

01-LP-2022

Účinnost od 15.9.2022 / verze č. 1.8

LABORATOŘ MOLEKULÁRNÍ DIAGNOSTIKY A CYTOGENETIKY

Nahrazuje	Laboratorní příručku LMDC, verzi 1.7 ze dne 13. 10. 2021
Určeno pro	Interní a externí dodavatele vzorků

Zpracovatel	Mgr. Nikola Malinová JOP-VŠ, manažerka kvality	Datum 12.9.2022	Podpis
Garant	RNDr. Dita Bednářová vedoucí LMDC	Datum 12.9.2022	Podpis

Schvalovatelé:

Ing. Jan Hrdý předseda představenstva	Datum	Podpis
MUDr. Marcel Guřan, Ph.D. člen představenstva pro oblast léčebné a ošetrovatelské péče	Datum	Podpis
Ing. Martin Déva člen představenstva pro oblast ekonomickou	Datum	Podpis

Změna č. 1 ze dne 18. 1. 2023 – doplnění nové vyšetřovací metody

Změna č. 2 ze dne 15.4.2024 – doplnění nové vyšetřovací metody

Změna č. 3 ze dne 10.1.2025 – doplnění nové vyšetřovací metody

Změna č. 4 ze dne 12.5.2025 – doplnění nové vyšetřovací metody

Změna č. 5 ze dne 12.2.2026 – úprava v textu

OBSAH

1. ÚVODNÍ USTANOVENÍ.....	4
1.1. ÚČEL A ROZSAH PLATNOSTI	4
1.2. ZÁVAZNOST	4
1.3. DEFINICE, ZKRATKY, POJMY	4
1.4. SOUVISEJÍCÍ DOKUMENTACE	4
2. IDENTIFIKACE LABORATOŘE A DŮLEŽITÉ ÚDAJE	5
2.1. ÚROVEŇ A STAV AKREDITACE PRACOVISTĚ	5
2.3. PROVOZNÍ DOBA	6
2.4. ZAMĚŘENÍ LABORATOŘE A SPEKTRUM NABÍZENÝCH SLUŽEB	6
2.5. PŘEHLED NABÍZENÝCH VYŠETŘENÍ.....	6
2.6. INFORMACE O POSKYTOVANÝCH GENETICKÝCH VYŠETŘENÍCH	7
2.6.1. Cytogenetická vyšetření.....	7
2.6.2. Molekulárně genetická vyšetření.....	7
3. MANUÁL PRO ODBĚRY PRIMÁRNÍCH VZORKŮ	10
3.1. IDENTIFIKACE PRIMÁRNÍHO VZORKU	10
3.2. ŽÁDANKA PRO LABORATORNÍ VYŠETŘENÍ	10
3.3. INFORMOVANÝ SOUHLAS	11
3.4. POŽADAVKY NA URGENTNÍ VYŠETŘENÍ (STATIM).....	11
3.5. POUŽÍVANÝ ODBĚROVÝ SYSTÉM.....	11
3.6. PŘÍPRAVA PACIENTA PŘED VYŠETŘENÍM	11
3.7. POSTUP PRO ODBĚR VZORKU	12
3.7.1. Odběr kostní dřeně	12
3.7.2. Odběr periferní krve.....	12
3.8. OPERACE SE VZORKEM, STABILITA, TRANSPORT	14
3.9. ZÁKLADNÍ INFORMACE K BEZPEČNOSTI PŘI PRÁCI SE VZORKY	14
4. PREANALYTICKÉ PROCESY V LABORATOŘI	14
4.1. PŘÍJEM VZORKŮ DO LABORATOŘE.....	14
4.1.1. Identifikace pacienta na štítku zkumavky	14
4.1.2. Kritéria pro přijetí nebo odmítnutí vadných (nestandardních) primárních vzorků	15
4.2. MANIPULACE SE VZORKY A SKLADOVÁNÍ MATERIÁLU PŘED VYŠETŘENÍM	16
4.3. SMLUVNÍ LABORATOŘE A NEJČASTĚJI PROVÁDĚNÁ VYŠETŘENÍ PRO PACIENTY LMDC	16
5. FÁZE PO VYŠETŘENÍ.....	16
5.1. SKLADOVÁNÍ PRIMÁRNÍCH VZORKŮ A CYTOGENETICKÝCH PREPARÁTŮ PO VYŠETŘENÍ, ARCHIVACE VZORKŮ S PATOLOGICKÝM NÁLEZEM	17
5.2. LIKVIDACE BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU PO VYŠETŘENÍ.....	17
5.3. DODATEČNÉ VYŠETŘENÍ.....	17
6. VYDÁVÁNÍ VÝSLEDKŮ A KOMUNIKACE S LABORATOŘÍ	17

6.1. FORMA VYDÁVANÝCH VÝSLEDKŮ	17
6.1.1. Telefonické sdělování výsledků	18
6.1.2. Komunikace s lékaři indikujícími vyšetření	18
6.2. KONEČNÝ VÝSLEDEK	18
6.3. VYDÁVÁNÍ VÝSLEDKŮ PŘÍMO PACIENTŮM	18
6.4. ÚHRADA VYŠETŘENÍ SAMOPLÁTCI A CIZINCI	18
6.5. ZMĚNY VÝSLEDKŮ A NÁLEZŮ	19
6.6. DOBY TRVÁNÍ JEDNOTLIVÝCH VYŠETŘENÍ OD PŘÍJMU VZORKU DO LABORATOŘE	19
6.7. KONZULTAČNÍ ČINNOST LABORATOŘE	20
6.8. ZPŮSOB ŘEŠENÍ STÍŽNOSTÍ	20
7. ZÁVĚREČNÉ USTANOVENÍ	20
8. PŘÍLOHA 1 LIST ZMĚN A REVIZÍ	21

Předmluva

Vážené kolegyně, vážení kolegové, všichni naši klienti,

tato Laboratorní příručka Vám přináší informace o Laboratoři molekulární diagnostiky a cytogenetiky a jejích službách pro Vás. Je určena lékařům, zdravotním sestrám a také pacientům. Byla vypracována v souladu s normou ISO 15189. Podle potřeb klinické a laboratorní praxe budou jednotlivé informace v příručce průběžně aktualizovány, vydání nové verze Laboratorní příručky bude označeno datem účinnosti. Doufáme, že v ní naleznete vše potřebné pro naši dobrou spolupráci.

RNDr. Dita Bednářová

Laboratoř molekulární diagnostiky a cytogenetiky

1. ÚVODNÍ USTANOVENÍ

1.1. ÚČEL A ROZSAH PLATNOSTI

Cílem této příručky je informovat lékaře a žadatele o laboratorní vyšetření o tom, jaká vyšetření Laboratoř molekulární diagnostiky a cytogenetiky poskytuje, o podmínkách správného odběru vzorků, transportu vzorků do laboratoře, o způsobu vydávání výsledků genetického vyšetření a způsobu komunikace mezi pacientem, lékařem a laboratoří. V této příručce mohou pacienti i ošetřující lékaři nalézt potřebné informace o indikovaných vyšetřeních, odkazy na laboratorní žádanky a informovaný souhlas pacienta.

Příručka Laboratoře molekulární diagnostiky a cytogenetiky je součástí řízené dokumentace Krajské nemocnice T. Bati, a. s. Zlín.

Její aktuální verze je dostupná na webových stránkách <http://www.kntb.cz/>. Tištěná verze je k dispozici v laboratoři.

1.2. ZÁVAZNOST

Za zpracování a aktualizaci této příručky odpovídá odborná vedoucí Laboratoře molekulární diagnostiky a cytogenetiky a je závazná pro všechny pracovníky laboratoře LMDC. Vedoucí laboratoře je povinen zajistit prokazatelné seznámení podřízených pracovníků s obsahem této Laboratorní příručky.

1.3. DEFINICE, ZKRATKY, POJMY

DNA	Deoxyribonukleová kyselina
FISH	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
HLA	Human Leucocyte Antigen (Hlavní histokompatibilní systém)
KNTB	Krajská nemocnice T. Bati
LIMS-genetika	Laboratorní informační systém LMDC
LMDC	Laboratoř molekulární diagnostiky a cytogenetiky
NIS	Nemocniční informační systém
NK	Nukleová kyselina
OLM	Oddělení lékařské mikrobiologie
RNA	Ribonukleová kyselina
SVLS	Společné vyšetřovací a léčebné složky

1.4. SOUVISEJÍCÍ DOKUMENTACE

F-01-2025-020 Žádanka na molekulárně genetické vyšetření

F-01-2025-067 Žádanka na cytogenetické a FISH vyšetření

01-IS-21-2022-001 Informovaný souhlas s genetickým laboratorním vyšetřením

2. IDENTIFIKACE LABORATOŘE A DŮLEŽITÉ ÚDAJE

Laboratoř molekulární diagnostiky a cytogenetiky spadá personálně pod Oddělení lékařské mikrobiologie, a to je součástí SVLS – Společných vyšetřovacích a léčebných složek komplementu Krajské nemocnice T. Bati, a. s. Zlín.

Specifikace organizace

Název organizace	Krajská nemocnice T. Bati, a. s.
Identifikační údaje	IČ: 27661989, DIČ: CZ27661989
Statutární zástupce organizace	Ing. Jan Hrdý, předseda představenstva
Adresa	Havlíčkovu nábřeží 600, 762 75 Zlín
Kontaktní údaje	telefonní ústředna: 577 551 111, www.kntb.cz

Specifikace pracoviště

Název pracoviště	Laboratoř molekulární diagnostiky a cytogenetiky
Adresa	Havlíčkovu nábřeží 600, 762 75 Zlín
Laboratoř – telefon, email	577 553 171, genetika.laborator@bnzlin.cz
Okruh působnosti laboratoře	klinická oddělení a ambulance v KNTB, lékaři a zdravotnická zařízení ve Zlínském kraji
Předmět činnosti	vyšetření biologického materiálu v oblasti molekulární biologie a cytogenetiky
Vedoucí laboratoře	RNDr. Dita Bednářová, Dita.Bednarova@bnzlin.cz
Odborní pracovníci	Mgr. Nikola Malinová, nikola.glosova@bnzlin.cz , Mgr. Dominik Vrba, dominik.vrba@bnzlin.cz
Odborný garant	RNDr. Dita Bednářová
Manažer kvality	Mgr. Nikola Malinová
Webové stránky	https://www.kntb.cz/oddeleni-molekularni-diagnostiky-a-cytogenetiky

2.1. ÚROVEŇ A STAV AKREDITACE PRACOVISTĚ

Akreditace dle ISO 15189:2013

Laboratoř je akreditována Českým institutem pro akreditaci, o.p.s. podle ČSN EN ISO 15189:2023 jako klinická laboratoř č. 8315. Laboratoř uplatňuje flexibilní přístup k rozsahu akreditace.

2.2. ORGANIZACE LABORATOŘE, JEJÍ VNITŘNÍ ČLENĚNÍ, VYBAVENÍ A PERSONÁLNÍ OBSAZENÍ

Členění laboratoře

Laboratoř molekulární diagnostiky a cytogenetiky (LMDC) je členěna na dva úseky:

- Úsek molekulární diagnostiky.
- Úsek cytogenetiky a FISH.

Prostory pracoviště

Laboratoř se nachází v 2. a 3. podlaží 22. budovy ve středu areálu KNTB.

Vyšetření Laboratoře molekulární diagnostiky a cytogenetiky mohou indikovat lékaři s odborností lékařská genetika (208) a např. hematologie (202), klinická onkologie (402), alergologie a klinická imunologie (207),

neurologie (209), vnitřní lékařství-interna (101), gastroenterologie (105), revmatologie (109), pneumologie a ftizeologie (205), dětské lékařství (301), psychiatrie (305), gynekologie a porodnictví (603), urologie (706), všeobecné praktické lékařství (001). Odbornost indikujícího lékaře je přesně specifikována pojišťovnou pro každé vyšetření.

2.3. PROVOZNÍ DOBA

Provozní doba v naší laboratoři: pondělí–pátek

7.00–15.00 hodin

Příjem vzorků:

Cytogenetické vyšetření: pondělí–pátek 7.00–15.00 hod.

Pokud není vzorek zaslán v příjmové dny a hodiny, není zaručena dostatečná kvalita výsledku. **Molekulárně**

genetické vyšetření: pondělí–pátek 7.00 – 15.00 hod.

Pokud není vzorek zaslán v příjmové dny a hodiny, není zaručena dostatečná kvalita výsledku.

2.4. ZAMĚŘENÍ LABORATOŘE A SPEKTRUM NABÍZENÝCH SLUŽEB

Naše laboratoř provádí specializovaná **cytogenetická a molekulárně genetická vyšetření** z těchto **primárních materiálů:**

- Periferní krev.
- Izolovaná DNA.
- Izolovaná RNA.

2.5. PŘEHLED NABÍZENÝCH VYŠETŘENÍ

- Vyšetření mutačního statusu genu pro **FII Prothrombin G20210A** metodou real-time PCR – SOPV GV 4
- Vyšetření mutačního statusu genu pro **FV Leiden R506Q** metodou real-time PCR – SOPV GV 5
- Vyšetření přítomnosti **fúzního genu BCR::ABL1** major (e14a2, e13a2, e14a3, e13a3), minor (e1a2, e1a3), mikro (e19a2, e19a3) a variant (e6a2) metodou real-time PCR – SOPV GV 6
- Vyšetření mutačního statusu genu pro **JAK2 V617F** metodou real-time PCR – SOPV GV 7
- Vyšetření mutačního statusu genu **TPMT** mutace TPMT*2, TPMT*3B a TPMT*3C metodou real-time PCR – SOPV GV 13
- Vyšetření mutačního statusu genu **HFE** mutace Cys282Tyr, His63Asp, Ser65Cys metodou real-time PCR – SOPV GV 16
- Vyšetření **Celiakální sprue** – alel HLA-DQ2.5 (DQA1*05/DQB1*02), HLA-DQ2.2 (DQA1*02/DQB1*02), HLADQ8 (DQA1*03/DQB1*03:02), HLA-DR3, DR4 (DRB1*03, DRB1*04) a HLA- DR7, DR11 a DR12 (DRB1*07, DRB1*11, DRB1*12) metodou real-time PCR – SOPV GV 17
- Vyšetření mutačního statusu genu **DPYD** mutace DPYD*2A (IVS14+1G>A), *13 (c1679T>G), HapB3 (c1236G>A) a c2846A>T metodou real-time PCR – SOPV GV 18
- Vyšetření vrozených chromozomových aberací metodou G pruhování (**VCHA**) – SOPV GV 9
- Vyšetření chromozomových aberací metodou **Fluorescenční in situ hybridizace** (FISH) – SOPV GV 14
- Vyšetření mutačního statusu genu **CALR** mutace exonu 9 Typ 1 (L367fs*46) a Typ2 (K385fs*47) metodou real-time PCR – SOPV GV 19
- Vyšetření chromozomů z buněk **kostní dřeně** metodou G pruhování – SOPV GV 20
- Vyšetření mutačního statusu genu **MPL** mutace W515L, W515K, W515A a S505N metodou real-time PCR – SOPV GV 21
- Vyšetření mutačního statusu genu **APOE** (E2, E3, E4) metodou real-time PCR – SOPV GV 23

Pokud požadované vyšetření není součástí našeho portfolia prováděných vyšetření, můžeme provést **izolaci DNA/RNA** a zprostředkovat vyšetření ve specializované laboratoři.

Rovněž je možnost využít naši laboratoř k izolaci DNA z velkého množství primárního materiálu a její následné dlouhodobé uchování v **genové bance LMDC**.

2.6. INFORMACE O POSKYTOVANÝCH GENETICKÝCH VYŠETŘENÍCH

Tato kapitola obsahuje řadu různorodých vyšetření, doba vydávání výsledků se tedy liší. Bližší informace naleznete v kapitole 6.6.

2.6.1. Cytogenetická vyšetření

2.6.1.1. Vyšetření vrozených chromozomových aberací metodou G pruhování periferní krve (VCHA) Při cytogenetickém vyšetření periferní krve se kultivují T-lymfocyty po dobu 72 h. Po přidání mitotického jedu kolchicinu se zastaví buněčný cyklus buněk ve stádiu metafáze a ze získané buněčné suspenze lze připravit cytogenetické preparáty, na kterých můžeme sledovat počet a strukturu jednotlivých chromozomů v buněčných jádrech. Kultivace, získání suspenze a příprava preparátů trvá 6 pracovních dnů.

Používáme metodu G-pruhování a mikroskopické pozorování obarvených chromozomů pomocí automatického karyotypovacího systému LUCIA.

2.6.1.2. Vyšetření chromozomů z buněk kostní dřeně metodou G pruhování

Při cytogenetickém vyšetření stanovení karyotypu z nádorových buněk, se kultivují buňky kostní dřeně 16-24 hodin. Po přidání mitotického jedu kolchicinu se zastaví buněčný cyklus ve stádiu metafáze a ze získané buněčné suspenze lze připravit cytogenetické preparáty, na kterých můžeme sledovat počet a strukturu jednotlivých chromozomů v buněčných jádrech. Kultivace, získání suspenze a příprava preparátů trvá 2-3 pracovní dny.

Používáme metodu G-pruhování a mikroskopické pozorování obarvených chromozomů pomocí automatického karyotypovacího systému LUCIA.

2.6.1.3. Vyšetření chromozomových aberací metodou Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

Při molekulárně cytogenetickém vyšetření FISH se z periferní krve kultivují T-lymfocyty po dobu 48-72 hodin, buňky kostní dřeně se kultivují po dobu 24 hodin. Ze získané buněčné suspenze se připraví mikroskopické preparáty, na které se aplikuje fluorescenční sonda. Typ sondy závisí na požadovaném FISH vyšetření. Kultivace, získání suspenze a příprava preparátů trvá 7 pracovních dnů.

FISH sondy (fluorescenčně značené fragmenty DNA) hybridizují k denaturovaným komplementárním vláknům DNA vzorku. Emitovanou fluorescenci sond sledujeme ve fluorescenčním mikroskopu opatřeném příslušnými fluorescenčními filtry. Hodnotí se počet, případně poloha signálů.

2.6.2. Molekulárně genetická vyšetření

Všechna molekulárně genetická vyšetření provádíme metodou *real-time* PCR. Ze vzorků je nejprve nutné vyzolovat DNA/RNA a ta se dále vyšetřuje.

2.6.2.1. Molekulárně genetické vyšetření přítomnosti fúzního genu BCR::ABL1

Vznik BCR::ABL1 fúzního genu je spojován se vznikem Philadelphského chromozomu (Ph) a je to jedna z nejběžnějších abnormalit vyskytujících se u chronické myeloidní leukémie. Tímto vyšetřením jsme schopni odlišit 6 variant fúzního genu M-BCR (e14a2, e13a2, e14a3/e13a3), m-BCR (e1a2/e1a3), μ -BCR (e19a2/e19a3) a v-BCR (e6a2).

2.6.2.2. Molekulárně genetické vyšetření mutace JAK2 genu

Tímto vyšetřením jsme schopni odhalit mutaci V617F v genu Janusovy kinázy 2 v genomové DNA pacientů s předpokladem myeloproliferativního onemocnění, jako jsou polycytemia vera (PV), esenciální trombocytémie (ET) a myelofibróza (PMF).

2.6.2.3. Molekulárně genetické vyšetření trombofilních mutací v genech pro FII Protrombin a FV Leiden

FII a FV jsou geny, které ovlivňují koagulační kaskádu a podílí se tedy na procesu srážení krve. Mutantní geny znamenají pro pacienta zvýšené riziko trombofilních stavů. Tímto vyšetřením jsme schopni odlišit heterozygotní a homozygotní pacienty.

V naší laboratoři vyšetřujeme dvě mutace v genech pro koagulační faktory:

- **Mutace G20210A v genu pro Protrombin (koagulační faktor FII).**
- **Mutace R506Q v genu pro Leiden (koagulační faktor FV).**

2.6.2.4. Molekulárně genetické vyšetření mutací genu TPMT

Thiopurin S-methyltransferáza je zásadním enzymem pro biodegradaci thiopurinů. Mezi thiopuriny patří protinádorová léčiva thioguanin a merkaptopurin, používaná zejména v hematonekologii, a imunosupresivum azathiopirin, určený k terapii autoimunitních onemocnění a prevenci rejekce transplantátu. K nežádoucím účinkům působení thiopurinových léčiv patří neurotoxicita, hepatotoxicita, myelosuprese, záněty sliznic a další. Důsledkem přítomnosti funkčních bodových mutací v kódující oblasti genu TPMT může být snížená biotransformační aktivita enzymu TPMT.

Omezená biotransformace thiopurinů vede k vystupňování nežádoucích účinků léčby. Při detekci heterozygota se doporučuje snížení dávky léčiva na 30-70 %, u homozygota pro mutantní alelu či složeného heterozygota je vhodné zvolit alternativní léčbu.

2.6.2.5. Molekulárně genetické vyšetření mutací genu HFE

Hereditární hemochromatóza je autozomálně recesivní onemocnění s neúplnou penetrancí charakterizovaná zvýšeným hromaděním železa v játrech a v pozdějším stádiu nemoci i v ostatních orgánech a v kůži. Gen HFE kódující stejnojmenný protein bývá nejčastěji zasažen 3 typy mutací – His63Asp, Ser65Cys a Cys282Tyr. Mutovaný protein dereguluje vstřebávání železa z potravy, jeho absorpce u pacientů vzrůstá až 200-300× oproti zdravým jedincům. Fenotypové projevy pozorujeme v případě homozygotů pro jednotlivé mutace nebo u složených heterozygotů Cys282Tyr/ His63Asp a Cys282Tyr/ Ser65Cys. Klinické projevy jsou variabilní, odvisí od orgánů a tkání zasažených zvýšenou depozicí železa. Jedná se např. o letargii, únavnost, kardiomyopatii, cirhózu jater, hepatocelulární karcinom, diabetes mellitus, hyperpigmentaci kůže, hypogonadismus, artropatie atd. Intenzita potíží roste s věkem a zásobami železa v organismu; onemocnění se jen zřídka manifestuje před 40. rokem věku.

2.6.2.6. Molekulárně genetické vyšetření Celiakální sprue

Celiakální sprue (také celiakie) je chronické autoimunitní onemocnění postihující gastrointestinální soustavu, je charakterizovaná celoživotní nesnášenlivostí lepku, proteinu obsaženém v pšenici, žitě, ovsu a ječmeni. Celiakie je multifaktoriální onemocnění asociované s alelami HLA-DQ2.5 (DQA1*05/DQB1*02), HLA-DQ2.2 (DQA1*02/DQB1*02), HLA-DQ8 (DQA1*03/DQB1*03:02), HLA-DR3, DR4 (DRB1*03, DRB1*04) a HLA- DR7, DR11 a DR12 (DRB1*07, DRB1*11, DRB1*12) metodou real-time polymerázové řetězové reakce (PCR), je exprimována u většiny osob trpících tímto onemocněním (> 90 %). Toto onemocnění, má genetickou predispozici, tedy geneticky se dědí, ale k propuknutí nemoci přímo nepodmiňuje. Podstatou celiakie je porucha imunity sliznice tenkého střeva, dochází zde ke zvýšení propustnosti střevní stěny. Jedinci s tímto onemocněním musí dodržovat přísnou bezlepkovou dietu.

2.6.2.7 Molekulárně genetické vyšetření mutace genu DPYD

DPD (Dihydropyrimidin dehydrogenáza) je protein kódován genem DPYD, který zajišťuje odbourávání 5-fluorouracilu na netoxické metabolity. Onemocnění asociované s DPYD zahrnuje deficit dihydropyrimidin dehydrogenázy. V případě deficitu dochází k nedostatečné inaktivaci na netoxické metabolity, a tak udává vzniku četných nežádoucích účinků jako jsou myelosuprese, ulcerace, krvácení do gastrointestinálního traktu atd. Látka 5-fluorouracil je hlavním představitelem fluoropyrimidinových chemoterapeutik, která jsou podávána při chemoterapii nádorových onemocnění gastrointestinálního traktu. Také jsou využívána jako součást kombinované léčby karcinomu prsu, ovaria, cervixu, močového měchýře, prostaty a bronchogenního karcinomu. Úplnou absenci nebo částečné snížení enzymatické aktivity DPD mohou vyvolat vybrané varianty DPYD c.1905+1G>A (DPYD*2A), c.1679T>G (DPYD*13), c.2846A>T a c.1236G>A (HapB3). Se zvýšeným rizikem závažné nebo život ohrožující toxicity mohou souviset i další vzácné varianty. V případě zachycení přítomnosti mutací genu DPYD v genomu pacienta, před zahájením léčby fluoropyrimidiny, se doporučuje redukce dávky či volba alternativní chemoterapie.

2.6.2.8 Molekulárně genetické vyšetření mutace genu CALR

Kalretikulin je vysoce kondenzovaný chaperonový protein vázající Ca^{2+} v endoplazmatickém retikulu (ER), podílející se na regulaci signální transdukce. Má tři domény s různými strukturálními i funkčními vlastnostmi; globulární N doménu, prolin-bohatou P doménu a kyselou C doménu. Narušená C-terminální oblast obsahuje KDEL ER-retenční sekvenci s mnohočetnými místy s vysokou kapacitou pro Ca^{2+} a vazebná místa pro navázání se na povrch buňky a faktory srážení krve. Kalretikulin je kódován genem CALR na 19. chromozomu. Somatické mutace v exonu 9 CALR jsou druhou nejčastější získanou nukleotidovou změnou u Philadelphia negativních myeloproliferativních neoplazií (MPNs), kromě polycythaemia vera (PV). Nejčastěji se vyskytující mutace jsou L367fs*46 (mutace Typ 1), kterou reprezentuje 52-bp delece ohraničená 7 páry bází identické sekvence a K385fs*47 (mutace Typ 2), která inzercí 5-bp posouvá čtecí rámec.

Vyšetření exonu 9 genu CALR zjednoduší konfirmační proces a zvýší diagnostickou přesnost u pacientů s MPN, kteří jsou BCR/ABL a JAK2V617F negativní.

2.6.2.9 Molekulárně genetické vyšetření mutace genu MPL

MPL gen je lokalizován na chromozomu 1p34 a kóduje receptor pro trombopoetin, hematopoetický růstový faktor. Vyšetřované typy mutací v genu MPL jsou, W515L, W515K, W515A a S505N. Mutace v genu MPL W515L a W515K je nejčastěji spojována s pacienty postiženými MPN s vyšetřením JAK2 V617F-negativní. Získané somatické mutace v exonu 10 genu MPL (především dvě nejčastěji reportované mutace W515L a W515K) ovlivňují aktivaci JAK/STAT signální dráhy. Záměna aminokyseliny na pozici 515 konstitutivně aktivuje trombopoetinový receptor, což vede k nadprodukci abnormálních megakaryocytů a zvýšené tvorbě destiček. Detekce získaných mutací v genu MPL doplňuje molekulárně biologická vyšetření při podezření na MPN. Nejpočetnější skupinou jsou – esenciální trombocytémie (ET), primární myelofibrózy (PMF) a pravá polycytémie (PV).

2.6.2.9 Molekulárně genetické vyšetření mutace genu APOE

Gen APOE, se nachází na chromozomu 19q13.32. Skládá se ze čtyř exonů a tří intronů. APOE se vyskytuje ve třech hlavních alelách ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ a $\epsilon 4$): APOE- $\epsilon 2$ (cys112, cys158), APOE- $\epsilon 3$ (cys112, arg158) a APOE- $\epsilon 4$ (arg112,18). Přestože se tyto alelické formy od sebe liší pouze jednou nebo dvěma aminokyselinami na pozicích 112 a 158, tyto rozdíly mění strukturu a funkci APOE. Varianta E4 je největším známým genetickým rizikovým faktorem, významně zvyšuje predispozice k Alzheimerově chorobě s pozdním začátkem. U varianty E2 dochází v závislosti na vlivu dalších faktorů k rozvoji hyperlipoproteinémie typu III. Izoforma E4 v heterozygotní, ale hlavně homozygotní konstituci, je predikujícím faktorem pro akcentaci procesu aterosklerózy díky zvýšené hladině LDL cholesterolu. Pokud se spojí přítomnost varianty E4 s dalšími vnějšími

rizikovými faktory může se výrazně zvyšovat možnost vzniku infarktu myokardu. Pacienti s izoformou E4 oproti pacientům s izoformou E2 hůře reagují na léčbu statiny.

3. MANUÁL PRO ODBĚRY PRIMÁRNÍCH VZORKŮ

V této kapitole jsou popsány správné způsoby odběru a identifikace primárních vzorků biologického materiálu, včetně uvedení optimálního množství vzorků pro jednotlivá vyšetření. Obsažené informace jsou důležité nejen pro pracovníky laboratoře, ale zejména pro odesílající lékaře a personál zodpovědný za odběry a označení primárních vzorků, za manipulaci se vzorky v době od odběru do transportu, za dodržení správných podmínek transportu a předání vzorků a žádanek do Laboratoře molekulární diagnostiky a cytogenetiky (LMDC). Správný způsob odběru primárních vzorků a správná manipulace s nimi do doby převzetí laboratoří jsou důležité pro správný výsledek vyšetření. Pracovníci provádějící odběr primárních vzorků potvrzují svým podpisem na žádance, že odběr primárního vzorku byl proveden podle pokynů uvedených v tomto manuálu. Každý primární vzorek (nádobka s biologickým materiálem) musí být jednoznačně identifikován a do laboratoře musí být dodán s nalepeným identifikačním štítkem, vyplněnou žádankou o vyšetření a informovaným souhlasem.

3.1. IDENTIFIKACE PRIMÁRNÍHO VZORKU

Vzorky biologického materiálu bez řádné identifikace se v laboratoři nesmí vyskytovat.

Každý vzorek biologického materiálu musí být označen nalepeným identifikačním štítkem, na kterém jsou uvedeny takové údaje, aby byla zajištěna jednoznačná identifikace a nezaměnitelnost vzorku.

Pracovník provádějící odběr vzorku nalepí na odběrovou nádobu identifikační štítek s těmito údaji:

- Jméno a příjmení pacienta.
- Rodné číslo (číslo pojištění).
- Identifikační číslo pacienta vygenerované (u nepojištěných cizinců nebo samoplátců).
- Popř.: druh vyšetření.

Za jednoznačné označení vzorku odpovídá pracovník provádějící odběr biologického materiálu!

3.2. ŽÁDANKA PRO LABORATORNÍ VYŠETŘENÍ

K dispozici na odkazech:

F-01-2025-020 Žádanka na molekulárně genetické vyšetření

F-01-2025-067 Žádanka na cytogenetické a FISH vyšetření

Pracovník provádějící odběr primárního vzorku zapisuje na žádanku:

- Jméno a příjmení pacienta.
- Rodné číslo (číslo pojištění).
- Datum narození.
- Identifikační číslo pacienta (u nepojištěných cizinců – samoplátců).
- Pohlaví pacienta – nutno vyplnit políčko muž/žena (u cizinců není možné ze jména a rodného čísla identifikovat pohlaví pacienta).
- Kód zdravotní pojišťovny pacienta.
- Klinickou diagnózu pacienta.
- Titul, jméno a příjmení, odbornost a IČP lékaře požadujícího vyšetření.
- Podpis lékaře a razítko, kde je uveden telefon a oddělení.

- Datum odběru primárního vzorku.
- Požadovaná laboratorní vyšetření.
- Typ primárního vzorku.
- Kdo provedl odběr.
- Kdo vystavil žádanku.
- Jako nepovinný údaj je možno uvést bydliště či telefonní číslo pacienta.

Za správnost vyplnění žádanky zodpovídá sestra, popřípadě jiný pracovník pověřený indikujícím lékařem. Lékař svým podpisem potvrzuje správnost údajů na žádance. Veškeré údaje musí být vyplněny čitelně. Údaje psané rukou musí být vždy čitelné a požadavky jednoznačně formulované.

Do Laboratoře molekulární diagnostiky a cytogenetiky je možno zaslat rovněž elektronickou žádanku vygenerovanou pomocí systému FONS Enterprise. Tato však musí obsahovat výše uvedené body.

Pokud chybí žádanka, informovaný souhlas, není možno jednoznačně identifikovat biologický materiál nebo jsou základní údaje nečitelné, je laboratoř oprávněna vyšetření odmítnout.

3.3. INFORMOVANÝ SOUHLAS

K dispozici na odkazu:

01-IS-21-2022-001 Informovaný souhlas s genetickým laboratorním vyšetřením

Informovaný souhlas vyšetřované osoby s genetickým laboratorním vyšetřením je součástí lékařské dokumentace pacienta a je uložen v kartě pacienta. **Kopie je vždy zasílána spolu s žádankou do Laboratoře molekulární diagnostiky a cytogenetiky.**

Bez informovaného souhlasu není možné provést žádné genetické vyšetření! Indikující lékař je zodpovědný za správné informování pacienta před genetickým vyšetřením.

3.4. POŽADAVKY NA URGENTNÍ VYŠETŘENÍ (STATIM)

Vzorky, u kterých je požadováno přednostní vyšetření („STATIM“) jsou dodávány do laboratoře s žádankou vyplněnou stejně jako u vzorků zpracovávaných v běžném režimu, avšak na papírové žádance je navíc zaškrtnuto políčko „STATIM“ nebo na elektronické žádance je uvedeno označení „STATIM“.

3.5. POUŽÍVANÝ ODBĚROVÝ SYSTÉM

Primární vzorky biologického materiálu musí být do laboratoře dodávány ve sterilních jednorázových odběrových zkumavkách.

Odběrový systém pro PERIFERNÍ KREV:

- cytogenetické a FISH vyšetření: zkumavky Vacuette LH Lithium Heparin se **zeleným vrškem**
- molekulárně diagnostické vyšetření (PCR): zkumavky Vacuette K₃EDTA s **fialovým vrškem**

Odběrový systém pro KOSTNÍ DŘEŇ:

- cytogenetické vyšetření: sterilní zkumavky Vacuette LH Lithium Heparin se **zeleným vrškem**

3.6. PŘÍPRAVA PACIENTA PŘED VYŠETŘENÍM

Před odběrem periferní krve pro genetické vyšetření není nutná žádná zvláštní příprava pacienta.

Odběr kostní dřeně se provádí aspirační biopsií v lokální anestezii z hrudní kosti nebo z lopaty kosti kyčelní punkční jehlou.

3.7. POSTUP PRO ODBĚR VZORKU

3.7.1. Odběr kostní dřeně

Aspirační biopsie kostní dřeně se provádí zpravidla v lokální anestézii z hrudní kosti nebo z lopaty kosti kyčelní punkční jehlou. Jehla se zavede rotačním pohybem do kosti a odsaje se potřebné množství kostní dřeně (maximálně 150 ml, v závislosti na váze pacienta).

Z celého objemu odebraného materiálu jsou aspirovány **2-3 ml** do zkumavky Vacuette LH Lithium Heparin se **zeleným vrškem**, který zabraňuje srážení krve.

- Odběr pro cytogenetická vyšetření (Karyotyp, FISH):

Množství odebrané kostní dřeně je 2-3 ml. Vzorky k cytogenetickému vyšetření nejsou stabilní, je třeba je dodat do laboratoře co nejdříve po odběru. Vzorky je možné krátkodobě skladovat při teplotě 4 °C, vzorky nemrazit! Vzorky je nutné dodat co nejdříve do laboratoře!

Zkumavka pro cytogenetické vyšetření z buněk kostní dřeně: Vacuette LH Lithium Heparin se **zeleným vrškem**. Odběrové zkumavky dodává laboratoř molekulární diagnostiky a cytogenetiky (LMDC).

3.7.2. Odběr periferní krve

Pro genetické vyšetření požadujeme **žilní krev**, která musí být **odebrána mezi prvními zkumavkami**, používá se **nesrážlivá krev**.

Krev se odebírá z periferní žíly v loketní jamce. Paže se volně položí, dezinfikuje se místo vpichu – **nesmí se použít dezinfekce s obsahem jódu**, která by mohla být příčinou neúspěšné kultivace. Po stabilizování polohy se provede vpich jehlou s nasazeným nástavcem a poté se na nástavec nasadí příslušná zkumavka. Po odběru se místo vpichu zakryje čtverečkem z buničiny, opatrně se přitlačí a vytáhne se jehla. Nakonec se místo vpichu přelepí náplastí. Pacient je požádán, aby si místo vpichu tiskl asi ještě 5 minut a po 20 minutách si náplast odstranil.

- Odběr pro **cytogenetické (VCHA,) a FISH vyšetření**

Množství odebrané krve je **4 ml** a je nutné dodržet poměr protisrážlivého činidla a vzorku (odebírat po rysku na zkumavce). **Ihned po odběru** je nutno zkumavku **promíchat** opakovaným opatrným obracením!

Zkumavka pro cytogenetická vyšetření: se **zeleným vrškem (LH Lithium Heparin)**.

- Odběr pro **molekulárně diagnostická vyšetření**

a) **trombofilní mutace genů FII a FV, HFE, TPMT, Celiakální sprue, DPYD a CALR, MPL, APOE:**

Množství odebrané krve pro tato vyšetření je **2 ml** a je nutné dodržet poměr protisrážlivého činidla a vzorku (odebírat po rysku na zkumavce). **Ihned po odběru** je nutno zkumavku **promíchat** opakovaným opatrným obracením!

b) **mutace genu JAK2, přítomnost fúzního genu BCR::ABL1:**

Množství odebrané krve pro tato vyšetření je **6 ml** a je nutné dodržet poměr protisrážlivého činidla a vzorku (odebírat po rysku na zkumavce). **Ihned po odběru** je nutno zkumavku **promíchat** opakovaným opatrným obracením a dodat co nejdříve do laboratoře!

Zkumavka pro molekulárně genetické vyšetření: s **fialovým vrškem (K₃EDTA)**.

Odběr pro dlouhodobé uchování DNA

Množství odebrané krve pro dlouhodobé uchování DNA je **6 ml**, je nutné dodržet poměr protisrážlivého činidla a vzorku (odebírat po rysku na zkumavce). **Okamžitě po odběru** je nutno zkumavku **promíchat** opakovaným opatrným obracením a dodat co nejdříve do laboratoře!

Zkumavka pro izolaci a dlouhodobé uchování DNA: s **fialovým vrškem (K₃EDTA)**.

Uchování vzorků kostní dřeně:

Odebraná kostní dřeň ve zkumavce LH Lithium Heparin se uchovává při laboratorní teplotě 18 až 25 °C maximálně 2 hodiny. Materiál je nutné dopravit do laboratoře co nejrychleji.

Uchování vzorků periferní krve:

Zkumavky s periferní krví je možno ponechat maximálně po dobu 2-4 hodin po odběru při teplotě do 25 °C, pokud je doba příjmu do laboratoře delší než 4 h, je nutno uchovávat vzorky v chladničce při 2 až 8 °C a chránit je před zmrazením nebo přehřátím.

Hlavní chyby při odběrech krve:

Chyby vedoucí k hemolýze vzorku:

Hemolýza znemožňuje jak izolaci DNA a následnou PCR při molekulárně genetických vyšetřeních, tak i kultivaci lymfocytů pro cytogenetická vyšetření.

Hemolýzu způsobuje:

- Použití vlhké odběrové soustavy.
- Znečištění jehly nebo pokožky stopami ještě tekutého dezinfekčního prostředku.
- Použití příliš úzké jehly, kterou se pak krev násilně nasává.
- Prudké třepání krve ve zkumavce (k tomu dochází i při nešetrném transportu krve ihned po odběru).
- Použití nesprávné koncentrace protisrážlivého činidla.

Chyby vedoucí ke koagulaci vzorku:

Koagulace způsobuje znehodnocení vzorku biologického materiálu při veškerých vyšetřeních prováděných v genetické laboratoři.

Koagulaci způsobuje:

- Použití nevhodné odběrové zkumavky bez protisrážlivého činidla.
- Protrahovaný odběr.
- Nesprávné a nedostatečné promíchání s protisrážlivým činidlem v odběrové zkumavce.

Chyby při adjustaci, skladování a transportu:

- Nevhodné zkumavky.
- Nesprávné protisrážlivé činidlo.
- Nesprávné a nedostatečné promíchání obsahu zkumavky po odběru.
- Nedostatečné označení zkumavky s odebraným biologickým materiálem.
- Zkumavky po odběru jsou potřísněny krví.
- Krev byla vystavena teplu nebo mrazu.
- Krev byla vystavena přímému slunečnímu světlu.

3.8. OPERACE SE VZORKEM, STABILITA, TRANSPORT

Odebrané vzorky biologického materiálu je nutno dodat do laboratoře LMDC v dobře uzavřených odběrových nádobkách **nejpozději následující den po provedení odběru!**

Kostní dřev: Vhodnou transportní nádobou pro zkumavky s odebranou kostní dřeví je termoska. Materiál je nutné dopravit do laboratoře co nejrychleji, nejpozději do 2 hodin po odběru při pokojové teplotě. Vzorky je možné krátkodobě skladovat při teplotě 4 °C.

Periferní krev: Pokud je materiál dopraven do laboratoře maximálně do 4 h po odběru, nemusí být vzorky chlazené. Pokud je tato doba delší než 4 h, musí být přepravovány v chlazeném boxu 2-8 °C!

Při transportu musí být zajištěno:

- Doprava primárních vzorků musí být rychlá a šetrná.
- Musí být dodržen čas a podmínky transportu.
- Žádanky a informované souhlasy musí být umístěny odděleně od zkumavek se vzorky, aby nedošlo k případnému potřísnění žádanek/informovaných souhlasů při náhodném porušení celistvosti zkumavek.

Interní žadatelé (v rámci areálu KNTB) – biologický materiál se dopravuje do laboratoře: potrubní poštou, donáškovou službou KNTB, svépomocí z jednotlivých oddělení.

Zajištění svozu vzorků: svoz vzorků z KNTB je realizován podle aktuálního plánu donáškové služby KNTB

Zásady zasílání biologického materiálu potrubní poštou KNTB:

- Neplňte zkumavky odebraným biologickým materiálem až po zátku – jinak zátky špatně drží; uzavřete řádně zátku zkumavky, kontejneru.
- Zabezpečte zkumavky v patroně tak, aby nemohlo dojít k jejich rozbití!!
- Vložte zkumavky např. do PVC sáčku a uzavřete sešívačkou – stačí 2x.
- Žádanky/informované souhlasy k vyšetření přiložte zvlášť k již zabalenému materiálu a sepněte sponkou. Nedávejte žádanky a materiál do jednoho obalu!!
- V případě akutního odběru nebo zahlcení potrubní pošty, je nutno odebraný materiál dopravit svépomocí nebo donáškovou službou.

Externí žadatelé – zajištění svozu vzorků do laboratoře: svozovou službou, svépomocí

3.9. ZÁKLADNÍ INFORMACE K BEZPEČNOSTI PŘI PRÁCI SE VZORKY

- Každý vzorek krve je nutné považovat za potenciálně infekční.
- Žádanky/informované souhlasy ani vnější strana zkumavky nesmí být kontaminovány biologickým materiálem – toto je důvodem k odmítnutí vzorku!

4. PREANALYTICKÉ PROCESY V LABORATOŘI

4.1. PŘÍJEM VZORKŮ DO LABORATOŘE

Příjem vzorků se uskutečňuje na úseku příjmu OLM a ten je dále předává přímo do laboratoře LMDC. V LMDC začíná příjem kontrolou úplnosti a shody údajů na žádance, informovaném souhlasu a odběrové nádobce.

4.1.1. Identifikace pacienta na štítku zkumavky

Přijímající pracovník (příjem materiálu OLM) zkontroluje neporušenost zkumavek s primárními vzorky, zda nejsou potřísněny biologickým materiálem.

Po této zevní kontrole jsou vzorky odeslány na příjem LMDC (3. NP), kde je provedena kontrola správnosti a úplnosti údajů na vzorcích, žádankách a informovaných souhlasech a jejich vzájemná shoda. Dále je proveden

zápis do Příjmové knihy Genetika, Laboratorního deníku Izolace NK/Cytogenetika/FISH a zápis do databáze LIMS-genetika. Tento laboratorní systém vygeneruje pro každý vzorek unikátní číslo, pod kterým vzorek prochází laboratorním vyšetřením až do chvíle, než je uzavřen a vyexpedován výsledek.

Do databáze LIMS-genetika se zapisuje:

- Jméno a příjmení pacienta.
- Rodné číslo (RČ) popř.: identifikační číslo pacienta (u nepojist. cizinců – samoplátců).
- Pojišťovna.
- Diagnóza.
- Datum a čas odběru vzorku.
- Datum a čas příjmu vzorku.
- Jméno a identifikační údaje odesílajícího lékaře, IČL a oddělení nemocnice (odesílající centrum).
- Typ vzorku.
- Požadované vyšetření.
- Popř.: adresa pacienta.

4.1.2. Kritéria pro přijetí nebo odmítnutí vadných (nestandardních) primárních vzorků

Vyšetření NENÍ PROVEDENO

Nesoulad v základních identifikačních znacích žádanky, informovaného souhlasu a vzorku biologického materiálu • jméno a příjmení pacienta • rodné číslo pacienta • u cizinců nebo samoplátců identifikační číslo • informace o odesílajícím oddělení a žadateli	→ vyšetření není provedeno
Žádanka nesouhlasí s totožností pacienta • žádanka dospělého pacienta od pediatra • žádanka muže od gynekologa • žádanka ambulantního pacienta z lůžkového oddělení • žádanka hospitalizovaného pacienta z ambulance • žádanka dítěte pod 10 let od jiného lékaře než pediatra	→ vyšetření není provedeno
Nesprávná identifikace biologického materiálu • identifikace na zkumavce neobsahuje současně jméno a příjmení pacienta a rodné číslo (číslo pojištěnce) popř. rok narození • přijde vyplněná žádanka bez biologického materiálu	→ žádající pracoviště je telefonicky informováno a je vyžádán nový odběr
Je porušen obal (část materiálu vytekl při transportu atd.)	→ materiál není přijat k dalšímu zpracování
Není správně proveden odběr	→ materiál není přijat k dalšímu zpracování, je vyžádán nový odběr
Žádanka na opakované vyšetření vrozené mutace pacienta nebo karyotypu (vyšetřuje se 1x za život)	→ vyšetření není provedeno, požadujícímu oddělení je zaslán opis předchozího výsledku

Vyšetření JE PROVEDENO

Žádanka nebo informovaný souhlas nejsou řádně vyplněny (schází některé povinné údaje: diagnóza, pojišťovna, IČP ordinujícího lékaře, razítko a podpis lékaře, odbornost, datum odběru, požadované vyšetření)	→ telefonicky se zjistí potřebná informace nebo se vyžádá nová žádanka, biologický materiál je přijat a zpracován
Žádanka <u>nebo</u> informovaný souhlas zcela chybí	→ materiál je uložen do lednice a z požadujícího pracoviště je telefonicky vyžádán chybějící dokument → pokud je během pracovního dne dokument dodán, vzorek je zpracován → pokud dokument není dodán do konce pracovního dne, je vyžádán nový odběr s novou žádankou
Odběr nedostatečného množství materiálu	→ vyšetření se provedou v pořadí podle důležitosti pro indikujícího lékaře
Vzorek byl omylem odeslán do LMDC	→ pracovník na příjmu pošle vzorek na příslušné oddělení, pokud se vyšetření v LMDC neprovádí, vzorek je ihned nebo při nejbližší příležitosti předán svozové službě
Pacient nemá pojištění nebo má jiný typ pojištění, než vyžaduje KNTB	→ kontaktuje se žadatel a zjistí se, kdo bude vyšetření platit, vystaví se faktura

4.2. MANIPULACE SE VZORKY A SKLADOVÁNÍ MATERIÁLU PŘED VYŠETŘENÍM

Periferní krev zpracovávaná na úseku molekulární genetiky je před vyšetřením skladována v lednici na vyhrazeném místě při teplotě 2-8 °C. Do max. 7 dní od odběru je vyzolována DNA. RNA je vyzolována nejpozději následující den po dodání biologického materiálu do laboratoře.

Periferní krev pro cytogenetické vyšetření je před vyšetřením skladována na vyhrazeném místě v chladničce při teplotě 2–8 °C maximálně 5 dnů od dodání do laboratoře.

4.3. SMLUVNÍ LABORATOŘE A NEJČASTĚJI PROVÁDĚNÁ VYŠETŘENÍ PRO PACIENTY LMDC

Laboratoř LMDC má zajištěnou tuto smluvní laboratoř:

Integrovaná laboratoř molekulární cytogenetiky

Oddělení genetiky a molekulární biologie ÚEB Přírodovědecké fakulty MU v Brně a OLG FN Brno

- **vyšetření chromozomových aberací pomocí techniky fluorescenční hybridizace in situ (FISH)** a jejich modifikací.

5. FÁZE PO VYŠETŘENÍ

Vyšetření je ukončeno vypracováním *Protokolu* z daného vyšetření, který je spolu s žádankou a informovaným souhlasem uložen v laboratoři pro každého pacienta nebo skupinu pacientů. Následně se připraví jako výstup z LIMS-genetika **Konečný výsledek**, který je zkontrolován a podepsán vedoucí laboratoře a odeslán indikujícímu lékaři. V rámci cytogenetické laboratoře se navíc posílá **Obrazová příloha konečného výsledku**, která je výstupem z karyotypovacího systému LUCIA nebo LUCIA – FISH.

Laboratoř není oprávněna interpretovat výsledky pacientům, toto je výhradně v kompetenci lékařů indikujících vyšetření.

Biologický materiál je po vyšetření uchováván nebo likvidován podle typu vyšetření.

5.1. SKLADOVÁNÍ PRIMÁRNÍCH VZORKŮ A CYTOGENETICKÝCH PREPARÁTŮ PO VYŠETŘENÍ, ARCHIVACE VZORKŮ S PATOLOGICKÝM NÁLEZEM

- Úsek molekulární genetiky:

Plná krev je uchovávána v původních zkumavkách po dobu vyšetření a do vydání výsledků při 2-8 °C, poté je likvidována.

DNA/RNA pacientů, kteří si v informovaném souhlase přejí uložení a archivaci izolátu, je skladována při -60 až -80 °C po dobu 50 let.

DNA/RNA izolovaná z primárních vzorků pacientů, kteří si nepřejí uložení a archivaci DNA, je po vydání výsledků likvidována.

- Úsek cytogenetiky:

Plná krev je uchovávána po dobu 5 dnů od nasazení buněčné kultury, poté je likvidována.

Kostní dřeň je celá zpracována, neuchovává se.

Cytogenetické preparáty jsou po napruhování, nabarvení a vyhodnocení uchovávány 10 let při teplotě ± 25 °C. **Fixované suspenze lymfocytů** jsou archivovány v mrazáku při teplotě -18 až -25 °C po dobu 10 let. Veškeré cytogenetické preparáty s **patologickým nálezem** jsou archivovány trvale.

5.2. LIKVIDACE BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU PO VYŠETŘENÍ

Veškeré odběrové nádoby se zbytky primárních vzorků jsou po vydání výsledků přemístěny do sběrných nádob určených k likvidaci. Vzhledem k potencionálně infekčnímu charakteru všech primárních vzorků je s nimi po provedeném vyšetření nakládáno jako s nebezpečným odpadem podle nemocniční směrnice 01-SM-P-016 Nakládání s odpady.

5.3. DODATEČNÉ VYŠETŘENÍ

Dodatečné vyšetření je možné provést v závislosti na časovém intervalu mezi odběrem primárního vzorku a dodatečným požadavkem. V případě dodatečného molekulárně genetického vyšetření z periferní krve, kdy pacient podepsal souhlas s uložením DNA, lze vzorek došetřit bez časového omezení, pokud je k dispozici dostatečné množství DNA.

Dodatečné cytogenetické vyšetření je možné z opakované kultivace nebo z uložené suspenze lymfocytů periferní krve v závislosti na časovém odstupu a typu požadovaného dodatečného vyšetření; v případě delšího časového odstupu je nutné provést opakovaný odběr.

Na dodatečné vyšetření požaduje laboratoř novou žádanku a informovaný souhlas s indikací klinického genetiky.

6. VYDÁVÁNÍ VÝSLEDKŮ A KOMUNIKACE S LABORATOŘÍ

6.1. FORMA VYDÁVANÝCH VÝSLEDKŮ

Kontrola výsledků

Každý výsledek genetického vyšetření je kontrolován a uvolněn z laboratorního informačního systému atestovaným VŠ pracovníkem. Veškeré operace prováděné během vyšetření jsou dohledatelné a autorizované podpisem příslušného pracovníka.

Vydávání výsledků

LMDC vydává výsledky vyšetření vždy v elektronické formě, výjimečně na žádost indikujícího lékaře i v písemné formě.

Zprávy jsou vytištěny a odeslány podle typu vyšetření lékařům s odpovídající odborností požadujícím vyšetření.

Pacientům interpretuje výsledky vždy lékař s odpovídající odborností!

6.1.1. Telefonické sdělování výsledků

Laboratoř není oprávněna interpretovat výsledky pacientům, toto je výhradně v kompetenci lékařů indikujících vyšetření. Výsledky veškerých genetických vyšetření mají charakter tajné zprávy, a tudíž není možné nahlédnout do výsledků přes NIS z jiného než indikujícího pracoviště. Indikující pracoviště musí použít přístupové heslo pro nahlížení do výsledků genetických vyšetření. Telefonicky hlásíme výsledky indikujícímu lékaři v případě:

- STATIM vyšetření
- záchytu patologického výsledku

6.1.2. Komunikace s lékařem indikujícími vyšetření

Zprávy o **cytogenetickém vyšetření** a **zprávy o molekulárně genetickém vyšetření** jsou předány indikujícímu lékaři, který komunikuje s pacienty a informuje je o výsledku vyšetření. V ojedinělých akutních případech je možné telefonické sdělení výsledku indikujícímu lékaři. Telefonické sdělení výsledků je evidováno v LIMS-genetika, jako tzv. **Komentář k výsledku** v Příjmu pacienta. Je uvedeno, kdo výsledek nahlásil a komu a kdy byl výsledek nhlášen. Tento údaj po potvrzení nelze přepsat či odstranit.

6.2. KONEČNÝ VÝSLEDEK

Konečné výsledky mají různé formy podle typu vyšetření.

Konečné výsledky v podobě papírové obsahují:

- Identifikaci pacienta (jméno a RČ), číslo vzorku, diagnózu.
- Identifikaci laboratoře, která výsledek vydala.
- Identifikaci vyšetření.
- Identifikaci požadujícího subjektu.
- Datum odběru vzorku.
- Datum příjmu vzorku.
- Typ primárního vzorku.
- Datum tisku zprávy.
- Výsledek vyšetření.
- Jméno osoby, která vzorek hodnotila.
- Jméno a podpis osoby kontrolující výsledek a uvolňující *Konečný výsledek*.
- Popř.: doporučení (s kontaktem na klinického genetika) a komentář (např. kvalita primárního vzorku, která mohla nežádoucím způsobem ovlivnit výsledek).

Konečné výsledky jsou zasílány v zalepených obálkách indikujícím lékařům interní poštou (v rámci areálu KNTB) a poštou nebo svozovou službou (externí žadatelé).

6.3. VYDÁVÁNÍ VÝSLEDKŮ PŘÍMO PACIENTŮM

Konečný výsledek vyšetření z LMDC s vlastními výsledky není možné předat pacientovi.

6.4. ÚHRADA VYŠETŘENÍ SAMOPLÁTCI A CIZINCI

Momentálně nejsou v nabídce žádná vyšetření pro samoplátce.

6.5. ZMĚNY VÝSLEDKŮ A NÁLEZŮ

A. Oprava identifikace pacienta

Opravou identifikace pacienta se rozumí oprava rodného čísla a změna nebo významná oprava příjmení a jména pacientů, příp. způsobu pojištění. Pracovník laboratoře opraví data v databázi předepsaným způsobem, vedoucí laboratoře opravu zkontroluje, podepíše a propustí výsledek, vytiskne nový **Konečný výsledek** a odešle jej s případným komentářem indikujícímu lékaři.

Oprava se zaznamená v laboratoři v dokumentaci pacienta. Data jsou opraveny na základě upozornění z odesílajícího oddělení.

B. Oprava výsledkové části

Opravou výsledkové části se rozumí oprava (změna údajů) textové informace u odeslaných **Konečných výsledků**.

Pokud některý pracovník zjistí, že byl výsledek špatně stanoven a odeslán, informuje vedoucího laboratoře nebo jeho zástupce. Ten rozhodne, jak se výsledek opraví. Co nejdříve se domluví s odesílajícím lékařem na zaslání opraveného **Konečného výsledku**, na kterém je napsáno REVIZE VÝSLEDKU a na změně záznamu v LIMS-genetika.

Laboratoř eviduje opravu výsledkové části v LIMS-genetika a v rámci cytogenetického vyšetření i v databázi LUCIA. Změna nálezu musí být zaznamenána v dokumentaci pacienta s datem a jménem osoby odpovědné za tuto změnu. V laboratoři je uložen původní výsledek a nový **Konečný výsledek** s vysvětlením, jaký byl důvod změny nálezu. Událost musí být zaznamenána do **formuláře Záznam o neshodě F-GEN112 Deníku neshod při zpracování vzorků** a nahlášena na oddělení kvality KNTB.

C. Záměna biologického materiálu odesílajícím oddělením

Vzorky budou zlikvidovány, událost zaznamenána do **formuláře Záznam o neshodě F-GEN112 Deníku neshod při příjmu vzorků** a událost je nahlášena na oddělení kvality KNTB. Následně jsou vyžádány nové vzorky spolu s novými žádankami a informovanými souhlasy.

6.6. DOBY TRVÁNÍ JEDNOTLIVÝCH VYŠETŘENÍ OD PŘÍJMU VZORKU DO LABORATOŘE

• Vyšetření vrozených chromozomových aberací z kultivovaných lymfocytů periferní krve (VCHA):

Výsledky jsou do systému uvolněny do 15 pracovních dnů.

Při požadavku na „STATIM“ jsou výsledky vydány do 10 pracovních dnů.

• Vyšetření chromozomových aberací z buněk kostní dřeně:

Výsledky vyšetření jsou zpravidla uvolněny do 17 pracovních dnů. Na základě nejasné patologie se doba uvolnění výsledku může prodloužit po telefonické konzultaci s indikujícím lékařem. Doba uvolnění výsledku by měla být nejdéle 21 pracovních dnů.

Při požadavku na „STATIM“ jsou výsledky vydány do 10 pracovních dnů.

• Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

Výsledky jsou do systému uvolněny do 15 pracovních dnů.

Při požadavku na „STATIM“ jsou výsledky vydány do 10 pracovních dnů.

- **Vyšetření mutací JAK2, BCR::ABL1, TPMT, HFE, trombofilních mutací FII a FV, Celiakální sprue, DPYD, CALR, MPL, APOE:**

Jednotlivá vyšetření se zpracovávají po skupinách – výsledek do 10 pracovních dnů.

Pokud je třeba znát výsledek dříve, je nutno vzorek na žádance označit jako „STATIM“ a výsledky jsou vydány do 2 pracovních dnů.

- **Výsledek samostatné izolace NK:**

Izolační protokol musí být uvolněn do 10 pracovních dnů. Pokud je třeba znát výsledek dříve, je nutno vzorek na žádance označit jako „STATIM“ a protokol je schválen do 1 pracovního dne.

Nedodržení očekávaného času dodání výsledku

V laboratoři se mohou vyskytnout neočekávané provozní problémy - např. porucha přístroje, výpadek elektrického proudu. O změně času dodání výsledků informuje laboratoř ta oddělení, kterých se vzniklý problém týká a případně se domluví na přednostních vyšetřeních. Krizové situace řeší vedoucí laboratoře, jednou z možností je odeslání vzorku do spolupracujících laboratoře.

6.7. KONZULTAČNÍ ČINNOST LABORATOŘE

Upozornění a komentáře k výsledkům ovlivňující interpretaci jsou uvedeny v textové části **Konečného výsledku**. Individuální konzultace jsou umožněny kontaktem s odbornými pracovníky. Laboratoř průběžně informuje všechny klienty o změnách, které se týkají laboratorních služeb, úměrně jejich závažnosti. Vedoucí laboratoře nebo jeho zástupce telefonicky upozorňuje na chyby indikujících oddělení, informuje o aktuálních provozních událostech, zodpovídá dotazy nebo reaguje na připomínky k práci laboratoře.

6.8. ZPŮSOB ŘEŠENÍ STÍŽNOSTÍ

Postup při převzetí a řešení stížnosti klientů je popsán na webových stránkách: <https://www.kntb.cz/postup-pri-vyrizovani-stiznosti>

Veškerá opatření a aktivity v rámci kontroly kvality směřují k tomu, aby stížnosti vůbec nevznikaly. Každý pracovník genetické laboratoře je povinen převzít stížnost. O každé stížnosti musí být informován vedoucí laboratoře a musí být zapsána do [formuláře Záznam o neshodě F-GEN112](#) ~~Deníku neshod~~.

7. ZÁVĚREČNÉ USTANOVENÍ

Tato Laboratorní příručka nabývá platnosti dnem podpisu představenstva KNTB a účinnosti nabývá dnem uvedeným na titulní straně. Ode dne účinnosti jsou zaměstnanci KNTB povinni se touto Laboratorní příručkou řídit a při jejím nedodržení je možné uplatňovat příslušné sankce.

Dnem účinnosti tohoto vnitřního předpisu se ruší Laboratorní příručka verze č. 1.6. ze dne 1. 10. 2020. Zpracovatel je povinen 1x za 2 roky provést revizi tohoto dokumentu a vždy při změně legislativy. Pokud to stav vyžaduje, musí zpracovatel zajistit vypracování nového vydání Laboratorní příručky nebo jeho změnu. Vedoucí laboratoře je odpovědná za seznámení svých podřízených s tímto dokumentem do 14 dnů od jeho vydání.

8. PŘÍLOHA 1 LIST ZMĚN A REVIZÍ

Strana	Datum	Číslo změny / Oprava / Výměna (číslo kapitoly, článku apod.)	Podpis
6	18.1.2023	Změna č. 1 / 2.5. Přehled nabízených vyšetření – přidána metoda	Mgr. Nikola Glosová
8	18.1.2023	2.6.2.7 Molekulárně genetické vyšetření – přidána kapitola	Mgr. Nikola Glosová
11	18.1.2023	3.7.1. Odběr periferní krve – přidána metoda	Mgr. Nikola Glosová
17	18.1.2023	6.6. Doba trvání jednotlivých vyšetření od příjmu vzorků do laboratoře – přidána metoda	Mgr. Nikola Glosová
6	15.4.2024	Změna č. 2 / 2.5. Přehled nabízených vyšetření – přidána metoda	Mgr. Nikola Glosová
7	15.4.2024	2.6.1.2. – nová podkapitola	Mgr. Nikola Glosová
7	15.4.2024	2.6.1.3. - podkapitola doplněna o nové vyšetření	Mgr. Nikola Glosová
11	15.4.2024	Odběrový systém pro KOSTNÍ DŘEŇ	Mgr. Nikola Glosová
11	15.4.2024	3.7.1. Odběr kostní dřevě – nová podkapitola	Mgr. Nikola Glosová
12	15.4.2024	Uchování vzorků kostní dřevě:	Mgr. Nikola Glosová
13	15.4.2024	3.8. OPERACE SE VZORKEM, STABILITA, TRANSPORT – přidán materiál	Mgr. Nikola Glosová
16	15.4.2024	Doplněno o materiál	Mgr. Nikola Glosová
18	15.4.2024	6.6 doplněno o materiál	Mgr. Nikola Glosová
6	10.1.2025	Změna č 3 / 2.5 Přehled nabízených vyšetření – přidána metoda MPL	Mgr. Nikola Malinová
9	10.1.2025	2.6.2.9. - podkapitola doplněna o nové vyšetření	Mgr. Nikola Malinová
12	10.1.2025	3.7.2 Odběr periferní krve a) doplněno o nové vyšetření	Mgr. Nikola Malinová
19	10.1.2025	6.6 doba trvání vydání výsledku byla změněna pro vyšetření karyotyp kostní dřevě, přidáno nové vyšetření MPL	Mgr. Nikola Malinová
4,10	12.5.2025	Změna č. 4 / Kapitoly 1.4 a 3.2 / aktualizace žádanek	Mgr. Nikola Malinová
6, 9, 12, 19	12.5.2025	Kapitoly 2.5, doplněno vyšetření, 2.6.2.9 nová kapitola vyšetření APOE, 3.7.2 doplněno vyšetření, 6.6 doplněno vyšetření	Mgr. Nikola Malinová
19, 20	12.2.2026	Změna č. 5 / 6.5, 6.8 – úprava textu	Mgr. Nikola Malinová

REVIZE

	Revize č. 1	Revize č. 2	Revize č. 3
Datum revize			
Výsledek revize	Dokument vyhověl – nevyhověl*	Dokument vyhověl – nevyhověl*	Dokument vyhověl – nevyhověl*
Revidující odp. osoba			
Podpis			

**) – nehodící se škrtněte*