


Oddělení molekulární genetiky	 <small>Ústav hematologie a krevní transfuze</small>
Laboratorní příručka Výtisk č.2	13100_LP_15_01 Verze A4

Zpracovatel:	H. Žižková	Podpis:	
Přezkoumal a schválil:	doc. Mgr. Kateřina Machová Poláková, Ph.D.	Podpis:	
Garant dokumentu:	H. Žižková	Podpis:	
Platnost od:	1. 8. 2021	Uvolněno pro systém:	1. 8. 2021
Výtisk č:	2	Počet stran:	13
Verze:	A4	Přijato do evidence:	1. 8. 2021

## ROZDĚLOVNÍK


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

Č. výtisku	varianta	Držitel	Umístění	Podpis
01	elektronická*	H. Žižková	M:\skupina\komple ment_laboratori	
02	elektronická*	H. Žižková	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.

## Seznam změn a revizí řízeného dokumentu

Platnost od:	Nová verze	Obsah změny/ revize	Podpis garanta	Schválení revize
1.8.2021	A4	Doplnění seznamu nabízených vyšetření kap. 2.5, 10.2 a 10.4	Žižková	

Oddělení molekulární genetiky	 Ústav hematologie a krevní transfuze
Laboratorní příručka Nahrazuje stranu: ze dne: Výtisk č.2	13100_LP_15_01 Verze A4

<b>ROZDĚLOVNÍK .....</b>	<b>1</b>
<b>SEZNAM ZMĚN A REVIZÍ ŘÍZENÉHO DOKUMENTU .....</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 ÚHKTA A VEDENÍ LABORATOŘE.....	3
2.3 ZAMĚŘENÍ LABORATOŘE .....	4
2.4 ORGANIZACE LABORATOŘE, VNITŘNÍ ČLENĚNÍ A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ .....	4
2.5 SPEKTRUM NABÍZENÝCH VYŠETŘENÍ .....	4
<b>3 ODBĚR PRIMÁRNÍCH VZORKŮ.....</b>	<b>4</b>
3.1 POKYNY PRO ZÍSKÁVÁNÍ VZORKŮ PACIENTA.....	4
3.2 POKYNY PRO VYPLNĚNÍ ŽÁDANKY .....	5
3.3 INFORMOVANÝ SOUHLAS S VYŠETŘENÍM.....	5
3.4 POKYNY PRO ČINNOSTI PŘI ODBĚRU .....	5
3.5 DODÁNÍ VZORKŮ DO LABORATOŘE A PODMÍNKY TRANSPORTU .....	5
3.6 ZÁKLADNÍ INFORMACE K BEZPEČNOSTI PŘI PRÁCI SE VZORKY .....	6
<b>4 ZPRACOVÁNÍ PRIMÁRNÍCH VZORKŮ PŘED DODÁNÍM DO LABORATOŘE .....</b>	<b>6</b>
<b>5 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ VYŠETŘENÍ .....</b>	<b>6</b>
<b>6 KRITÉRIA PRO PŘIJETÍ A ODMÍTNUTÍ VZORKŮ .....</b>	<b>6</b>
<b>7 ODBORNÉ KONZULTACE .....</b>	<b>7</b>
<b>8 ŘEŠENÍ STÍŽNOSTÍ .....</b>	<b>7</b>
<b>9 OCHRANA INFORMACÍ.....</b>	<b>7</b>
<b>10 INFORMACE K NABÍZENÝM VYŠETŘENÍM .....</b>	<b>8</b>
<b>10.1 DIAGNOSTICKÉ VYŠETŘENÍ BCR-ABL1 .....</b>	<b>8</b>
10.1.1 Princip.....	8
10.1.2 Platnost postupu/faktory ovlivňující vyšetření .....	8
10.1.3 Typy vzorků, které lze pro vyšetření použít.....	8
10.1.4 Doba vydání výsledku .....	9
<b>10.2 VYŠETŘENÍ HLADINY TRANSKRIPTU BCR-ABL1 .....</b>	<b>9</b>
10.2.1 Princip.....	9
10.2.2 Platnost postupu/faktory ovlivňující vyšetření .....	9
10.2.3 Typy vzorků, které lze pro vyšetření použít.....	9
10.2.4 Doba vydání výsledku .....	10
<b>10.3 VYŠETŘENÍ MUTACÍ V KINÁZOVÉ DOMÉNĚ BCR-ABL1 .....</b>	<b>10</b>
10.3.1 Princip.....	10

Oddělení molekulární genetiky	 Ústav hematologie a krevní transfuze
Laboratorní příručka Nahrazuje stranu: ze dne: Výtisk č.2	13100_LP_15_01 Verze A4

10.3.2	Platnost postupu/faktory ovlivňující vyšetření .....	10
10.3.3	Typy vzorků, které lze pro vyšetření použít.....	10
10.3.4	Doba vydání výsledku .....	11
<b>10.4</b>	<b>VYŠETŘENÍ PANELU 28 FÚZNÍCH GENŮ METODOU REAL-TIME RT-PCR .....</b>	<b>11</b>
10.4.1	Princip.....	11
10.4.2	Platnost postupu/faktory ovlivňující vyšetření .....	12
10.4.3	Typy vzorků, které lze pro vyšetření použít.....	12
10.4.4	Doba vydání výsledku .....	12
<b>11</b>	<b>VYŘIZOVÁNÍ STÍŽNOSTÍ.....</b>	<b>12</b>
<b>12</b>	<b>SOUVISEJÍCÍ DOKUMENTACE .....</b>	<b>13</b>

## 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, akreditovaná ČIA dle ČSN EN ISO 15189).

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, 128 20 Praha 2
web:	www.uhkt.cz
IČO:	00023736
Název laboratoře:	Oddělení molekulární genetiky
Adresa a umístění:	U Nemocnice 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
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.

Oddělení molekulární genetiky	 Ústav hematologie a krevní transfuze
Laboratorní příručka Nahrazuje stranu: ze dne: Výtisk č.2	13100_LP_15_01 Verze A4

### 2.3 Zaměření laboratoře

Laboratoř se zabývá molekulárně genetickými analýzami vzorků krve, kostní dřeně, eventuálně 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](mailto:katerina.machova@uhkt.cz)

Technická vedoucí: Mgr. Hana Žižková, Ph.D., [zizkovar@uhkt.cz](mailto:zizkovar@uhkt.cz)

Zástupce technické vedoucí: Mgr. Vendula Polívková, [vendula.polivkova@uhkt.cz](mailto:vendula.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 ověření.

### 2.5 Spektrum nabízených vyšetření

**Diagnostické vyšetření BCR-ABL1 (fusion gene: breakpoint cluster region – abelson) - NRL\_SOP 03\_14\_01**

**Vyšetření hladiny transkriptu BCR-ABL1 - NRL\_SOP 04\_14\_01 a 13100\_21\_01**

**Vyšetření mutací v kinázové doméně BCR-ABL1 - NRL\_SOP 04\_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.

## 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**

Oddělení molekulární genetiky	 Ústav hematologie a krevní transfuze
Laboratorní příručka Nahrazuje stranu: ze dne: Výtisk č.2	13100_LP_15_01 Verze A4

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 provádění 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](http://www.uhkt.cz).

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

### 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 provádění 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 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!!!**

### 3.4 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

### 3.5 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.

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

Oddělení molekulární genetiky	 Ústav hematologie a krevní transfuze
Laboratorní příručka Nahrazuje stranu: ze dne: Výtisk č.2	13100_LP_15_01 Verze A4

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

### 3.6 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 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 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.

Oddělení molekulární genetiky	 Ústav hematologie a krevní transfuze
Laboratorní příručka Nahrazuje stranu: ze dne: Výtisk č.2	13100_LP_15_01 Verze A4

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.

## 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.

## 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.

Oddělení molekulární genetiky	 Ústav hematologie a krevní transfuze
Laboratorní příručka Nahrazuje stranu: ze dne: Výtisk č.2	13100_LP_15_01 Verze A4

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 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 ( $\mu$ -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.

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  $2 \times 10^7$  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



Oddělení molekulární genetiky	 Ústav hematologie a krevní transfuze
Laboratorní příručka Nahrazuje stranu: ze dne: Výtisk č.2	13100_LP_15_01 Verze A4

- cDNA

#### 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 leukémií (CML) nebo Ph+ akutní lymfoblastickou leukémií (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.

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  $2 \times 10^7$  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

Oddělení molekulární genetiky	 Ústav hematologie a krevní transfuze
Laboratorní příručka Nahrazuje stranu: ze dne: Výtisk č.2	13100_LP_15_01 Verze A4

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,

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 degrační 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  $2 \times 10^7$  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

Oddělení molekulární genetiky	 Ústav hematologie a krevní transfuze
Laboratorní příručka Nahrazuje stranu: ze dne: Výtisk č.2	13100_LP_15_01 Verze A4

- Kostní dřeň

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 skrínink 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)  
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)

Oddělení molekulární genetiky	 Ústav hematologie a krevní transfuze
Laboratorní příručka Nahrazuje stranu: ze dne: Výtisk č.2	13100_LP_15_01 Verze A4

#### 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 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.

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 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.

Oddělení molekulární genetiky	 <small>Ústav hematologie a krevní transfuze</small>
Laboratorní příručka Nahrazuje stranu: ze dne: Výtisk č.2	13100_LP_15_01 Verze A4

## 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

13100\_SOP\_21\_01

13100\_SOP\_21\_02

Průvodka vzorku F\_SMJ\_88

Žádanky