příručka	 ÚHKÚ
Nahrazuje stranu: ze dne: Výtisk č.: 02	NRL_LP_14_01 Verze A1 Platnost od 1. 10. 2014

## 11 PŘÍLOHY

NRL\_LP\_14\_01 příloha 01 PRŮVODKA VZORKU