


NRL PRO PAPILOMAVIRY	
LABORATORNÍ PŘÍRUČKA	318_LP_08_01

Zpracovatel:	RNDr. Ruth Tachezy, Ph.D.	Podpis:	
Přezkoumal a schválil:	RNDr. Ruth Tachezy, Ph.D.	Podpis:	
Garant dokumentu:	RNDr. Jana Šmahelová	Podpis:	
Platnost od:	1.4.2008	Uvolněno pro systém:	
Výtisk č.:	1	Počet stran:	18
Verze:	A1	Přijato do evidence:	29.3.2008


Seznam změn a revizí řízeného dokumentu

Platnost od:	Nová verze	Obsah změny/revize	Podpis garanta	Schválení revize
17.12.08		Beze změn		

NRL PRO PAPILOMAVIRY	
LABORATORNÍ PŘÍRUČKA	318_LP_08_01

OBSAH:

1.	Obsah	2
2.	Informace o laboratoři	3
2.1.	Identifikace laboratoře, důležité údaje	3
2.2.	Popis činností laboratoře	3
2.2.1	Charakteristika a zaměření laboratoře	3
2.2.2.	Počet pracovníků a jejich odborná způsobilost	3
2.2.3.	Vybavení laboratoře	4
2.2.4.	Úroveň a stav akreditace laboratoře	4
2.3.	Zodpovědné a kontaktní osoby	4
3.	Manuál pro odběry primárních vzorků	5
3.1.	Požadavkové listy (Žádanky)	5
3.2.	Označení primárních vzorků	5
3.3.	Požadavky na dodatečná a opakovaná vyšetření	5
3.4.	Používaný odběrový systém	6
3.5.	Příprava klienta před odběrem vzorků	6
3.6.	Transport vzorků, stabilita	6
3.7.	Základní informace k bezpečnosti při práci se vzorky	6
4.	Preanalytické procesy v laboratoři	7
4.1.	Příjem žadanek a vzorků	7
4.2.	Kriteria pro přijetí nebo odmítnutí vadných primárních vzorků	7
4.3.	Postup při chybné identifikaci pacienta na žadance	8
4.4.	Postup při chybné identifikaci vzorku	8
4.5.	Postupy pro ochranu osobních údajů pacientů	8
4.6.	Skladování vyšetřených materiálů	9
4.7.	Opakovaná vyšetření	9
5.	Vydávání výsledků a komunikace s laboratoří	9
5.1.	Doba odezvy a vydávání výsledků	9
5.2.	Změny výsledků a nálezů	10
5.3.	Řešení stížností	10
6.	Laboratorní vyšetření, poskytovaná laboratoří	11
6.1.	Druh vyšetřovaného materiálu	11
6.2.	Stěry z děložního čípku	11
6.3.	Stěry z uretry mužů a z anální oblasti	13
6.4.	Stěry z penisu	13
6.5.	Stěry z oka	14
6.6.	Stěry z dutiny ústní a hrtanu	15
6.7.	Výplach dutiny ústní	16
6.8.	Bronchoalveolární laváž, aspirát	16
6.9.	Probatorní (preoperační) biopsie	17
6.10.	Fixovaná tkáň zalitá v parafínu	18
Příloha 1.	Žádanka NRL pro papillomaviry	20

NRL PRO PAPILOMAVIRY	
LABORATORNÍ PŘÍRUČKA	318_LP_08_01

2. INFORMACE O LABORATOŘI

2.1. IDENTIFIKACE LABORATOŘE, DŮLEŽITÉ ÚDAJE

Název organizace: Ústav hematologie a krevní transfuze

Adresa organizace: U Nemocnice 1, 128 20 Praha 2

e-mail: info@uhkt.cz

web: www.uhkt.cz, www.papillomavirus.cz

IČO: 0023736

IČZ:

Název laboratoře: **NÁRODNÍ REFERENČNÍ LABORATOŘ PRO PAPILOMAVIRY**

Adresa a umístění: U Nemocnice 1, Praha 2, budova C, přízemí

Vedoucí laboratoře: RNDr. Ruth Tachezy, Ph.D.

Telefon: 221 977 222

Fax:

e-mail laboratoře: NRLPV@uhkt.cz

Provozní doba laboratoře: 8.00–15.00 hodin

Příjem vzorků: 8.00–14.00 hodin

2.2. POPIS ČINNOSTÍ LABORATOŘE

2.2.1. Charakteristika a zaměření laboratoře


Laboratoř je součástí oddělení Experimentální virologie a provádí detekci a typizaci lidských papillomavirů (HPV) metodami molekulární biologie.

2.2.2. Počet pracovníků a jejich odborná způsobilost

Vedoucí pracovník: RNDr., Ph.D.

Vysokoškolsky vzdělaní pracovníci (VŠ): 5 (z toho jeden Ph.D.)

Laborantky: 2

NRL PRO PAPILOMAVIRY	
LABORATORNÍ PŘÍRUČKA	318_LP_08_01

Vedoucí pracovník a další dva VŠ jsou registrováni jako odborný pracovník v laboratorních metodách a přípravě léčivých přípravků podle zákona 96/2004, jedna laborantka je registrovaná podle stejného zákona.

2.2.3. Vybavení laboratoře


Vyšetření provádíme pomocí systému Hybrid Capture 2 (hc2) firmy Digene, který je dodáván s třepačkou, luminometrem a programem pro zpracování dat. Pro PCR využíváme Termocyklery firmy MJ Research a hybridizační pec firmy Techne Hybridiser HB-1D.

2.2.4. Úroveň a stav akreditace laboratoře

Laboratoř se účastní systému externího hodnocení kvality (INSTAND – Německo, <http://www.instandev.de/en/>).

2.3. Zodpovědné a kontaktní osoby

RNDr. Ruth Tachezy, Ph.D.	221977222	rutach@uhkt.cz
RNDr. Jana Šmahelová	221977103	jana.smahelova@uhkt.cz
RNDr. Eva Hamšíková	221977273	eva.hamsikova@uhkt.cz
RNDr. Martina Saláková, Ph.D.	221977103, 391	martina.salakova@uhkt.cz
RNDr. Viera Ludvíková	221977223	viera.ludvikova@uhkt.cz
Pavλίna Jarolímková	221977103	pavlina.jarolimkova@uhkt.cz
Blanka Langová	221977103	blanka.langova@uhkt.cz
Mgr. Jana Stašíková	221977223	jana.stasikova@uhkt.cz

NRL PRO PAPILOMAVIRY	
LABORATORNÍ PŘÍRUČKA	318_LP_08_01

3. MANUÁL PRO ODBĚRY PRIMÁRNÍCH VZORKŮ

Pracoviště, která provádějí odběry vzorku, mají být seznámena s tímto **Manuálem pro odběry primárních vzorků**. Rozsah vyšetření je průběžně aktualizován v souladu s rozvojem moderní medicíny.

3.1. POŽADAVKOVÉ LISTY (ŽÁDANKY)

Veškeré požadavky na vyšetření a výsledky jsou zpracovány laboratorním informačním systémem (LIS), který je součástí nemocničního informačního systému UNIS, oba firmy Steiner, spol. s r.o.. Materiál dodávaný do laboratoře musí být správně označen a musí mít vyplněnou žádanku. U cizinců je nezbytné uvedení čísla pojistky a data narození, u azylantů rovněž čísla povolení k pobytu. Požadavky na vyšetření od jiných organizací musí splňovat stejná kritéria. Laboratoř poskytuje své služby i samoplátcům. Při zaslání vzorku na vyšetření samoplátce je nutno uvést adresu, na kterou bude provedena fakturace. Cena vyšetření pro samoplátce je dána bodovým ohodnocením vyšetření v platném Seznamu výkonů. Aktuální ceník poskytne laboratoř na požádání.


Žádanka o vyšetření je přístupná na webové stránce <http://www.papillomavirus.cz/zadanka.pdf> a je ji třeba řádně vyplnit. **Bez kompletně vyplněné žádanky nebude vzorek zpracován!!!!!!**

3.2. OZNAČENÍ PRIMÁRNÍCH VZORKŮ

Mimo kompletně vyplněné žádanky je nutné odběrovou nádobu se vzorkem označit jménem pacienta nebo jeho iniciálami a rodným číslem.

3.3. POŽADAVKY NA DODATEČNÁ A OPAKOVANÁ VYŠETŘENÍ

Pokud je nutné doplnit některá vyšetření z již dříve dodaného vzorku, lze požadavek na takové vyšetření uplatnit telefonicky nebo ústně. Vyšetření budou provedena v rámci rutinního provozu. Výsledky dodatečných vyšetření budou uvolněny po vydání dodatečné žádanky. Dodatečná vyšetření je možné požadovat nejdéle do ukončení všech původně požadovaných analýz.

NRL PRO PAPILOMAVIRY	
LABORATORNÍ PŘÍRUČKA	318_LP_08_01

3.4. POUŽÍVANÝ ODBĚROVÝ SYSTÉM

Pro odběry jsou používány komerční sety STM (Digene, distributor Dynex) nebo PreservCyt (Cytoc, distributor Roche), pro některé typy odebíraných materiálů je třeba si odběrové nádoby vyžádat v laboratoři. Toto je třeba ověřit dle druhu klinického materiálu v kapitole 6. Nutné je uvést jméno lékaře, adresu a počet požadovaných odběrových setů.

Odběrové sety si lze zdarma vyžádat v laboratoři na telefoním čísle 221977222, 221977103 či na emailové adrese NRLPV@uhkt.cz.

3.5 PŘÍPRAVA KLIENTA PŘED ODBĚREM VZORKU

Pro odebírání stěrů obecně platí, že je třeba jej provést před aplikací jakékoliv látky na místo odběru materiálu (např. kyselina octová).

3.6. TRANSPORT VZORKŮ, STABILITA


Transport vzorků z externích zařízení je prováděn tak, aby byly dodrženy požadavky na odběr primárních vzorků VIZ. KAPITOLA 6.

Materiál musí být dopravován v neporušených zkuševkách, tak, aby nedošlo ke znehodnocení materiálu a ohrožení fyzických osob. Každý vzorek musí být opatřen identifikačním štítkem a papírovou žádankou. Dokumentace k materiálu je uložena tak, aby nebyla v přímém kontaktu s přepravovaným materiálem.

Pokud je dodaný materiál jakkoli poškozen či znehodnocen nebo pokud není řádně označen postupuje se dle kapitoly 4.2; 4.3 a 4.4.

3.7. ZÁKLADNÍ INFORMACE K BEZPEČNOSTI PŘI PRÁCI SE VZORKY

Obecné zásady strategie bezpečnosti práce s biologickým materiálem vycházejí z příslušných právních předpisů a směrnic, tj. především z vyhlášky MZ ČR č. 195/2005 Sb. a jejích příloh, kterou se upravují podmínky předcházení vzniku a šíření infekčních onemocnění a hygienické požadavky na provoz zdravotnických zařízení. Všichni zaměstnanci jsou povinni postupovat při vyšetřování pacientů tak, aby nedocházelo ke vzniku a šíření nozokomiálních nákaz ve smyslu příslušných ustanovení této vyhlášky. Pracovníci dále pracují v souladu s provozním řádem oddělení 308 PR 08 01.

NRL PRO PAPILOMAVIRY	
LABORATORNÍ PŘÍRUČKA	318_LP_08_01

4. PREANALYTICKÉ PROCESY V LABORATOŘI

4.1. PŘÍJEM ŽÁDANEK A VZORKŮ

Příjem primárních vzorků na veškerá laboratorní vyšetření se provádí v laboratoři. Vzorek musí být správně odebraný, viditelně nepoškozený, nepotřísněný, správně skladovaný a správně označený v souladu se správně vyplněnou a nepotřísněnou žádankou. Vzorky se v laboratoři přijímají průběžně. Za přijetí vzorku odpovídá laborantka, která v případě odmítnutí informuje odesílající pracoviště nebo lékaře a vedoucího laboratoře. Kontrolu a přijetí vzorku, včetně data, zapisuje příslušný pracovník na žádanku.

Příjem vzorků: **pracovní dny 8.00 – 14.00 hodin**

Vzorky se předávají vždy pracovníkům laboratoře.

4.2. KRITÉRIA PRO PŘIJETÍ NEBO ODMÍTNUTÍ VADNÝCH PRIMÁRNÍCH VZORKŮ

Při přijímání vzorku ho zodpovědný pracovník přezkoumá a zapíše.


Vzorek je odmítnut, pokud je neúplně vyplněna žádanka a je-li zkumavka špatně uzavřena a obsah vylit. Vzorek je též odmítnut, pokud došlo ke zjevné kontaminaci nesprávným skladováním např. přítomnost plísně.

Odmítnutí vzorku je neprodleně přijímajícím pracovníkem oznámeno telefonicky lékaři a o této skutečnosti je v laboratoři veden záznam do 318 K 08 04. Za každých okolností je nutné založit žádanku a skutečnost zaznamenat v komentáři.

Ve zvlášť výjimečných případech lze vzorky potřísněné biologickým materiálem či vzorky s menším, než doporučeným, množstvím materiálu a vzorky jinak poškozené (např. příměs krve) vyšetřit. Pracovník přejímající takové vzorky o tomto neprodleně informuje odesílající lékaře. Pouze na výslovnou žádost lékaře, který vyšetření požaduje, budou tyto vzorky vyšetřeny. Výše uvedené skutečnosti budou zaznamenány v komentáři k výsledkům.

4.3. Postup při chybné identifikaci pacienta na žádance

Je-li chybně identifikován pacient na žádance, postupuje se následovně:

NRL PRO PAPILOMAVIRY	
LABORATORNÍ PŘÍRUČKA	318_LP_08_01

Je-li uvedeno jméno pacienta, rodné číslo nebo pojišťovna, telefonicky se ověří správnost uvedených údajů a laboratoř provede opravu chybného údaje. Za závazné se vždy považují údaje uvedené na štítku vzorku. Vše se zaznamená do 318 K 08 04.

4.4. Postup při chybné identifikaci vzorku

Při chybné identifikaci vzorku (nesouhlasí údaje uvedené na štítku se skutečností, nebo identifikace zcela chybí) **je vzorek vždy odmítnut**. O této skutečnosti je v laboratoři veden záznam do 318 K 08 04 a je neprodleně telefonicky oznámena přijímajícím pracovníkem odesílajícímu lékaři a zároveň je vyžádán nový odběr a nová, řádně vyplněná žádanka.

4.5. Postupy pro ochranu osobních údajů pacientů

Všechny počítače, které slouží k zapisování údajů o pacientech jsou opatřené heslem, které znají pouze zodpovědné osoby viz. kapitola 2.3. Osobní údaje jsou vepisovány též do 318 K 08 01, které jsou ukládané do zamykatelných prostor a přístup k nim mají jen zodpovědné osoby viz. kapitola 2.3. Vlastní soubory na počítačích jsou dále opatřené heslem. Za údržbu počítačů, počítačové sítě a správu programu UNIS zodpovídá SPIS UHKT.

4.6. Skladování vyšetřených materiálů


Vzorky skladujeme po dobu jednoho měsíce od data odeslání výsledků, pokud byly negativní. Pozitivní vzorky skladujeme pod anonymním identifikátorem po dobu neomezenou pouze pro výzkumné účely.

4.7. Opakování vyšetření

U vzorků s hraničními hodnotami postupujeme dle 318 SOP 08 01 a 318 SOP 08 02.

5. VYDÁVÁNÍ VÝSLEDKŮ A KOMUNIKACE S LABORATOŘÍ

5.1. Doba odezvy a vydávání výsledků

NRL PRO PAPILOMAVIRY	
LABORATORNÍ PŘÍRUČKA	318_LP_08_01

Běžná doba: Výsledky vyšetření vzorků dle 318 SOP 08 01 i 318 SOP 08 02 jsou dodávány do 14 dnů až jednoho měsíce (dle příslušné SOP).

Statim: dle dohody

Po provedení testů jsou výsledky převedeny do příslušného informačního systému LIS UNIS. Po kontrole odpovědným pracovníkem (vedoucí laboratoře, jeho zástupce) jsou uvolněny a vydávají se v tištěné formě a zároveň jsou uvolněny v elektronické formě. Mimo laboratoř je zobrazitelný výhradně uvolněný výsledek.


Výsledky posíláme písemnou formou ošetřujícímu lékaři. Výsledky nesdělujeme běžně telefonicky ani lékaři ani pacientům. Sdělení výsledku lékaři je možné u statim vyšetření. V tomto případě sděluje výsledek vedoucí laboratoře a jeho zástupce a to až po uvolnění výsledku. Sdělení výsledku pacientům je možné pouze, pokud toto zapíše lékař provádějící odběr primárního vzorku na žádanku (žádám o sdělení výsledku přímo pacientovi) a pokud je možná jasná identifikace pacienta (číslo občanského průkazu). Výsledek sděluje vedoucí laboratoře a jeho zástupce a to až po uvolnění výsledku.

Výsledkový list z LIS UNIS obsahuje:

- název laboratoře, která výsledek vydala
- jednoznačnou identifikaci pacienta (jméno, rodné číslo, číslo vzorku, číslo vzorku v laboratoři)
- název oddělení požadujícího vyšetření, IČZ
- datum zahájení zkoušky (datum příjmu vzorku)
- identifikaci vyšetření
- výsledek vyšetření
- v případě potřeby komentář
- datum a čas tisku výsledkového listu
- identifikaci osoby, která zpracovala, kontrolovala a uvolnila nález

5.2. ZMĚNY VÝSLEDKŮ A NÁLEZŮ

Změnu identifikace klienta (jméno, příjmení, rodné číslo, číslo pojistky) – provede laborant při zadávání žádanky do IS. Opravu nebo změnu rodného čísla, sloučení špatně zadaného čísla se

NRL PRO PAPILOMAVIRY	
LABORATORNÍ PŘÍRUČKA	318_LP_08_01

správným, oprava nebo změna jména, titulu, pojišťovny – provede po nahlášení správce počítačové sítě.

Oprava výsledků:

- uvolněné výsledky, které ještě nebyly účtovány – vedoucí laboratoře a jeho zástupce
- vyúčtované výsledky v databázi – správce počítačové sítě
- opravený výsledek se vždy oznámí telefonicky, pošle se opravný výsledkový list (pokud již byl odeslán) a o nahlášení se vede záznam do 318 K 08 04

5.3. ŘEŠENÍ STÍŽNOSTÍ


Případné stížnosti a reklamace adresujte prosím na adresu NRLPV@uhkt.cz.

Není-li stížnost k práci laboratoře adresována přímo vedoucímu laboratoře, řeší ji pracovník, který ji přijal a informuje vedoucího laboratoře. Výsledek a způsob řešení je evidován v 318 K 08 04. Kromě drobných připomínek je vyřizování stížností věcí vedoucího laboratoře a v případě jeho nepřítomnosti jeho zástupce. Vyřizování stížností se děje v souladu se směrnicí 2006/5 Vyřizování stížností a oznámení ÚHKT.

6. LABORATORNÍ VYŠETŘENÍ, POSKYTOVANÁ LABORATOŘÍ

6.1. Druh vyšetřovaného materiálu

- Stěry z děložního čípku
- Stěry z uretry u mužů a z oblasti anální
- Stěry z penisu
- Stěry z oka
- Stěry z dutiny ústní a hrtanu
- Výplach dutiny ústní
- Bronchoalveolární laváž, aspirát
- Probatorní biopsie
- Fixovaná tkáň zalitá v parafínu

NRL PRO PAPILOMAVIRY	
LABORATORNÍ PŘÍRUČKA	318_LP_08_01

6.2. Stěry z děložního čípku

Odběr, skladování a transport

Pro stěr z děložního čípku se používá komerčně dostupný set firmy Digene, který obsahuje kartáček, transportní médium (STM) a podrobný návod. Druhým komerčně dostupným setem je PreservCyt od firmy Cytoc. Set obsahuje pouze odběrovou zkumavku. Kartáčky jsou dodávány zvlášť. Stěr se provádí jedním kartáčkem z endo- i exocervixu před odběrem cytologie a před aplikací kyseliny octové!!! Kartáček odběrového setu Digene se vloží do odběrové zkumavky, zalomí a zkumavka se uloží na +4-8°C, při použití odběrového média PreservCyt se kartáček v médiu pouze opláchne, odběrová zkumavka se uzavře a uloží na +4-8°C. Skladování při této teplotě je možné maximálně týden. Převoz vzorků do laboratoře se provádí bez chlazení, při normální teplotě.

Zpracování vzorků v laboratoři

A/ Stěry v STM pro detekci HPV neamplifikační metodou


Vzorek je možné v laboratoři skladovat při +4-8°C nejdéle po dobu dvou týdnů. Příprava vzorku k detekci HPV neamplifikační metodou spočívá v denuraci DNA přidáním poloviny objemového dílu denaturačního pufru dodávaného výrobcem (Digene). Vzorky denaturujeme 45 min při 65°C. Po denuraci lze vzorky skladovat při teplotě +4-8°C přes noc nebo při teplotě -20°C maximálně po dobu 3 měsíců.

B/ Stěry v STM pro detekci HPV amplifikačními technikami

DNA ze vzorku izolujeme na kolonkách komerčně dostupného setu QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) dle návodu (Blood and Body Fluid Spin Protocol). Vzorek kvantitativně stočíme (5 min při 5000ot za pokojové teploty), supernatant odsajeme. Sediment resuspendujeme ve 200 µl PBS pufru. Do zkumavek pipetujeme 20 µl proteinázy K, resuspendovaný vzorek a lyzační pufr. Inkubujeme 10 min při 56°C, poté přidáme 200 µl absolutního etanolu. Vzorek opatrně nanese na kolonku, promyjeme a eluujeme 200 µl elučního pufru. Vzorek označíme štítkem s datem izolace, číslem vzorku a skladujeme v mrazničce.

C/ Stěry v Preserv Cyt médiu pro detekci HPV neamplifikační metodou

Vzorek je možné v laboratoři skladovat při +4-8°C nejdéle po dobu dvou týdnů. Přípravu vzorků k detekci HPV neamplifikační metodou provádíme komerčně dodávaným setem Sample Conversion Kit (Digene). Po řádném protřepání pipetujeme 4 ml vzorku do zkumavky a přidáme 0,4 ml konverzního pufru. Po centrifugaci 15 min při 3000ot odsajeme supernatant a ke každému peletu přidáme směs transportního média (STM) s denaturačním pufrem (Digene). Vzorky denaturujeme 45 min při 65°C, konvertované vzorky z PreservCyt mohou být

NRL PRO PAPILOMAVIRY	
LABORATORNÍ PŘÍRUČKA	318_LP_08_01

po denuraci skladovány při teplotě +4-8°C přes noc nebo při -20°C maximálně po dobu 3 měsíců.

D/ Stěry v Preserv Cyt médiu pro detekci HPV amplifikačními technikami

DNA ze vzorku izolujeme na kolonkách komerčně dostupného setu QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) dle návodu (Blood and Body Fluid Spin Protocol). Odebereme 6 ml vzorku, stočíme (5 min při 5000ot za pokojové teploty), supernatant odsajeme. Sediment resuspendujeme ve 200 µl PBS pufru. Do zkumavek pipetujeme 20 µl proteinázy K, resuspendovaný vzorek a lyzační pufr. Inkubujeme 10 min při 56°C, poté přidáme 200 µl absolutního etanolu. Vzorek opatrně nanese na kolonku, promyjeme a eluujeme 200 µl elučního pufru. Vzorek označíme štítkem s datem izolace, číslem vzorku a skladujeme v mrazničce.


6.3. Stěry z uretry u mužů a z anální oblasti

Odběr, skladování a transport

Pro stěr z uretry a z anální oblasti je třeba použít kartáček. Doporučujeme nylonové odběrové kartáčky Flocked swabs (Copan), neboť jejich pomocí lze získat dostatečné množství materiálu a odběr je šetrný. Kartáček se vloží do odběrové zkumavky s médiem STM či PreservCyt dodané na vyžádání laboratoří, zalomí se (kartáček musí být ponořen do odběrového média) a zkumavka se uloží na +4-8°C. Skladování při této teplotě je možné maximálně týden. Převoz vzorků do laboratoře se provádí bez chlazení, při normální teplotě. V laboratoři lze vzorek skladovat při +4-8°C po dobu nejdéle dvou týdnů.

Zpracování vzorků v laboratoři

U stěrů z uretry v STM či PreservCyt médiu detekci DNA provádíme výhradně amplifikačními technikami. DNA ze vzorku izolujeme na kolonkách komerčně dostupného setu QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) dle návodu. Vzorek kvantitativně stočíme (5 min při 3000ot za pokojové teploty), supernatant odsajeme. Sediment resuspendujeme ve 200 µl lyzačního pufru s proteinázou K a inkubujeme 1 hod při 56°C až do úplné lýze vzorku, následuje 10 min inkubace při 70°C, poté přidáme 200 µl absolutního etanolu. Vzorek opatrně nanese na kolonku, promyjeme a eluujeme 200 µl 10mM Tris-Cl. Na spektrofotometru změříme koncentraci DNA a upravíme objem vzorku precipitací tak, aby konečná koncentrace DNA ve vzorku byla 100 ng/µl. Vzorek označíme štítkem s datem izolace, koncentrací a číslem vzorku a skladujeme při -20°C.

NRL PRO PAPILOMAVIRY	 ÚHK
LABORATORNÍ PŘÍRUČKA	318_LP_08_01

6.4. Stěry z penisu

Odběr, skladování a transport

Pro stěr z penisu je třeba použít kartáček. Doporučujeme nylonové odběrové kartáčky Flocked swabs (Copan), neboť jejich pomocí lze získat dostatečné množství materiálu a odběr je šetrný. Odběr je třeba udělat z místa viditelných klinických příznaků. Pokud se jedná o vyšetření preventivní, kde nejsou patrné klinické příznaky onemocnění, je třeba setřít glans penis, předkožku, proximální část uretry. Kartáček se vloží do odběrové zkumavky s médiem STM či PreservCyt dodané na vyžádání laboratoří, zalomí se (kartáček musí být ponořen do odběrového média) a zkumavka se uloží na +4-8°C. Skladování při této teplotě je možné maximálně týden. Převoz vzorků do laboratoře se provádí bez chlazení, při normální teplotě. V laboratoři lze vzorek skladovat při +4-8°C po dobu nejdéle dvou týdnů.

Zpracování vzorků v laboratoři


U stěrů z penisu v STM či PreservCyt médiu detekci DNA provádíme výhradně amplifikačními technikami. DNA ze vzorku izolujeme na kolonkách komerčně dostupného setu QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) dle návodu. Vzorek kvantitativně stočíme (5 min při 3000ot za pokojové teploty), supernatant odsajeme. Sediment resuspendujeme ve 200 μ l lyzačního pufru s proteinázou K a inkubujeme 1 hod při 56°C až do úplné lýze vzorku, následuje 10 min inkubace při 70°C, poté přidáme 200 μ l absolutního etanolu. Vzorek opatrně nanese na kolonku, promyjeme a eluujeme 200 μ l 10mM Tris-Cl. Na spektrofotometru změříme koncentraci DNA a upravíme objem vzorku precipitací tak, aby konečná koncentrace DNA ve vzorku byla 100 ng/ μ l. Vzorek označíme štítkem s datem izolace, koncentrací a číslem vzorku a skladujeme při -20°C.

6.5. Stěry z oka

Odběr, skladování a transport

Pro stěr z oka odběrový nástroj volí lékař. Odběrový nástroj se vloží do zkumavky s transportním médiem (STM či PreservCyt) dodávané na vyžádání laboratoří, eventuálně zalomí a zkumavka se uloží na +4-8°C. Skladování při této teplotě je možné maximálně týden. Převoz vzorků do laboratoře se provádí bez chlazení, při normální teplotě. V laboratoři lze vzorek skladovat při +4-8°C po dobu nejdéle dvou týdnů.

Zpracování vzorků v laboratoři

NRL PRO PAPILOMAVIRY	
LABORATORNÍ PŘÍRUČKA	318_LP_08_01

U stěrů z oka v STM či PreservCyt médiu detekci DNA provádíme výhradně amplifikačními technikami. DNA ze vzorku izolujeme na kolonkách komerčně dostupného setu QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) dle návodu. Vzorek kvantitativně stočíme (5 min při 3000ot za pokojové teploty), supernatant odsajeme. Sediment resuspendujeme ve 200 μl lúčového lyzačního pufru s proteinázou K a inkubujeme 1 hod při 56°C až do úplné lýze vzorku, následuje 10 min inkubace při 70°C, poté přidáme 200 μl absolutního etanolu. Vzorek opatrně nanese na kolonku, promyjeme a eluujeme 200 μl 10mM Tris-Cl. Na spektrofotometru změříme koncentraci DNA a upravíme objem vzorku precipitací tak, aby konečná koncentrace DNA ve vzorku byla 100 ng/ μl . Vzorek označíme štítkem s datem izolace, koncentrací a číslem vzorku a skladujeme při -20°C.

6.6. Stěry z dutiny ústní a hrtanu

Odběr, skladování a transport


Pro stěr z dutiny ústní a hrtanu odběrový nástroj volí lékař. Odběrový nástroj se vloží do zkumavky s transportním médiem STM či PreservCyt dodávané na vyžádání laboratoří, eventuálně zalomí a zkumavka se uloží na +4-8°C. Skladování při této teplotě je možné maximálně týden. Převoz vzorků do laboratoře se provádí bez chlazení, při normální teplotě. V laboratoři lze vzorek skladovat při +4-8°C po dobu nejdéle dvou týdnů.

Zpracování vzorků v laboratoři

U stěrů z dutiny ústní a hrtanu v STM či PreservCyt médiu detekci DNA provádíme výhradně amplifikačními technikami. DNA ze vzorku izolujeme na kolonkách komerčně dostupného setu QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) dle návodu. Vzorek kvantitativně stočíme (5 min při 3000ot za pokojové teploty), supernatant odsajeme. Sediment resuspendujeme ve 200 μl lúčového lyzačního pufru s proteinázou K a inkubujeme 1 hod při 56°C až do úplné lýze vzorku, následuje 10 min inkubace při 70°C, poté přidáme 200 μl absolutního etanolu. Vzorek opatrně nanese na kolonku, promyjeme a eluujeme 200 μl 10mM Tris-Cl. Na spektrofotometru změříme koncentraci DNA a upravíme objem vzorku precipitací tak, aby konečná koncentrace DNA ve vzorku byla 100 ng/ μl . Vzorek označíme štítkem s datem izolace, koncentrací a číslem vzorku a skladujeme při -20°C.

6.7. Výplach dutiny ústní

Odběr, skladování a transport

NRL PRO PAPILOMAVIRY	
LABORATORNÍ PŘÍRUČKA	318_LP_08_01

Pro výplach dodáváme 10 ml sterilního roztoku PBS v 50ml zkumavce. Při výplachu je třeba dbát na řádné kloktání i z oblasti orofaryngu. Vzorek se vyplivne do čistého kelímku a přelije do odběrové zkumavky. Vzorek lze skladovat při +4-8°C a to maximálně 2 dny. Převoz vzorků do laboratoře se provádí bez chlazení, při normální teplotě. V laboratoři lze vzorek skladovat při +4-8°C po dobu dalších 2 dnů před zpracováním.

Zpracování vzorků v laboratoři

U výplachů dutiny ústní detekci DNA provádíme výhradně amplifikačními technikami. V laboratoři vzorek stočíme v chlazené centrifuze (7 min při 3000otC)+4 dvakrát promyjeme sterilním roztokem PBS. Stočené a promyté buňky z výplachu resuspendujeme v 5 ml roztoku PBS a rozplníme do pěti mikrozkuvek po 1 ml a skladujeme při -20°C. Zbytek resuspendovaných buněk použijeme pro počítání buněk v Bürkerově komůrce. DNA izolujeme na kolonkách komerčně dostupného setu Blood DNA Midi Kit (Qiagen) dle návodu. K 1 ml vzorku přidáme lyzační pufr s proteázou Q, po inkubaci 10 min při 70°C přidáme absolutní etanol a vzorek nanese opatrně na kolonku. Po promytí vzorek eluujeme 200 µl 10mM Tris-Cl a přesrážíme precipitací do konečného objemu tak, aby výsledná koncentrace DNA odpovídala počtu 7500 buněk/µl. Izolovanou DNA označíme štítkem s datem izolace a číslem vzorku a skladujeme při -20°C.


6.8. Bronchoalveolární laváž, aspirát

Odběr, skladování a transport

Bronchoalveolární laváž či aspirát je třeba odebírat do sterilních transportních nádob. Po odběru lze vzorek skladovat při +4-8°C po dobu 24 hodin. Transport lze provádět bez chlazení a v laboratoři se vzorek zpracovává v den dodání, což je nejdéle 48 hodin po odběru.

Zpracování vzorků v laboratoři

Buňky obsažené ve vzorku kvantitativně stočíme v centrifuze (15 min při 3000ot za pokojové teploty). Pokud je to nutné, centrifugaci prodloužíme. DNA izolujeme na kolonkách komerčně dostupného setu QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) dle návodu. Po centrifugaci supernatant odsajeme, sediment resuspendujeme ve 200 µl tláňového lyzačního pufru s proteinázou K a inkubujeme 1 hod při 56°C až do úplné lýze vzorku, následuje 10 min inkubace při 70°C, poté přidáme 200µl absolutního etanolu. Vzorek opatrně nanese na kolonku, promyjeme a eluujeme 200 µl 10mM Tris-Cl. Na spektrofotometru změříme koncentraci DNA a upravíme objem vzorku precipitací tak, aby konečná koncentrace DNA ve vzorku byla 100 ng/µl. Vzorek označíme štítkem s datem izolace, koncentrací a číslem vzorku a skladujeme při -20°C.

NRL PRO PAPILOMAVIRY	
LABORATORNÍ PŘÍRUČKA	318_LP_08_01

6.9. Probatorní (preoperační) biopsie

Odběr, skladování a transport

Probatorní biopsii z jakékoliv anatomické lokalizace lze odebrat do sterilní transportní nádoby a ihned zmrazit na -70°C . Délka skladování biopsie při této teplotě není omezena. Převoz do laboratoře se musí provádět na suchém ledu. V laboratoři se vzorek uloží opět na -70°C nebo se ihned zpracovává, tak jak to vyžaduje ošetřující lékař a umožňuje provoz laboratoře.

Biopsii lze alternativně odebrat do transportního média, které na žádost (telefon či mail) zašle laboratoř. Toto médium si lze vyžádat i předem a skladovat ho při $+4-8^{\circ}\text{C}$ nejdéle 1 rok. Po odběru biopsie do transportního média lze vzorek okamžitě zmrazit na -70°C bez omezení doby skladování, či na -20°C nejdéle na dobu 7 dní. Transport vzorku do laboratoře se provádí na suchém ledu. V laboratoři se vzorek uloží opět na -70°C nebo se ihned zpracovává, tak jak to vyžaduje ošetřující lékař a umožňuje provoz laboratoře.

Zpracování vzorků v laboratoři


U biopsií detekci DNA provádíme výhradně amplifikačními technikami. U malých biopsií (do 25mg) odebraných do transportního média izolujeme DNA na kolonkách komerčně dostupného setu QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) dle návodu. Vzorek stočíme (5 min při 3000ot za pokojové teploty), supernatant odsajeme. Ke vzorku přidáme 200 μl tkáňového lyzačního pufru s proteinázou K a inkubujeme 1-3 hod při 56°C až do úplné lýze vzorku, následuje 10 min inkubace při 70°C , poté přidáme 200 μl absolutního etanolu. Vzorek opatrně nanese na kolonku, promyjeme a eluujeme 200 μl 10mM Tris-Cl. Na spektrofotometru změříme koncentraci DNA a upravíme objem vzorku precipitací tak, aby konečná koncentrace DNA ve vzorku byla 100 ng/ μl . Vzorek označíme štítkem s datem izolace, koncentrací a číslem vzorku a skladujeme při -20°C .

6.10. Fixovaná tkáň zalitá v parafínu

Odběr, skladování a transport

Pro analýzu fixované tkáně v parafínu je základní podmínkou použité fixativum. Přípustná jsou následující fixativa: neutrální pufrovaný formalín, metakarn, aceton a etanol. Při použití jiných fixativ laboratoř nezaručuje, že bude možné provést vyšetření s uspokojivým výsledkem.


K vyšetření lze dodat bloček, který laboratoř po provedení vyšetření vrátí, nebo 2 řezy 20 μm uložené do sterilní zkumavky. Pokud lékař požaduje vyšetření více než jednoho vzorku, musí též dodat vzorek, který bude krájený mezi oběma vzorky od pacienta(ů) a bude obsahovat

NRL PRO PAPILOMAVIRY	
LABORATORNÍ PŘÍRUČKA	318_LP_08_01

pouze parafín. Toto je nutné ke kontrole možné falešné positivity v důsledku vzájemné kontaminace vzorků při jejich krájení. Během krájení vzorků je třeba dodržovat očištění nožů mikrotomu a celého okolí (povrch stolu a mikrotomu) před a po každém vzorku etanolem. Transport vzorků nakrájených či bločků do laboratoře lze provádět při normální teplotě. V laboratoři lze vzorky skladovat při +4-8°C neomezeně.

Zpracování vzorků v laboratoři

Z řezů odstraníme parafin přidáním 1 ml xylenu do každé zkumavky a inkubací 30 min za stálého pohybu při pokojové teplotě, následným stočením (10 min při 14000ot za pokojové teploty) a opatrným odsátím. Tento postup opakujeme 2-3x dokud parafin není z řezů dokonale extrahován. K řezům přidáme 1 ml absolutního etanolu a opět za stálého pohybu inkubujeme 30 min při pokojové teplotě, stočíme (10 min při 14000ot za pokojové teploty) a odsajeme. Vzorky necháme vyschnout 60 min při 55°C a po přidání lyzačního pufru s proteinázou K (koncentrace 100 ng/μl lyzačního roztoku) řezy dále inkubujeme při 56°C až do úplné lýze vzorků. Pro získání čisté DNA vzorky přečistíme fenol – chloroformovou extrakcí a následnou precipitací absolutním etanolem s octanem sodným. Vysráženou DNA po důkladném vysušení rozpustíme v přiměřeném množství 10mM Tris-Cl pH 8,0. Vzorek označíme štítkem s datem izolace a číslem vzorku a skladujeme při –20°C.

NRL PRO PAPILOMAVIRY	
LABORATORNÍ PŘÍRUČKA	318_LP_08_01

Příloha 1.

Žádanka NRL pro papillomaviry

NRL pro papillomaviry

Ústav hematologie a krevní transfuze

U Nemocnice 1, 128 00 Praha 2

Tel.: +420 221 977 222, 103; www.papillomavirus.cz

Laboratorní číslo:

Přijal a zkontroloval:

Datum příjmu:

Žádanka o vyšetření HPV

Pacient Příjmení a jméno				Lékař
Rodné číslo	/			
Diagnóza	Kód pojišťovny			Razítko, podpis
	Samoplátce	ANO	NE	
Datum odběru				IČZ Odbornost:

Požadovaná vyšetření:

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> HPV vysoké riziko | <input type="checkbox"/> HPV protilátky - vysoké riziko |
| <input type="checkbox"/> HPV nízké riziko | <input type="checkbox"/> HPV protilátky - nízké riziko |
| <input type="checkbox"/> HPV typizace | |

Důvod vyšetření:

Typ materiálu:

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> cervikální stěr | <input type="checkbox"/> fixovaná tkáň |
| <input type="checkbox"/> stěr z uretry, penisu | <input type="checkbox"/> krev |
| <input type="checkbox"/> stěr oka | <input type="checkbox"/> jiný |
| <input type="checkbox"/> stěr anální | |
| <input type="checkbox"/> výplach dutiny ústní | |
| <input type="checkbox"/> bronchoalveolární laváž | |
| <input type="checkbox"/> biopsie | |