



Laboratorní příručka

ZÁKAZ KOPÍROVÁNÍ
Řízený dokument

	Jméno	Podpis
Vypracoval:	Mgr. Martina Smitalová	
Schválil:	doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.	

Rozdělovník

Č. v.	Funkce	Jméno	Podpis
1	Manažer kvality	Mgr. Martina Smitalová	

Seznam revizí

Datum revize	závěr revize	datum příští revize	schválil
8.7.2012	Oprava kontaktů	2013	
28.1.2013	Přidány náležitosti řízené dokumentace	2014	
7.1.2015	Provedena aktualizace	3/ 2015	
20.5.2015	Provedena aktualizace	1/2016	
14.1.2016	Provedena aktualizace	1/2017	
12.1.2017	Provedena aktualizace	1/2018	
14.11.2017	Provedena aktualizace	1/2019	



LABORATORNÍ PŘÍRUČKA

Ústav molekulární a translační medicíny
Laboratoř experimentální medicíny
při LF UP a FN Olomouc

Obsah

Rozdělovník.....	1
LABORATORNÍ PŘÍRUČKA.....	2
1. ZÁKLADNÍ INFORMACE O LEM - ÚMTM.....	6
1.1. Statut a důležité údaje.....	6
1.2. Umístění.....	6
1.3. Personální obsazení.....	7
1.4. Zaměření činnosti laboratoří LEM - ÚMTM.....	8
1.5. Úroveň a stav akreditace LEM.....	8
1.6 Flexibilní akreditace.....	8
1.7. Organizace LEM.....	9
1.7.1. Přehled laboratorních útvarů LEM:.....	9
1.8. Spektrum a popis služeb.....	11
1.8.1 DNA laboratoř.....	11
1.8.2 RNA laboratoř.....	12
1.8.3 Cytogenetická laboratoř.....	13
1.8.4 Laboratoř buněčné biologie.....	14
2. ODBĚRY BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU.....	15
2.1. Příprava pacienta před odběrem biologického materiálu.....	15
2.1.1 Příručka pro odběr vzorku C_SOP_01 Vyšetření cytogenetických změn metodou fluorescenční in situ hybridizace (FISH).....	15
2.1.2 Příručka pro odběr vzorku C_SOP_03 Testování kvality přímo značených DNA sond, používaných v in vitro diagnostice pro cytogenetická vyšetření.....	16
2.1.3 Pokyny pro odběr vzorků nádorové tkáně, periferní krve a kostní dřeně pro vyšetření minimální reziduální choroby (C_SOP_07) Vyšetření exprese epiteliálních genů	



a onkogenů metodou reverzně-transkriptázové polymerázové řetězové reakce v reálném čase (real-time RT-PCR)	17
2.1.4 Pokyny pro odběr vzorku (C_SOP_14) Detekce chromozomálních aberací na celogenomové úrovni metodou microarrays	19
2.1.5 Pokyny pro odběr vzorku pro detekce chromozomálních aberací plodu na celogenomové úrovni metodou microarrays C_SOP_16.....	20
2.1.6 Příručka pro odběr vzorku C_SOP_10 Vyšetření somatických mutací a polymorfismů genů pomocí PCR nebo sekvenování	21
2.1.7 Pokyny pro odběr vzorku pro C_SOP_15_ Detekce a genotypizace HPV polymerázovou řetězovou reakcí a hybridizací se sondou v rámci specializovaného Komplexního onkologického centra	22
2.1.8 Pokyny pro odběr vzorku pro Klinické celoexomové sekvenování pro detekci zárodečných genetických variant u dědičných onemocnění C_SOP_17	23
2.1.9 Příručka pro odběr vzorku pro stanovení buněčného cyklu a/nebo ploidity pomocí průtokové cytometrie dle C_SOP_04 Vyšetření ploidity, obsahu a distribuce DNA metodami průtokové cytometrie	24
2.1.10 Příručka pro odběr vzorku C_SOP_05 Vyšetření exprese antigenů a ověření kvality protilátek metodou průtokové cytometrie.....	25
2.1.11 Příručka pro odběr vzorku C_SOP_06 Vyšetření exprese onkoproteinů metodou nepřímé imunohistochemie (IHC).....	27
3. Uchování a přeprava vzorků.....	29
3.1 Uchování a přeprava vzorků	29
3.2. Identifikace pacienta na žádance a označení vzorku	30
3.2.1 Zacházení se vzorky.....	30
3.2.2 Příjem a manipulace se vzorky a referenčními materiály.....	30
3.2.3 Identifikace vzorků	30
3.2.4 Abnormality při příjmu.....	30
3.2.5 Ochrana a uchování vzorků.....	31
4. VÝSLEDKY.....	34
4.1. Doba odezvy:.....	34
4.2. Vydávání výsledků.....	34
4.3. Hlášení výsledků v kritických intervalech	34
4.4. Vydávání výsledků přímo pacientům a dalším osobám	34



4.5. Změny výsledků a nálezů	34
4.5.1. Chyba ze strany žadatele	34
4.5.2. Chyba v rámci LEM	34
4.5.3. Vyznačení změny výsledkové zprávy	35
4.6. Konzultační činnost LEM	35
4.7. Způsob řešení stížností	35
4.7.1. Reklamacce výsledku	35
4.7.2. Stížnosti	35
5. ODKAZY	36
5.1. Pokyny pro pacienty a pro oddělení	36
5.2. Vzory žádank o vyšetření	36



ÚVOD

Tato laboratorní příručka je jedním ze stěžejních dokumentů klinické laboratoře podle ISO 15189:2012.

Jejím úkolem je seznámit uživatele služeb laboratoře, žadatele o laboratorní vyšetření, se spektrem nabízených služeb, s pravidly a předpoklady jejich racionálního požadování, s podmínkami odběru, skladování a transportu biologických materiálů a s možnostmi správné interpretace a využití výsledků laboratorních vyšetření.

Laboratorní příručka je k dispozici pouze v elektronické podobě na internetových stránkách LEM - ÚMTM (<http://lem.ocol.cz/cs/laboratorni-prirucka> a <https://www.imtm.cz/diagnostika>).

Podle potřeb klinické a laboratorní praxe jsou jednotlivé informace v Laboratorní příručce průběžně aktualizovány.



1. ZÁKLADNÍ INFORMACE O LEM - ÚMTM

1.1. Statut a důležité údaje

Laboratoř experimentální medicíny při LF UP a FNOL je součástí Ústavu molekulární a translační medicíny

Zkratka: LEM - ÚMTM nebo LEM

Ředitel LEM - ÚMTM: doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.

Adresa: Hněvotínská 5, 779 00 Olomouc

Sekretariát: Mgr. Zuzana Přichystalová

Telefon: 585 632 111

Fax: 585 632 180

E-mail: info@imtm.cz

Vedoucí laboratoří

Vedoucí CL (Cytogenetická laboratoř): RNDr. Radek Trojanec, Ph.D.

Vedoucí DL (DNA laboratoř): prof. Mgr. Jiří Drábek, Ph.D.

Vedoucí RL (RNA laboratoř): MUDr. Josef Srovnal, Ph.D.

Vedoucí LBB ******(Laboratoř buněčné biologie): MUDr. Petr Džubák, Ph.D.

******LBB je akreditována podle normy 17025:2005

Telefon na příjem vzorků 585 632 132

1.2. Umístění

LEM - ÚMTM má pracoviště v samostatném objektu ÚMTM v areálu Fakultní nemocnice Olomouc



1.3. Personální obsazení

Mgr. Karolína Bartáková	Odborný pracovník v DL
Renata Buriánová	Laborantka v LBB**
Mgr. Barbora Blumová	Laborantka v DL
Mgr. Zuzana Přichystalová	Asistentka ředitele
Mgr. Zuzana Šporiková	Odborný pracovník v CL
prof. Mgr. Jiří Drábek, PhD.	VL DL, Odborný pracovník v DL, Interní auditor
MUDr. Petr Džubák, PhD.	VL LBB, Odborný pracovník v LBB
Mgr. Ivo Frydrych, PhD.	Odborný pracovník v LBB**
doc. MUDr. Marián Hajdúch, PhD.	Ředitel ÚMTM
Veronika Holinková, DiS.	Laborantka v DL
Mgr. Anna Janošťáková	Vedoucí laborantka v LBB, Technická vedoucí
Mgr. Marta Khoylou, PhD.	Zástupce VL LBB**, Odborný pracovník v LBB, Interní auditor
Mgr. Magdalena Houdová Megová	Odborný pracovník v CL
Mgr. Vladimíra Koudeláková, PhD.	Zástupce VL CL, Odborný pracovník v CLBc.
Jan Moucha	Počítačový analytik
Soňa Mičochová	Vedoucí laborantka v CL, Technická vedoucí
Mgr. Hana Jaworek	Odborný pracovník v DL
Mgr. Andrea Prokopová***	Zástupce VL RL, Odborný pracovník v RL***
Mgr. Kateřina Štaffová	Laborantka v RL, metrolog
Mgr. Helena Štefanová	Laborantka v DL
Mgr. Hanuš Slavík	Odborný pracovník v RL
Ing. Rastislav Slavkovský, Ph.D.	Odborný pracovník v DL, zástupce VL DL
Mgr. Martina Smitalová	Manažer kvality, Interní auditor
MUDr. Josef Srovnal PhD.	Vedoucí RL, Odborný pracovník v RL, Interní auditor
Mgr. Jana Stránská, PhD.***	Zástupce VL DL, Odborný pracovník v DL***
RNDr. Radek Trojanec, PhD.	Vedoucí CL, Odborný pracovník v CL, Interní auditor
Mgr. Monika Vidlařová	Odborný pracovník v RL
Mgr. Petr Vojta	Odborný pracovník v DL

* uvedeni pouze pracovníci, kteří zajišťují provádění akreditovaných metod

**LBB je akreditována podle normy 17025:2005

*** Mateřská dovolená



1.4. Zaměření činnosti laboratoří LEM - ÚMTM

Cílem LEM je poskytovat kompletní laboratorní servis v oblasti onkologie a cílené onkologické léčby.

Další činnost je referenční, expertizní, výzkumná a výuková.

Laboratoř zavedla a provádí celou řadu různých metodik používaných v základním i klinickém výzkumu i v rutinní diagnostice: blotovací techniky (Western, Northern, Southern), fluorescenční *in situ* hybridizaci (FISH), různé typy PCR, ELISA techniky, flow-cytometrické techniky, cytotoxické a buněčně-proliferací testy, techniky tkáňových kultur, transfekce, transformace, klonování a exprese genů a proteinů, imunofluorescenční/imunohistochemické procedury, laserovou mikrodisekci, microarrays, masivně paralelní sekvenování atd.

LEM provádí vysoce specializovaná rutinní laboratorní vyšetření v oblasti onkologických onemocnění dětí i dospělých. Spádová oblast má nadregionální úroveň a pro některá vyšetření zahrnuje celou Českou republiku. Některá vyšetření jsou protokolárně vyžadována k indikaci další léčby (např. amplifikace genu Her-2/neu u aplikace Herceptinu, trastuzumabu, u pacientek s karcinomem prsu či žaludku).

LEM dále zajišťuje rutinní molekulárně genetická a cytogenetická vyšetření u solidních nádorů, vyšetření chemorezistence u hematologických malignit i solidních nádorů. Z dalších vyšetření provádíme stanovení ploidity nádorových buněk průtokovou cytometrií, detekci cirkulujících nádorových buněk u karcinomů prsu, plic, kolorekta a slinivky břišní technikou real-time PCR, detekci methylace DNA, diferenciální diagnostiku tumorů neznámého původu, detekci onkogenních virů, stanovení sérových hodnot endotelinu 1, stanovení změn počtu kopií DNA u různých typů onemocnění a další vyšetření.

1.5. Úroveň a stav akreditace LEM

LEM je od roku 2007 akreditována dle normy ISO 17 025, od roku 2013 také dle normy ISO 15 189

1.6 Flexibilní akreditace

U metody C_SOP_10 a C_SOP_17 využíváme flexibilitu parametrů/komponent/předmětů analýzy podle ILAC-G18:04/2010, MPA 00-09-xx. Reagujeme na žádost zákazníka o vyšetření dalšího genu (nebo panelu genů) tak, že jej seznámíme s naším flexibilním validačním postupem (s časovým plánem a očekávanými parametry metody). Pokud zákazník souhlasí, provedeme validaci a nahlásíme novou metodu na ČIA.

U metody C_SOP_10 se jedná o:



Parametry - různé přístroje firmy Illumina na stejném principu, zachovávající klíčové parametry pokrytí a délky sekvenovaných ampliconů, ale lišící se obrátkovostí a cenou vyšetření (MiSeq, HiSeq, NovaSeq, MiniSeq, iSeq100)

Komponenty – různé typy tagování a barcoding

Předměty analýzy - rozdílné geny v reálném genovém panelu, vybrané na základě odborných doporučení a požadavků klientů, zaměněné nebo přidáné k dosavadnímu seznamu genů. Různá nádorová onemocnění.

U metody C_SOP_17 se jedná o:

Parametry - různé přístroje firmy Illumina na stejném principu, zachovávající klíčové parametry pokrytí a délky sekvenovaných ampliconů, ale lišící se obrátkovostí a cenou vyšetření (HiSeq, MiSeq, NovaSeq, MiniSeq, iSeq100)

Komponenty - reálný genový panel vs celoexomové sekvenování

Předměty analýzy - rozdílné virtuální genové panely vybrané z výsledku celoexomového sekvenování na základě ontologie.

Seznam aktuálně prováděných vyšetření je na vyžádání u garanta flexibility prof. Mgr. Jiřího Drábka, PhD. k dispozici.

1.7. Organizace LEM

1.7.1. Přehled laboratorních útvarů LEM:

Akreditované zkoušky na ÚMTM provádí pouze LEM. LEM tvoří čtyři laboratoře: Cytogenetická laboratoř (CL), RNA laboratoř (RL), DNA laboratoř (DL) a Laboratoř buněčné biologie (LBB).

Na akreditované činnosti se v těchto laboratořích v současnosti podílí asi 30 pracovníků (Př. 06). Další činnost je referenční, expertizní, výzkumná a výuková (studenti LF UP, PŘF UP, popř. jiných vysokých škol).

Úlohou Cytogenetické laboratoře (CL) a DNA laboratoře (DL) je kromě vyšetření prediktivních a prognostických markerů pacientů FNOL také verifikace vyšetření těchto markerů ze spádových oblastí a to u pacientů, kteří jsou indikováni pro cílenou léčbu (Herceptin, Iressa, Tarceva apod.). Tyto laboratoře jsou součástí systému Laboratoří prediktivní onkologie (LPO), vytvořeného Onkologickou společností za podpory zdravotních pojišťoven. Úkolem LPO je rovněž poskytování metodik, srovnávacích vzorků a konzultační činnosti pro spádová pracoviště. CL současně provádí výzkum dalších nádorových genů jako prediktorů léčby s použitím fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH, Fluorescence *in situ* hybridisation).

Úkolem DNA laboratoře (DL) je studium a výzkum deoxyribonukleové kyseliny (DNA) na subchromozomové úrovni. DL provádí především analýzu vybraných onkogenů a tumor-



supresorových genů, popřípadě jejich methylačního statusu, pomocí polymerázové řetězové reakce s měřením v reálném čase (PCR) nebo sekvenováním.

Úkolem RNA laboratoře (RL) je především studium a výzkum ribonukleových kyselin (RNA). RL provádí detekci cirkulujících nádorových buněk u nejčastějších solidních nádorů dospělého věku. RL se dále zabývá analýzou změn počtu kopií DNA u pacientů s různými typy onemocnění za využití microarrays metod.

Laboratoř buněčné biologie (LBB, **LBB je akreditována podle normy 17025:2005) provádí histochemická a imunohistochemická vyšetření tkáňových řezů, cytospinů a kultivovaných buněčných linií. Provádí techniky průtokové cytometrie (zahrnující vyšetření buněčné ploidity, analýzu buněčného cyklu, stanovení povrchových a intracelulárních znaků buněčných populací imunofluorescenční metodou), elektroforetické metody s navazujícími blotovacími technikami a metody tkáňových kultur, mezi které patří stanovení farmakologických vlastností sloučenin.



1.8. Spektrum a popis služeb

Nabídka vyšetření prováděných na LEM je pro zájemce přístupná v elektronické podobě na <http://www.umtm.cz/cs/diagnostika> a <http://lem.ocol.cz>

Žádanky o jednotlivá vyšetření jsou k dispozici na webu ÚMTM v sekci diagnostika v podsekcí jednotlivých pracovišť.

1.8.1 DNA laboratoř

Vedoucí pracovník: Prof. Mgr. Jiří Drábek, Ph.D.

Hlavní činnost DNA laboratoře je zaměřena na vyšetření mutací genů *EGFR* u pacientů s karcinomem plic, *RAS* u pacientů s karcinomem a kolorekta a *BRAF* u pacientů s melanomem. Je nutné to omezovat na diagnózy?? Laboratoř je vybavena nejmodernější technikou např.: real-time cyklérem Light Cycler 480, masivně paralelním sekvenátorem MiSEQ.

Prováděná vyšetření

- Detekce bodových a delečních mutací genu *EGFR* u pacientů s karcinomem plic. Na základě tohoto vyšetření je stanovena prognóza léčebné odpovědi na inhibitory egfr1 (např. Tarceva).
- qPCR pro detekci bodové mutace v genu pro Nijmegen breakage syndrome
- qPCR pro detekci bodové mutace v genu *BRAF*
- qPCR pro detekci bodové mutace *IDH1, IDH2, MDM2, NQO1*
- Masivně paralelní sekvenování genů *KRAS, NRAS a BRAF* u pacientů s nádorovým onemocněním kolorekta a dalšími nádory. Mutace genu *KRAS* je negativním prognostickým a prediktivním faktorem u pacientů s mnoha nádorovými diagnózami.
- Masivně paralelní sekvenování genů, asociovaných s kardiomyopatiemi
- Masivně paralelní sekvenování exomu
- MethyLight PCR detekce methylace genu *MGMT*
- Komparativní PCR kvantifikace jednořetězcových zlomů v gDNA
- Detekce HPV
- Detekce dalších mutací a polymorfismů dle klinických požadavků



1.8.2 RNA laboratoř

Vedoucí pracovník: MUDr. Josef Srovnal, Ph.D.

Hlavní činnost RNA laboratoře je zaměřena na detekci cirkulujících nádorových buněk (CTCs) u solidních nádorů dospělého věku, zejména u karcinomů prsu, plic, kolorekta a slinivky břišní a na diferenciální diagnostiku metastáz neznámého původu. Dále se RNA laboratoř zabývá analýzou změn počtu kopií DNA u pacientů s různými typy onemocnění za využití microarrays metod. Laboratoř je vybavena nejmodernější technikou např. Light Cycler LC 480 II (Roche), Agilent 2100 Bioanalyzer, Spektrofotometr Nanodrop ND 1000, Affymetrix 3000 7G Scanner, včetně Hybridization oven 645 a Fluidic station 450.

Prováděná vyšetření

- Detekce (CTCs) u pacientů s kolorektálním karcinomem. U pacientů s kolorektálním karcinomem vyšetřujeme na přítomnost CTCs vzorky krve (systémové, event. i portální) a kostní dřeně, vše metodou real-time RT-PCR za použití RNA karcinoembryonálního antigenu (CEA) a cytokeratinu 20 (CK20) jako markerů nádorových buněk.
- Detekce CTCs u pacientek s karcinomem prsu. Zabýváme se detekcí mikrometastatického postižení sentinelových uzlin u pacientek s karcinomem prsu. Na přítomnost CTCs vyšetřujeme i vzorky krve a kostní dřeně, vše metodou real-time RT-PCR za použití RNA mamaglobinu a karcinoembryonálního antigenu jako markerů nádorových buněk.
- Detekce CTCs u pacientů s karcinomem pankreatu. Metodika se zabývá detekcí diseminovaných nádorových buněk u pacientů s karcinomem pankreatu. Vyšetřují se vzorky systémové krve, kostní dřeně a peritoneální laváže, vše metodou real-time RT-PCR za použití RNA lidské telomerázy (hTERT) a karcinoembryonálního antigenu jako markerů nádorových buněk.
- Detekce CTCs u pacientů s karcinomem plic. Metodika na detekci okultních nádorových buněk u pacientů s karcinomem plic. Vyšetřují se vzorky systémové krve (event. krve z plicní žíly) a kostní dřeně, vše metodou real-time RT-PCR za použití RNA karcinoembryonálního antigenu (CEA) a receptoru pro epidermální růstový faktor 1 (EGFR1) a plicního specifického proteinu (LUNX1) jako markerů nádorových buněk.
- Diferenciální diagnostika metastáz neznámého původu. Na základě vyšetření exprese vybraných markerů určujeme s vysokou pravděpodobností původ metastáz či výpotků neznámé etiologie.
- Analýza změn počtu kopií DNA u pacientů s různými typy onemocnění. Předmětem vyšetření je genomická DNA pacienta získaná z leukocytů periferní krve. Vyšetření je prováděno na microarray platformě s využitím kitu Cytoscan HD (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA), který nabízí nejširší pokrytí genomu s citlivostí vyšší než 99%, kdy lze



spolehlivě detekovat 25-50 kbp změny počtu kopií (CNV). Více než 2,6 milionu markerů pokrývá všechny OMIM® a RefSeq geny.

1.8.3 Cytogenetická laboratoř

Vedoucí pracovník: RNDr. Radek Trojanec, Ph.D.

Cytogenetikou solidních nádorů se zabýváme v Laboratoři experimentální medicíny (LEM) již od roku 1999. Od 1. 7. 2001 se naše pracoviště stalo společně s Ústavem patologie LF UP Olomouc součástí Referenční laboratoře pro stanovení HER-2/neu (c-erbB2), později transformované na Laboratoř prediktivní onkologie (systém Laboratoří prediktivní onkologie, vytvořený součinností Onkologické společnosti ČSL JEP a zdravotních pojišťoven), viz výše.

Příklady dalších rutinně vyšetřovaných cytogenetických prognostických a prediktivních faktorů:

- Gen *HER-2/neu*
- Gen pro topoizomerázu II α (*TOP2A*)
- Gen *N-MYC*
- Gen *C-MYC*
- Gen pro cyklin D1 (*CCND1*)
- Gen pro androgenní receptor
- ALK aberace genu *EGFR*
- Aberace genu *ALK*
- Aberace genu *ROS* a *RET*
- Rozlišení vysokostupňových a nízkostupňových stádií gliomů
- Další geny a chromozomální oblasti, dle dostupnosti cytogenetických sond a požadavků zákazníka

Přehled používaných metodik:

- Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) - akreditovaná metoda
- Komparativní genomická hybridizace (CGH) - neakreditovaná metoda
- Testování kvality přímo značených DNA sond, používaných v *in vitro* diagnostice pro cytogenetická vyšetření - akreditovaná metoda.



1.8.4 Laboratoř buněčné biologie

(**LBB je akreditována podle normy 17025:2005)

Vedoucí pracovník: MUDr. Petr Džubák, Ph.D.

Laboratoř buněčné biologie se skládá z Pracoviště průtokové cytometrie a Imunohistochemického pracoviště.

Metody:

- Vyšetření buněčného DNA obsahu metodami průtokové cytometrie (buněčný cyklus, ploidita, možnost retrospektivní analýzy archivní deparafinizované nádorové tkáně)
- Vyšetření exprese antigenů a ověření kvality protilátek metodou průtokové cytometrie (imunofenotypizace lymfocytů periferní krve pomocí kitu IMK – lymphocyte kit, exprese P-glykoproteinu)
- Stanovení exprese proteinu EGFR 1
- Stanovení exprese proteinu HER2/neu
- Ověřování funkčnosti protilátek
- Vyšetření míry DNA poškození pomocí stanovení fosforylovaného histonu H2A.X. (Ser 139) metodou imunohistochemické detekce



2. ODBĚRY BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU

2.1. Příprava pacienta před odběrem biologického materiálu

RL, DL, LBB ani CL neprovádí přímý odběr vzorků.

Převážná část vzorků je odebrána na Onkologické, Chirurgické či Dětské klinice FN Olomouc nebo na Ústavu lékařské genetiky FN Olomouc a dále pochází z patologických oddělení zákazníků. Vedení LEM si je vědomo toho, že kvalifikovaný odběr má nezanedbatelný vliv na výsledek zkoušky. Proto spolupracuje s pracovišti, kde je odběr prováděn a neustále se zabývá vývojem a zaváděním postupů vhodných pro odběr vzorků.

2.1.1 Příručka pro odběr vzorku C_SOP_01 Vyšetření cytogenetických změn metodou fluorescenční in situ hybridizace (FISH)

- **nativní materiál** (pooperační, bioptická tkáň): vložit do transportního média (k dispozici na LEM) a nejpozději do 24 hodin (čím dříve, tím lépe) dodat do LEM
- **parafinové bloky**: celé bloky či parafinové řezy dodat do LEM. V případě parafinových řezů doporučujeme tloušťku 4-6 μm , imobilizovaných na pozitivně nabitým skle (pro každou sondu minimálně jeden řez)

V případě parafinových bloků či řezů doporučujeme držet se standardních postupů - např. tkáň po fixaci v 4% pufovaném formaldehydu (inkubace přes noc) dehydratovat ethanolovou řadou (70%, 80% a 96% ethanol, vždy 45 minut), dále inkubovat v acetonu (45'), xylenu (45') a následně ve 3 parafinových lázních (3x 45'). Upozorňujeme, že v zejména dofixování vzorků nad plamenem, prodloužená fixace, nevhodné pH či použití jiného fixačního postupu může znehodnotit vzorek pro vyšetření cytogenetickými a molekulárně genetickými metodami.

Vzorek je nutno předat k vyšetření s vyplněnou žádankou! Vzor doporučené žádanky na vyšetření lze získat na <http://www.umtm.cz/cs/diagnostika> a <http://lem.ocol.cz>, avšak principiálně jsou akceptovány všechny žádanky obsahující informace k provedení vyšetření a jeho vykázání zdravotní pojišťovně.

Kontakt:

RNDr. Radek Trojanec, Ph.D.

Vedoucí cytogenetické laboratoře LEM - ÚMTM

Tel.: 585 632 089

Radek.trojanec@upol.cz

Zástupce vedoucího cytogenetické laboratoře:

Mgr. Vladimíra Koudeláková, PhD.



Tel.: 585 632 089

Vladimira.koudelakova@upol.cz

Prof. Mgr. Jiří Drábek, Ph.D.

Jiri.drabek@upol.cz

Tel.: 585 632 070

MUDr. Josef Srovnal, Ph.D.

Josef.srovnal@upol.cz

Tel.: 585 632 137

Další kontakty na pracovníky Cytogenetické laboratoře LEM - ÚMTM jsou v aktuální podobě uvedeny na stránkách <http://www.umtm.cz/cs/diagnostika> a <http://lem.ocol.cz>

Doba odezvy:

Výsledky jsou odesílány do týdne po převzetí primárního vzorku, pokud jinak nestanoví požadavek na žadance, který byl schválen odpovědným pracovníkem.

2.1.2 Příručka pro odběr vzorku C_SOP_03 Testování kvality přímo značených DNA sond, používaných v *in vitro* diagnostice pro cytogenetická vyšetření

Kit dodat za podmínek specifikovaných výrobcem.

Vzorek je nutno předat k vyšetření s vyplněnou žádankou! Vzor doporučené žádanky na vyšetření lze získat na <http://www.umtm.cz/cs/diagnostika> a <http://lem.ocol.cz>, avšak principiálně jsou akceptovány všechny žádanky obsahující informace k provedení vyšetření a jeho vykazání zdravotní pojišťovně.

Kontakt:

RNDr. Radek Trojanec, Ph.D.

Vedoucí cytogenetické laboratoře LEM - ÚMTM

Tel.: 585 632 089

radek.trojanec@upol.cz

Zástupce vedoucího cytogenetické laboratoře:

Mgr. Vladimíra Koudeláková, Ph.D. (MD)

Tel.: 585 632 089

Vladimira.koudelakova@upol.cz

Prof. Mgr. Jiří Drábek, Ph.D.

Jiri.drabek@upol.cz

Tel.: 585 632 070

MUDr. Josef Srovnal, Ph.D.



Josef.srovnal@upol.cz

Tel.: 585 632 137

Další kontakty na pracovníky Cytogenetické laboratoře LEM - ÚMTM jsou v aktuální podobě uvedeny na stránkách <http://www.umtm.cz/cs/diagnostika> a <http://lem.ocol.cz>

Doba odezvy:

Řešena individuálně, se zákazníkem.

2.1.3 Pokyny pro odběr vzorků nádorové tkáně, periferní krve a kostní dřeně pro vyšetření minimální reziduální choroby¹ (C_SOP_07) Vyšetření exprese epiteliálních genů a onkogenů metodou reverzně-transkriptázové polymerázové řetězové reakce v reálném čase (real-time RT-PCR)

Pokyny pro odběr krve a kostní dřeně do zkumavek s EDTA.

- Periferní krev a kostní dřeň se odebírá v množství **10 ml, resp. 3 ml, do standardních zkumavek s EDTA. Ne do heparinu!** Doporučujeme odebírat z důvodu možné kontaminace vzorku kožními epitelii až druhou porci vzorku nebo provádět odběr, např. u kostní dřeně, z drobné incize.
- Zkumavky po odběru **několikrát otočit**, aby se dokonale promíchal vzorek s EDTA a nedošlo ke koagulaci vzorku.
- **Kostní dřeně odebírat maximálně 3 ml** z jednoho vpichu, poté je již odebírána periferní krev!
- Takto odebrané a řádně popsané vzorky včetně správně vyplněné žádanky **transportovat neprodleně** do Laboratoře experimentální medicíny k dalšímu zpracování. **Nikde neskladovat, nemrazit, nechladit!**

Příjem vzorků na vyšetření přítomnosti cirkulujících nádorových buněk není nutno objednávat, ale je dobré o plánovaném odeslání vzorku informovat laboratoř na tel. 585 632 137.

Dotazy na telefonu 585 632 137 nebo e-mailu josef.srovnal@upol.cz



Pokyny pro odběr tkáně do roztoku RNA Later

- Vzorky tkáně se **okamžitě po odběru** vloží do 1,5 ml zkumavek obsahující 700 µl roztoku RNA Later. V roztoku jsou obsaženy inhibitory enzymů RNáz, tkáň se v roztoku stabilizuje a je při připravena pro další analýzy RNA, DNA nebo proteinů.
- V případě precipitace roztoku RNA Later (hrudky, zakalení apod.) stačí zkumavky před použitím zahřát na 37°C a protřepat. Pokud ani po zahřátí a protřepání hrudky nezmizí, použijte novou zkumavku s RNA Laterem
- **Vzorek tkáně musí být v roztoku zcela ponořen** (tj. zkumavka ve vertikální poloze!), **optimální rozměr tkáně je 3x3x3 mm**. Žádný parametr by neměl přesahovat 5 mm, protože jinak roztok tkáně neprostoupí, ta nebude dostatečně stabilizovaná a může dojít k degradaci vzorku. Doporučujeme odebrat 2 - 3 vzorky této velikosti do jedné zkumavky.
- Takto uložený vzorek je stabilní při pokojové teplotě, není pro něj důležitá rychlá přeprava k následnému zpracování. Zkumavku s řádně ponořeným vzorkem nechat do dalšího dne po odběru při pokojové teplotě, aby RNA Later dokonale prostoupil fixovanou tkáň, následující dny uschovat v lednici při 2-8°C, maximálně však po dobu 14 dnů, poté raději zamrazit na -20°C.
- Transport do Laboratoře experimentální medicíny může proběhnout ihned po odběru v nezamražené formě při okolní teplotě, nebo s časovým odstupem v zamražené formě, např. na suchém ledu.

Tkáň je stabilní:	1 den:	37°C
	7 dní:	18 - 25°C
	4 týdny:	2 - 8°C (lednice)
	dlouhodobě:	-20 nebo -80°C

Zkumavky s RNA Laterem jsou připraveny v LEM - ÚMTM.

Příjem vzorků v RNA Lateru na vyšetření není nutno objednávat.

Dotazy na telefonu 585 632 137 nebo e-mailu josef.srovnal@upol.cz

Pokyny pro odběr krve a kostní dřeně do Tempus Blood RNA Tubes

- Podrobný originální návod včetně bezpečnostních upozornění je součástí průvodního balení zkumavek.
- Tempus Blood RNA Tubes jsou zkumavky obsahující stabilizační roztok a vakuum, které natáhne max. 3 ml krve.
- Vzorky by měly být odebírány pomocí originálního odběrového kitu, tak aby nedošlo ke zpětnému toku stabilizačního roztoku do krevního řečiště pacienta. Vzorky lze však odebrat i běžným samoodběrovým kitem.



- Správně popsat vzorky! Zabránit kontaminaci vzorku epiteliálními buňkami, tj. nepoužít první porce krve nebo kostní dřeně. Po odběru 10x otočit zkumavku, aby se vzorek a stabilizační roztok dokonale promíchal!
- Vzorky krve a kostní dřeně jsou v Tempus Blood RNA Tubes stabilní max. 5 dnů při pokojové teplotě, max. 7 dnů v lednici a dlouhodobě při -20°C . Po odběru musí zkumavka stát min. 2 hodiny při pokojové teplotě, aby došlo k dokonalé fixaci jaderných buněk a lýze erytrocytů.
- Transport do Laboratoře experimentální medicíny může proběhnout ihned po odběru v nezamražené formě při okolní teplotě, nebo s časovým odstupem v zamražené formě, např. na suchém ledu.
- Tempus Blood RNA Tubes zkumavky jsou připraveny po dohodě v LEM.
- Příjem vzorků v Tempus Blood RNA Tubes zkumavkách na vyšetření není nutno objednávat, ale je dobré o plánovaném odeslání vzorku informovat laboratoř na tel. 585 632 137.

Dotazy na telefonu 585 632 137 nebo e-mailu josef.srovnal@upol.cz

Pokyny pro odběr peritoneální laváže

- Peritoneální laváž provedená fyziologickým roztokem se odebírá v množství max. 200 ml do připravených sterilních lahví, které obsahují EDTA a fetální telecí sérum.
- Lahev s peritoneální laváží **několikrát otočit**, aby se dokonale promíchal vzorek s EDTA a sérem.
- Takto odebrané a řádně popsané vzorky včetně správně vyplněné žádanky **transportovat neprodleně** do Laboratoře experimentální medicíny k dalšímu zpracování. **Nikde neskladovat, nemrazit, nechladit!**
- Příjem vzorků peritoneální laváže na vyšetření není nutno objednávat, ale je dobré o plánovaném odeslání vzorku informovat laboratoř na tel. 585 632 137.

Lahve pro odběr peritoneální laváže jsou připraveny po dohodě v LEM.

Dotazy na telefonu 585 632 137 nebo e-mailu josef.srovnal@upol.cz

Doba odezvy:

28 dnů od přijetí vzorku nebo po domluvě se zákazníkem

2.1.4 Pokyny pro odběr vzorku (C_SOP_14) Detekce chromozomálních aberací na celogenomové úrovni metodou microarrays

- DNA získaná izolací z leukocytů periferní krve



- RNA laboratoř neprovádí vzorkování. Předmětem vyšetření je DNA o dostatečné kvalitě a čistotě získaná standardními izolačními postupy z čerstvých leukocytů periferní krve. Do microarray analýzy přijímáme vzorky s koncentrací nad 50 µg/ml a čistotou mezi A 260/280 1,8 - 2,1. Vzorek je nutno dodat k vyšetření s vyplněnou žádankou, jejíž vzor lze nalézt na <http://www.umtm.cz/cs/diagnostika> a <http://lem.ocol.cz>.
- Vzorek DNA lze doručit při pokojové teplotě v řádně označené zkumavce.
- Příjem vzorků na vyšetření chromozomálních aberací metodou microarrays není nutno objednávat, ale je dobré o plánovaném odeslání vzorku informovat laboratoř na tel. 585 632 132.
- Dotazy na telefonu 585 632 137 nebo e-mail josef.srovnal@seznam.cz

Doba odezvy:

2 měsíce od přijetí vzorku nebo po domluvě se zákazníkem

2.1.5 Pokyny pro odběr vzorku pro detekce chromozomálních aberací plodu na celogenomové úrovni metodou microarrays C_SOP_16

- LEM-ÚMTM neprovádí vzorkování. Předmětem vyšetření je DNA získaná standardními izolačními postupy z buněk choriových klků (CVS) nebo amniocytů plodové vody (AMC) nebo jejich kultivačních produktů nebo buněk produktů koncepce. Po přijetí LEM-ÚMTM provede kontrolu kvality DNA (měření čistoty a koncentrace), event. provede zahuštění na požadovanou koncentraci min. 50 µg/ml. Vzorek je nutno dodat k vyšetření s vyplněnou žádankou, jejíž vzor lze nalézt na <http://www.umtm.cz/cs/diagnostika>.
- Vzorek DNA lze doručit při pokojové teplotě v řádně označené zkumavce.
- Příjem vzorků na vyšetření chromozomálních aberací metodou microarrays není nutno objednávat, ale je dobré o plánovaném odeslání vzorku informovat laboratoř na tel. 585 632 132.
- Dotazy na telefonu 585 632 137 nebo e-mail josef.srovnal@upol.cz

Kontakt:

MUDr. Josef Srovnal, Ph.D.

Vedoucí RNA laboratoře LEM - ÚMTM

Tel.: 585 632 137

Josef.srovnal@upol.cz

Další kontakty na pracovníky RNA laboratoře LEM - ÚMTM jsou v aktuální podobě uvedeny na stránkách <http://www.umtm.cz/cs/diagnostika> a <http://lem.ocol.cz>



2.1.6 Příručka pro odběr vzorku C_SOP_10 Vyšetření somatických mutací a polymorfismů genů pomocí PCR nebo sekvenování

- Ke každému vzorku je nutné dodat řádně vyplněnou žádanku, v níž musí být náležitě identifikován lékař oprávněný indikovat vyšetření (včetně adresy klinického žadatele a jeho telefonního spojení). Dále musí obsahovat jednoznačnou identifikaci pacienta, včetně čísla zdravotní pojišťovny a údaj o datu a času odběru krevního vzorku.
- Vyšetření mutací a polymorfismů genů (např. *KRAS*, *NRAS*, *EGFR*, *BRAF*) polymerázovou řetězovou reakcí s detekcí v reálném čase anebo sekvenováním

Přestože naše laboratoř neprovádí vzorkování, preanalytická fáze zásadním způsobem ovlivňuje kvalitu vyšetření. Je proto nezbytné, aby vzorek byl odebrán a doručen do laboratoře způsobem, který uchová DNA ve stavu, umožňujícím genotypizaci, a aby vzorek před naším vyšetřením přezkoumal patolog. Před vyšetřením tak může vyřadit vzorky, ve kterých:

- není přítomna nádorová tkáň nebo je jí přítomno malé procento
- je tkáň nekrotizovaná
- tkáň obsahuje nádory jiného typu, než pro které je vyšetření indikováno.

Pro odběr **krve, kostní dřeně** nebo odběr **tkáně do RNAlater** platí postup uvedený pro C_SOP_07.

Parafinizovaná tkáň:

Velmi častým způsobem archivace tkání je zalití do parafinového bloku. Výhodou této prezervace je to, že takto uchovaná tkáň může být použita i po mnoha letech k dalšímu vyšetření.

Odebraná tkáň je okamžitě fixovaná pufrovaným formalínem, dehydratovaná vzestupnou etanolovou řadou, projasněna xylenem a zalita do parafínu. Formalín musí být pufrovaný a vzorek v něm musí být ponechán nejkratší možnou dobu, jinak dojde k nevratným změnám DNA, které znemožní budoucí genotypizaci (DNA je fragmentována a chemicky modifikována, takže PCR nemůže proběhnout). Stejně tak nesmí být vzorek ponechán zbytečně dlouho v xylenu. Parafín nesmí být recyklován, protože by mohl způsobit falešnou pozitivitu. Parafinové bloky jsou uchovávány ve vyhrazených pořadačích při stabilní laboratorní teplotě.

Každý blok musí být náležitě označen, přinejmenším identifikačními údaji vyšetřované osoby a datem odběru vzorku.

Doba odezvy:

1 měsíc nebo po domluvě se zákazníkem



Kontakt:

Prof. Mgr. Jiří Drábek, PhD.

Vedoucí DNA laboratoře LEM - ÚMTM

Tel.: 585 632 070

e-mail: drabekjiri@gmail.com

Mgr. Karolína Bartáková, PhD.

Tel.: 585 632 070,

e-mail: karolina.bartakova@upol.cz

Ing. Rastislav Slavkovský, PhD.

e-mail: rastislav.slavkovsky@upol.cz

2.1.7 Pokyny pro odběr vzorku pro C_SOP_15_ Detekce a genotypizace HPV polymerázovou řetězovou reakcí a hybridizací se sondou v rámci specializovaného Komplexního onkologického centra

- DNA laboratoř neprovádí vzorkování. Vzorky pocházejí z cervikálních a vaginálních stěrů, odebraných do odběrového média cobas® (Roche Molecular Systems, Inc.), roztoku PreservCyt® Solution (Cytoc Corp.) anebo konzervačního roztoku SurePath® (BD Diagnostics-TriPath).
- **Vzorky odebrané do buněčného odběrového média pro PCR cobas® (Roche Molecular Systems, Inc.) a roztoku PreservCyt® Solution (Cytoc Corp.) jsou stabilní při teplotě 2–30 °C až 6 měsíců od data odebrání. V konzervačním roztoku SurePath je možno vzorky cervikálních buněk uchovávat při teplotě 2-8 °C po dobu až 6 měsíců a při teplotě 15-30 °C až 14 dní od data odebrání.**
- Příjem vzorků na detekci a genotypizaci HPV polymerázovou řetězovou reakcí a hybridizací se sondou není nutno objednávat, ale je dobré o plánovaném odeslání vzorku informovat laboratoř

Kontakt:

Prof. Mgr. Jiří Drábek, PhD.

Vedoucí DNA laboratoře LEM - ÚMTM

Tel.: 585 632 070

e-mail: drabekjiri@gmail.com

Mgr. Hana Ondryášová

Tel.: 585 632 089

e-mail: ondryasova.hana@gmail.com



2.1.8 Pokyny pro odběr vzorku pro Klinické celoexomové sekvenování pro detekci zárodečných genetických variant u dědičných onemocnění C_SOP_17

- LEM-ÚMTM neprovádí vzorkování
- **Odběr krve:**
 - Nejméně 5 ml krve (lépe dvakrát 10 ml krve) je nutné odebrat do označené zkumavky s EDTA (většinou fialový vršek) a zamíchat otáčením. Pro izolaci DNA z plazmy (vyšetření tekuté biopsie) doručit okamžitě do laboratoře k dalšímu zpracování (musí být zpracována nejpozději 3 hod od odběru). Pro izolaci DNA z plně antikoagulované krve nebo z krevních buněk doručit při pokojové teplotě do druhého dne, při teplotě 4°C do třetího dne.
 - Takto odebrané a řádně popsané vzorky včetně správně vyplněné žádanky transportovat neprodleně do Laboratoře experimentální medicíny k dalšímu zpracování. Nikde neskladovat, nemrazit! Vzor žádanky na <http://www.umtm.cz/cs/diagnostika>.
 - Kontakt: prof. Mgr. Jiří Drábek, PhD., tel.: 585 632 070 drabekjiri@gmail.com

Odběr bukalního stěru nebo slin:

Bukální stěr provádíme pomocí k tomu určených kartáčků. Pokud DNA okamžitě neizolujeme, bez kontaminace vysušíme vzorek pomocí desikačních kuliček nebo na vzduchu.

Odběr slin provádíme do odběrové zkumavky na sliny (Oragene).

Takto odebrané, stabilizované a řádně popsané vzorky včetně správně vyplněné žádanky transportujeme do laboratoře do 14 dnů.

Kontakt:

prof. Mgr. Jiří Drábek, PhD.

Vedoucí DNA laboratoře LEM - ÚMTM

Tel.: 585 632 070

e-mail: drabekjiri@gmail.com



2.1.9 Příručka pro odběr vzorku pro stanovení buněčného cyklu a/nebo ploidity pomocí průtokové cytometrie dle C_SOP_04 Vyšetření ploidity, obsahu a distribuce DNA metodami průtokové cytometrie

**LBB je akreditována podle normy ISO17025:2005

Stanovení buněčného cyklu a ploidity se provádí na buněčných elementech kostní dřeně nebo lymfocytech izolovaných na hustotním gradientu.

Odběr krve/ kostní dřeně:

Do 50 ml zkumavky obsahující 20 ml transportního média se odebere 5 ml kostní dřeně (KD) nebo 20 ml periferní krve (PB). Periferní krev je vhodná pro izolaci nádorových buněk pouze v případě, že jsou v ní blasty zastoupeny alespoň v 50 %. Pro zajištění maximální výtěžnosti je žádoucí zkrátit interval mezi odběrem a zpracováním vzorku v laboratoři na minimum.

Dodání vzorků:

Vzorek krve/kostní dřeně se uchovává a přepravuje při 4°C; ke zpracování musí dojít nejpozději do 6 hodin od okamžiku odběru. Jinak měření může poskytovat aberantní výsledky.

Ke každému vzorku je nezbytné dodat řádně vyplněnou žádanku, v níž musí být náležitě identifikován lékař oprávněný indikovat vyšetření (včetně adresy klinického žadatele a jeho telefonního spojení). Dále musí obsahovat jednoznačnou identifikaci pacienta, včetně čísla zdravotní pojišťovny a údaj o datu a času odběru krevního vzorku.

Spolu s náležitě vyplněnou žádankou musí být vzorek neprodleně dodán do Ústavu molekulární a translační medicíny při LF UP a FN Olomouc, Hněvotínská 5, Olomouc 775 15, tel. 585 632 058. Po přezkoumání údajů na vzorku je vzorek převzat pracovníkem Laboratoře buněčné biologie.

Doba odezvy:

Výsledky jsou odesílány do týdne po převzetí primárního vzorku, pokud jinak nestanoví požadavek na žádance, který byl schválen odpovědným pracovníkem.

Kontakt:

MUDr. Petr Džubák, Ph.D.

Vedoucí laboratoře buněčné biologie LEM - ÚMTM

Tel.: 585 632 058

e-mail: dzubakp@seznam.cz

Mgr. Marta Khoylou, Ph.D.

Zástupce vedoucího laboratoře buněčné biologie LEM - ÚMTM



Tel.: 585 632 066

e-mail: m.khoylou@seznam.cz

2.1.10 Příručka pro odběr vzorku C_SOP_05 Vyšetření exprese antigenů a ověření kvality protilátek metodou průtokové cytometrie

**LBB je akreditována podle normy 17025:2005

Pro imunofenotypizaci přímou nebo nepřímou metodou pomocí průtokové cytometrie.

Imunofenotypizace se provádí na lymfocytech izolovaných z krve s EDTA.

Odběr krve do EDTA:

Periferní krev se odebírá v množství 9 ml nebo 3 ml do protisrážlivého roztoku s EDTA. Ihned po odběru je nutno opakovaným převrácením krev ve zkumavce promísit, aby nedošlo k jejímu sražení.

Dodání vzorků:

Vzorek krve v EDTA se uchovává a přepravuje při pokojové teplotě, ke zpracování musí dojít nejpozději do 6 hodin od okamžiku odběru.

Ke každému vzorku je nezbytné dodat řádně vyplněnou žádanku, v níž musí být náležitě identifikován lékař oprávněný indikovat vyšetření (včetně adresy klinického žadatele a jeho telefonního spojení). Dále musí obsahovat jednoznačnou identifikaci pacienta, včetně čísla zdravotní pojišťovny a údaj o datu a času odběru krevního vzorku.

Spolu s náležitě vyplněnou žádankou musí být vzorek neprodleně dodán do Ústavu molekulární a translační medicíny při LF UP a FN Olomouc, Hněvotínská 5, Olomouc 775 15, tel. 585 632 058. Po přezkoumání údajů na vzorku je vzorek převzat pracovníkem Laboratoře buněčné biologie.

Doba odezvy:

Výsledky jsou odesílány do týdne po převzetí primárního vzorku, pokud jinak nestanoví požadavek na žádance, který byl schválen odpovědným pracovníkem.

Kontakt:

MUDr. Petr Džubák, Ph.D.

Vedoucí laboratoře buněčné biologie LEM - ÚMTM

Tel.: 585 632 058

e-mail: petr.dzubak@upol.cz



Mgr. Marta Khoylou, Ph.D.

Zástupce vedoucího laboratoře buněčné biologie LEM - ÚMTM

Tel.: 585 632 066

e-mail: marta.khoylou@upol.cz

Odběr krve pro stanovení P-glykoproteinu nepřímou metodou pomocí průtokové cytometrie.

Stanovení P-glykoproteinu se provádí na lymfocytech izolovaných z krve s EDTA.

Odběr krve do EDTA:

Periferní krev se odebírá v množství 9 ml nebo 3 ml do protisrážlivého roztoku s EDTA. Ihned po odběru je nutno opakovaným převrácením krev ve zkumavce promísit, aby nedošlo k jejímu sražení.

Dodání vzorků:

Vzorek krve v EDTA se uchovává a přepravuje při 4°C, ke zpracování musí dojít nejpozději do 6 hodin od okamžiku odběru. Jinak měření může poskytovat aberantní výsledky.

Ke každému vzorku je nezbytné dodat řádně vyplněnou žádanku, v níž musí být náležitě identifikován lékař oprávněný indikovat vyšetření (včetně adresy klinického žadatele a jeho telefonního spojení). Dále musí obsahovat jednoznačnou identifikaci pacienta, včetně čísla zdravotní pojišťovny a údajů o datu a času odběru krevního vzorku.

Spolu s náležitě vyplněnou žádankou musí být vzorek neprodleně dodán do Laboratoře experimentální medicíny při LF UP a FN Olomouc, Hněvotínská 5, Olomouc 77900, tel. 585 632 058. Po přezkoumání údajů na vzorku je vzorek převzat pracovníkem Laboratoře buněčné biologie.

Doba odezvy:

Výsledky jsou odesílány do týdne po převzetí primárního vzorku, pokud jinak nestanoví požadavek na žádance, který byl schválen odpovědným pracovníkem.

Kontakt:

MUDr. Petr Džubák, Ph.D.

Vedoucí laboratoře buněčné biologie LEM - ÚMTM

Tel.: 585 632 058

e-mail: dzubak.petr@upol.cz

Mgr. Marta Khoylou, Ph.D.

Zástupce vedoucího laboratoře buněčné biologie

Tel.: 585 632 066

e-mail: marta.khoylou@upol.cz



2.1.11 Příručka pro odběr vzorku C_SOP_06 Vyšetření exprese onkoproteinů metodou nepřímé imunohistochemie (IHC)

**LBB je akreditována podle normy 17025:2005

Čerstvý materiál:

Nativní tkáň se odebírá do sterilních zkumavek, které jsou okamžitě vloženy do kapalného dusíku, ve kterém tkáň zmrzne. Zmražená tkáň se dále uchovává v hluboko mrazicím boxu při -80°C. Je nutné odebrat tkáň o velikosti aspoň 0,5 x 0,5 cm.

Zmrzlou tkáň je takto možno uchovávat nejdéle po dobu 1 roku.

Každá zkumavka musí být náležitě označena identifikačními údaji vyšetřované osoby a datem odběru.

Dodání vzorků

Uchování a přeprava:

Vzorky je nutné zasílat v polystyrénové krabici s dostatečným množstvím suchého ledu, aby dorazily do 48 hodin. Vzorky s řádně vyplněnou žádankou jsou doručeny do laboratoře.

Příjem vzorků pro IHC není nutné objednávat.

Parafinovaná tkáň:

Velmi častým způsobem archivace tkání je zalití do parafinového bloku. Výhodou této prezervace je skutečnost, že takto uchovaná tkáň může být použita i po mnoha letech k dalšímu vyšetření. Zachování histologické struktury řezů tkání fixovaných formalinem a zalitých v parafinu, umožňuje analyzovat nejen genetický status buněk, ale též topografickou distribuci abnormálních buněk a vztahy mezi morfológickými a expresními charakteristikami buněk.

Odebraná tkáň je fixovaná formalínem, dehydratovaná vzestupnou etanolovou řadou, projasněna xylenem a zalita do parafínu. Parafinové bloky jsou uchovávány ve vyhrazených pořadačích při stabilní laboratorní teplotě.

Každý blok musí být náležitě označen identifikačními údaji vyšetřované osoby a datem.

Dodání vzorků

Uchování a přeprava:

Vzorky je možno zasílat poštou v obálce či osobně doručit do laboratoře bez speciálních nároků na teplotu skladování. Vzorky s řádně vyplněnou žádankou jsou doručeny do laboratoře.

Příjem vzorků pro IHC není nutné objednávat.

Doba odezvy

7 dní – patientské vzorky

31 dní – protilátky



**ÚSTAV MOLEKULÁRNÍ A
TRANSLAČNÍ MEDICÍNY**

Strana: 28 z celkem 36

Verze: 9

Datum vydání: 14.11.2017

Kontroloval: doc. MUDr. M. Hajdúch, Ph.D.

Laboratorní příručka

ZÁKAZ KOPÍROVÁNÍ
Řízený dokument

Kontakt:

Mgr. Marta Khoylou, Ph.D.

Zástupce vedoucího laboratoře buněčné biologie LEM - ÚMTM

Tel.: 585 854 772,

e-mail: marta.khoylou@upol.cz



3. Uchování a přeprava vzorků

3.1 Uchování a přeprava vzorků

Vzorky je nutné do laboratoře zasílat:

- s řádně vyplněnou žádankou
- doba transportu je závislá na typu vzorku
- v obalu zaručujícím, že se cestou neporuší a nedojde ke ztrátě vzorku nebo jeho kontaminaci
- pokud jsou zamražené, tak v polystyrénové krabici s dostatečným množstvím suchého ledu, aby nerozmrzly.

Vzorky – celé bloky nebo parafinové řezy je možno zasílat spolu s vyplněnou žádankou poštou v obálce či osobně doručit do laboratoře bez speciálních nároků na teplotu skladování. Doporučujeme parafinové řezy (6 sklíček, 2 řezy na každém) o tloušťce 4-6 μm imobilizovat na obyčejné (nenabitě) sklo. Vzorky – skla – prosíme zasílat zabezpečená proti rozbití.

Cytologický vzorek:

Buňky (nejméně 400 maligních buněk) se nanáší na obyčejná (nenabitá) skla, aby po zabarvení hematoxylinem-eosinem patolog mohl zespod fixem označit místa s výskytem nádorových buněk.

Čerstvý materiál:

Nativní tkáň se odebírá do sterilních zkumavek, které je okamžitě vložena do kapalného dusíku, ve kterém tkáň zmrzne. Zmražená tkáň se dále uchovává v hlubokomrazicím boxu při -80°C . Je nutné odebrat tkáň o velikosti přibližně 0,5 x 0,5 cm.

Zmrzlou tkáň je takto možno dlouhodobě uchovávat.

Každá zkumavka musí být náležitě označena identifikačními údaji vyšetřované osoby a datem odběru tak, ať nízká teplota nezpůsobí uvolnění štítku/znečitelnění popisu.

Pokud není kapalný dusík k dispozici, je možné vložit tkáň o velikosti maximálně 0,5 x 0,5 cm do 0,75 ml roztoku RNA Later a uchovávat maximálně týden při pokojové teplotě. (na straně 17 je velikost max. 0,3 x 0,3 cm??)



3.2. Identifikace pacienta na žádance a označení vzorku

3.2.1 Zacházení se vzorky

V případě, že dodavatelem vzorku je lékař-zákazník, je s ním, je-li to potřeba, provedena před dodáním prvního vzorku konzultace, kde jsou vysvětleny požadavky laboratoře na stabilitu dodaného vzorku, způsob jeho balení, podmínky transportu do laboratoře a termín dodání, event. způsob jeho likvidace, popřípadě uchování (archivace) vzorku po skončení zkoušek. Konzultace či další vysvětlení mohou být upřesňována kdykoliv na základě požadavku zákazníka či ze strany LEM. Společně se vzorkem je předávána průvodka ke vzorku, která slouží pro jeho identifikaci a příjem.

3.2.2 Příjem a manipulace se vzorky a referenčními materiály

RL, DL, LBB i CL mají vypracovaný rámcový postup pro způsob dodání vzorků a dodání nebo výroby laboratorních referenčních materiálů, stejně tak pro jejich příjem, skladování a uchování, aby byla zachována integrita vzorku (jednotlivé SOP). Pokud dojde k situaci, že laboratoř nemůže zajistit vyšetření vzorku dle doby odezvy stanovené v SOP (technické problémy, personální obsazení apod.), má laboratoř právo vzorek zákazníkovi odmítnout, o čemž je veden záznam v Knize příjmů. Pokud zákazník nevyžaduje dodržení stanovené doby odezvy, je vzorek přijat a zabezpečen proti znehodnocení, o čemž je veden záznam.

3.2.3 Identifikace vzorků

Každý přijímaný vzorek anebo etalon je při příjmu označen. Pracovník přijímající vzorek kontroluje shodnost údajů na štítcích vzorku s údaji na průvodce zákazníka a opatří každý vzorek evidenčním číslem. Evidenční číslo vzorku se zapíše na průvodku i do příjmové knihy vzorků a současně na vzorek. K evidenčnímu číslu se do průvodky (do příjmové knihy) připojují dále údaje o datu převzetí vzorku, jméno osoby, která převzala vzorek (včetně její parafovy na průvodce), údaje o lékaři-zákazníkovi a požadovaných vyšetřeních.

V případě, že vzorek je předáván do jiné laboratoře pro plnění subdodávky, je vyplňován protokol o předání vzorku, který má rovněž charakter průvodky.

S důvěrnými údaji se nakládá dle Zákona o ochraně osobních údajů. Ostatní evidenční záznamy, které neobsahují údaje, jejichž prozrazení by poškodilo zájmy zákazníka, event. pacienta, jsou vedeny a uchovávány tak, aby se zamezilo možnosti jejich ztráty, popř. zcizení.

3.2.4 Abnormality při příjmu

Vzorky jsou transportovány tak, aby byly dodány nepoškozené a včas do laboratoře. Na poškození obalu vzorku, nebo poškození samotného vzorku, popřípadě na zpožděné dodání je upozorněn lékař, který vzorek zasílal a podle potřeby je požadován nový odběr vzorku. Na



špatně odebraný vzorek či nedostatečné údaje na průvodce je rovněž lékař upozorněn, i když rozbor vzorku by mohl být proveden.

Přijatý vzorek, pokud není v ten den v laboratoři zpracováván, je po označení evidenčním číslem umístěn do vyhrazené lednice, mrazicího boxu nebo na jiné vyhrazené místo v laboratoři. Vzorky se likvidují podle směrnice: „Způsob likvidace vzorků a toxických odpadů“ (C_S_08).

3.2.5 Ochrana a uchování vzorků

RL, DL, CL a LBB zpracovávají dva typy vzorků: s neomezenou a s omezenou životností. Způsoby jejich archivace jsou součástí jednotlivých SOP. V SOP je též stanovena doba, po kterou lze takto stabilizovaný vzorek uchovávat.

Laboratoř dodržuje stanovené zásady zacházení s osobními daty pacientů, včetně zabezpečení elektronicky vedených dat.

Vyšetření se provede po odstranění dále uvedených neshod

1. Pokud na žadance chybí některé z údajů:

Pracovník LEM, který zjistí neshodu, vyžádá doplňující údaje telefonicky a doplní je do žádanky (na žadance provede záznam o doplnění chybějících údajů a podepíše se).

- rodné číslo pacienta
- oddělení (IČZ),
- diagnóza pacienta,
- zdravotní pojišťovna pacienta,
- titul, jméno, příjmení a IČL lékaře, požadujícího vyšetření (jmenovka nebo čitelně vypsané rukou)
- odbornost
- označení požadovaného vyšetření
- datum a čas odběru (pokud je nutné)
- specifikace biologického materiálu

2. V případě neshod týkajících se BM (biologického materiálu):

- Biologický materiál je označen pouze jménem pacienta:
 - Laboratoř jej může přijmout za předpokladu, že je jednoznačně připojena k žadance s kompletní identifikací pacienta.
- V případě nesprávného odběru BM vzhledem k transportu a stabilitě vzorku (překročena lhůta pro doručení stanovena v harmonogramu transportu) u požadovaného vyšetření:
 - Vzorek se vyšetří jen na výslovnou žádost lékaře.
- V případě nedostatečného objemu odebraného BM vzhledem k počtu požadovaných vyšetření:



- Pokud lékař specifikoval vyšetření, která požaduje přednostně, provedou se vyšetření na základě jeho požadavku.

Je-li do laboratoře dodán některý BM v nesprávné odběrové nádobě vzhledem k požadovanému vyšetření:

Pracovník, který zjistí neshodu, provede záznam o nesprávném odběru „nevhodná zkumavka“, připíše komentář a, je-li potřeba, vyžádá nový odběr se žádankou. Přejde-li vyplněná žádanka bez BM:

Pracovník, který zjistí neshodu, provede záznam do stávající žádanky „materiál nedodán“ (místo výsledku metody) a dle možností materiál vyžádá či dohledá.

V dále uvedených případech se u vyšetření postupuje následovně:

1. Přejde-li nevyplněná žádanka s neoznačeným BM a nepodaří-li se pracovníkovi na příjmu získat údaje o odesílajícím oddělení a základní identifikace nemocného:

Pracovník na příjmu BM provede záznam do „Knihy neshodné práce“.

2. Přejde-li označený BM bez žádanky nebo s nevyplněnou žádankou:

Pracovník, který zjistí neshodu, provede záznam do „Knihy neshodné práce“.

3. Přejde-li do laboratoře neoznačený BM s řádně vyplněnou žádankou:

Pracovník, který zjistí neshodu, telefonicky upozorní personál odesílajícího oddělení na nemožnost provést požadované vyšetření a doporučí nový odběr s novou žádankou. Provede záznam do stávající žádanky. Pracovník na příjmu BM provede záznam do „Knihy neshodné práce“.

4. Je-li zásadním způsobem porušen či znehodnocen odebíraný BM:

Pracovník, který zjistí neshodu, upozorní personál odesílajícího oddělení na nemožnost provést požadované vyšetření. Pracovník na příjmu BM provede záznam do „Knihy neshodné práce“.

5. Nesouhlasí-li identifikace pacienta na zkumavce se žádankou:

Pracovník, který zjistí neshodu, telefonicky upozorní personál odesílajícího oddělení na nemožnost provést požadované vyšetření, doporučí nový odběr nebo požádá o nové dodání vzorku s novou žádankou. Pracovník na příjmu BM provede záznam do „Knihy neshodné práce“.

6. Je-li do laboratoře dodán BM v nesprávné odběrové nádobě vzhledem k požadovanému vyšetření:

Pracovník, který zjistí neshodu, telefonicky upozorní odesílající oddělení a vyžádá nový odběr.

Provede záznam do „Knihy neshodné práce“

8. V případě potřísnění zkumavky a žádanky biologickým materiálem:

Materiál se nemusí přijmout – rozhoduje zaměstnanec na příjmu. V případě nepřijetí se provede záznam do „Knihy neshodné práce“ a telefonicky upozorní odesílající oddělení.

9. Je-li vzorek BM zaslán omylem na LEM:



**ÚSTAV MOLEKULÁRNÍ A
TRANSLAČNÍ MEDICÍNY**

Strana: 33 z celkem 36

Verze: 9

Datum vydání: 14.11.2017

Kontroloval: doc. MUDr. M. Hajdúch, Ph.D.

Laboratorní příručka

ZÁKAZ KOPÍROVÁNÍ
Řízený dokument

Pracovník na příjmu BM jej vrátí pochůzkové službě, popř. uloží na vyhrazené místo do stojánku označeného „BM pro jiné laboratoře FNOL“ a poté jej předá pochůzkové službě nebo donese na správné místo. (co potrubní pošta??)



4. VÝSLEDKY

4.1. Doba odezvy:

Výsledky jsou odesílány v časové lhůtě, uvedené v jednotlivých SOP (doba odezvy je závislá na použité technice vyšetření a klinickém požadavku).

4.2. Vydávání výsledků

Sdělování výsledků žadatelům se provádí odesláním výsledků v tištěné podobě na výsledkovém protokolu nebo do informačního systému FNOL.

4.3. Hlášení výsledků v kritických intervalech

Charakter stanovených vyšetření nemá kritické intervaly.

4.4. Vydávání výsledků přímo pacientům a dalším osobám

Není povoleno.

4.5. Změny výsledků a nálezů

Přes veškerá opatření systému řízení kvality nelze zcela vyloučit vznik chyb a omylů. Dochází k nim při zásahu vnějších rušivých faktorů, při poruchách techniky, malfunkci činidel a spotřebních materiálů nebo v důsledku lidského selhání.

4.5.1. Chyba ze strany žadatele

Při zjištění chyby ze strany žadatele - lékaře (nejčastěji záměna nebo znehodnocení odebraného biologického materiálu) žádá LEM o co nejrychlejší sdělení této skutečnosti osobně, telefonicky, e-mailem nebo faxem. Na LEM se dále postupuje takto: při záměně nebo znehodnocení biologického materiálu se oddělení požádá o odběr nebo dodání nového biologického materiálu s doplněním doby odběru (pokud je nutné) a výsledky původního odběru se nahradí výsledky novými. Tyto změny jsou uvedeny na papírové žádance v komentáři.

4.5.2. Chyba v rámci LEM

Při zjištění chyby v rámci LEM („neshodného vyšetření“) se postupuje takto:

- je informován vedoucí příslušné laboratoře LEM nebo odborný pracovník, který zváží význam neshodných vyšetření a pokud uzná za nutné, informuje klinického žadatele,



- v případě potřeby je další vyšetřování zastaveno a zprávy o výsledcích jsou zadrženy,
- již uvolněné výsledky neshodných vyšetření jsou podle potřeby staženy a vhodným způsobem označeny,
- po nalezení a odstranění příčiny chyby se neshodná vyšetření opakují.

Každý výskyt neshody je dokumentován a zaznamenán a tyto záznamy jsou v pravidelných intervalech vedením laboratoře vyhodnocovány, aby mohly být případně nalezeny trendy a zahájeny preventivní činnosti.

4.5.3. Vyznačení změny výsledkové zprávy

Změny na výsledkovém protokolu se neprovádí. Vždy je vydán nový výsledkový protokol. Povoleny jsou pouze drobné opravy administrativního charakteru, neovlivňující výsledek (např. překlep ve slově apod.) V takovýchto případech se opravy provádí dle všeobecných zásad tak, aby zůstal čitelný původní text.

4.6. Konzultační činnost LEM

Laboratorní interpretaci výsledků vyšetření definovanou jako vyhodnocení laboratorního nálezu nebo jeho části nad rámec používaných hodnotících mezí provádějí VŠ – odborní garanti, kteří mohou přizvat ke konzultaci odborné garanty – lékaře.

Klinickou interpretaci laboratorních výsledků provádějí lékaři - žadatelé o vyšetření, kteří jsou současně odpovědní za veškerá dále indikovaná klinická vyšetření.

Služby zahrnující činnost jednotlivých úseků LEM, včetně odpovídající interpretace a poradenských služeb, jsou navrženy tak, aby splňovaly potřeby klinických pracovníků odpovědných za péči o pacienty. Požadavky a návrhy zákazníků k činnosti LEM zjišťuje LEM průběžnými dotazníky.

4.7. Způsob řešení stížností

4.7.1. Reklamací výsledku

Za reklamaci výsledku je považován nesouhlas ze strany žadatele alespoň s jedním naměřeným výsledkem vyjádřený písemnou nebo ústní (telefonickou) formou. Podklady k řešení reklamací předkládá zaměstnanec, který výsledek vydal, vedoucímu příslušného úseku (v jeho nepřítomnosti vedoucímu LEM). Ten po posouzení předložených podkladů rozhoduje o oprávněnosti reklamací.

Pokud nedojde mezi žadatelem a vedoucím příslušného úseku ke shodě, řeší se problém jednáním zástupce vedoucího LEM nebo vedoucího LEM s reklamujícím žadatelem.

4.7.2. Stížnosti

Za stížnost je považováno vyjádření nesouhlasu zadavatele s jednáním kteréhokoliv zaměstnance laboratoře vyjádřené stěžovatelem ústně nebo písemně. Stížnosti řeší vedoucí LEM, nebo jím určený zaměstnanec a zaznamená je do „Knihy stížností“.



5. ODKAZY

5.1. Pokyny pro pacienty a pro oddělení

Jsou uvedeny na webových stránkách <http://www.umtm.cz/cs/diagnostika> a <http://lem.ocol.cz>

5.2. Vzory žádanek o vyšetření

Vzory papírových žádanek pro žadatele jsou umístěny na webových stránkách LEM <http://www.umtm.cz/cs/diagnostika> a <http://lem.ocol.cz> v podsekcí jednotlivých laboratoří.