

CENTRUM LÉKAŘSKÉ  
**GENETIKY** s.r.o.

Novohradská 68/1806, 370 08 České Budějovice

Vydání: 20.

Datum schválení: 17.6.2019

Celkový počet stran: 25

# LABORATORNÍ PŘÍRUČKA

Zpracoval: Ing. Markéta Lysá <i>Vedoucí úseku CG</i>	Kontroloval: Ing. Barbora Kváčová, Ph.D. <i>Manažer kvality</i>	Výtisk č.:1
Schválil: MUDr. David Čutka <i>Vedoucí laboratoře</i>		

## Obsah:

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>3</b>
1.1	Oblast platnosti .....	3
<b>2</b>	<b>Základní informace o laboratoři</b> .....	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>Spektrum nabízených služeb a seznam laboratorních vyšetření</b> .....	<b>5</b>
3.1	Seznam nabízených vyšetření .....	5
3.2	Úsek molekulární genetiky .....	5
3.2.1	Izolace a uchovávání vzorků DNA .....	5
3.2.2	Molekulárně genetické vyšetření mutací v genech metodou PCR-RFLP a Real-Time PCR - trombofilní stavy .....	6
3.2.3	Molekulárně genetické vyšetření mikroleceí azoospermické oblasti chromozómu Y (AZFa, AZFb, AZFc) multiplex PCR .....	6
3.2.4	Molekulárně genetické vyšetření mutací v genech metodou reverzní hybridizace – gen pro cystickou fibrózu .....	6
3.3.5	Molekulárně genetické vyšetření aneuploidii chromozómů 13, 18, 21, X, Y pomocí STR markerů metodou QF PCR (Amnio PCR) .....	7
3.3.6	Molekulárně genetické vyšetření HLA alel asociovaných k celiakii/lepkové intoleranci metodou SSP-PCR .....	7
3.3.7	Mutační analýza/screening genů metodou Sangerova sekvenování – BRCA1, BRCA2, ONKO, ONKO Plus .....	7
3.3.8	Mutační analýza genů metodou masivně paralelního sekvenování (platforma MiSeq, Illumina) – BRCA1, BRCA2, ONKO, ONKO Plus .....	8
3.3.9	Molekulárně genetické vyšetření syndromu fragilního X chromozómu (FRAXA) metodou PCR a TP-PCR .....	9
3.3.10	Vyšetření intragenových přestaveb metodou MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification) – BRCA1, BRCA2, SMN1 a SMN2, ONKO, ONKO Plus .....	9
3.3.11	Vyšetření přestaveb lidského genomu metodou Array CGH .....	10
3.3.12	Neinvazivní prenatální vyšetření (NIPT) metodou masivně paralelního sekvenování (Illumina) ....	10
3.3	Úsek cytogenetiky .....	11
3.3.1	Chromozomální vyšetření .....	11
<b>4</b>	<b>Prohlášení o souhlasu</b> .....	<b>11</b>
<b>5</b>	<b>Manuál pro odběr primárních vzorků</b> .....	<b>11</b>
5.1	Základní informace pro odběr primárního vzorku včetně zvláštního načasování .....	12
5.2	Vlastní odběr včetně minimálního množství .....	13
5.2.1	Odběrové nádoby .....	13
5.2.2	Odběr plodové vody – amniocentéza .....	13
5.2.3	Odběr periferní krve .....	14
5.2.4	Odběr potrácené tkáně .....	14
<b>6</b>	<b>Transport a manipulace s biologickým materiálem</b> .....	<b>15</b>
6.1	Skladování odebraných vzorků .....	15
6.2	Informace k dopravě vzorků .....	15
<b>7</b>	<b>Příjem vzorků do laboratoře</b> .....	<b>16</b>
7.1	Identifikační označení primárního vzorku .....	16
7.2	Žádanka na laboratorní vyšetření .....	16
7.2.1	Ústní nebo dodatečná vyšetření .....	17
7.2.2	Požadavek na statimová vyšetření .....	17
7.2.3	Kritéria pro přijetí nebo odmítnutí vadných (kolizních) primárních vzorků .....	17
7.2.4	Řešení neshod na příjmu .....	18
<b>8</b>	<b>Fáze po vyšetření</b> .....	<b>18</b>
8.1	Bezpečné odstraňování materiálů použitých při odběru .....	18
8.2	Dodatečná vyšetření a časový interval pro jejich požadování .....	18

8.2.1	Opakování vyšetření nebo další vyšetření stejného primárního vzorku.....	19
8.3	Manipulace a skladování materiálu.....	19
8.3.1	Skladování před a v průběhu vlastního vyšetření.....	19
8.3.2	Skladování po vyšetření.....	19
8.3.3	Likvidace biologického materiálu po vyšetření laboratoří .....	20
<b>9</b>	<b>Vydávání výsledků a komunikace s laboratoří .....</b>	<b>20</b>
9.1	Termíny dodání výsledků.....	20
9.1.1	Úsek molekulární genetiky .....	20
9.1.2	Úsek cytogenetický.....	21
9.2	Informace o formách vydávání výsledků.....	21
9.3	Stanovení varovných nebo kritických rozmezí .....	21
9.4	Změny výsledků a nálezů.....	21
9.5	Revize klasifikací nálezů a interpretací výsledků .....	22
9.6	Konzultační činnost laboratoře .....	22
9.7	Způsob řešení stížností.....	22
9.8	Obecné zásady laboratoře na ochranu osobních informací .....	22
<b>10</b>	<b>Přílohy .....</b>	<b>23</b>

## 1 Úvod

Laboratorní příručka je dokumentem, který má za úkol informovat žadatele o vyšetření o nabídce našich služeb a poskytnout jim základní informace v preanalytické a postanalytické fázi.

Snažili jsme se, aby se stala obecným průvodcem našich činností a hlavně, aby poskytla dostatek potřebných informací laboratorním i ostatním zdravotnickým zaměstnancům z preanalytické, analytické a postanalytické fáze, které jsou nutné pro docílení správného výsledku analýzy a jeho vyhodnocení v diagnostickém i léčebném procesu.

Tato příručka má napomoci ke zlepšení komunikace s uživateli laboratorních služeb a taktéž ke zviditelnění naší práce.

Tištěná a/nebo elektronická verze Laboratorní příručky je poskytnuta uživatelům laboratorního vyšetření jedenkrát v aktuální verzi s platností v době schválení. Následně je pravidelně aktualizována.

### 1.1 Oblast platnosti

Laboratorní příručka – „příručka pro odběr primárních vzorků“ byla vypracována se záměrem unifikovat postupy preanalytické fáze (fáze před vlastním provedením laboratorního vyšetření) a ke zvýšení standardizace a jednotnosti postupů.

Odběr vzorků je nedílnou součástí úspěšně provedeného laboratorního vyšetření.

Laboratorní příručka je informativním dokumentem pro lékaře (žádající vyšetření), pacienty a zdravotnický personál a předává jim základní požadavky pro odběr vzorků.

LP je volně přístupná na [www.clg.cz](http://www.clg.cz) a zákazníci laboratoře jsou informováni o aktualizacích a provedených změnách v této příručce.

CENTRUM LÉKAŘSKÉ  
**GENETIKY** s.r.o.

Novohradská 68/1806, 370 08 České Budějovice

**Laboratorní příručka**

Vydání: 20.

Změna: 1

Datum: 27.12.2019

## 2 Základní informace o laboratoři

<b>Kontaktní údaje</b>		
<b>Centrum lékařské genetiky s.r.o.</b>		
<b>Adresa:</b>	Novohradská 68/1806 370 08 České Budějovice	
<b>Statutární zástupce:</b>	MUDr. Karel Čutka MUDr. David Čutka	
<b>Kontakt:</b>	387 204 618	e-mail: info@clg.cz
<b>Provozní doba ambulancí: (provádění odběrů)</b>	<b>Po – Pá 8,00 – 15,00</b> <b>So : dle dohody</b>	
<b>Konzultující lékaři</b>		
MUDr. David Čutka	387 204 618	e-mail: info@clg.cz
MUDr. Milada Lacinová	dtto	dtto
<b>Laboratoře</b>		
<b>Vedoucí laboratoře</b>	MUDr. David Čutka	
<b>Kontakt:</b>	387 204 618	e-mail: info@clg.cz
<b>Vedoucí úseku CG</b>	Ing. Markéta Lysá	
<b>Kontakt:</b>	387 006 423	e-mail: lysa@clg.cz
<b>Vedoucí úseku MG</b>	Ing. Barbora Kváčová, Ph.D.	
<b>Kontakt:</b>	387 006 424	e-mail: kvacova@clg.cz
<b>Manažer kvality</b>	Ing. Barbora Kváčová, Ph.D.	
<b>Kontakt:</b>	387 006 424	e-mail: kvacova@clg.cz

### 3 Spektrum nabízených služeb a seznam laboratorních vyšetření

#### 3.1 Seznam nabízených vyšetření

##### Akreditovaná vyšetření

SP-CG-01	Cytogenetické stanovení karyotypu z lidských buněk
SP-CG-02	Vyšetření biologického materiálu metodou FISH
SP-MG-01	Molekulárně genetické vyšetření mutací v genech metodou PCR-RFLP
SP-MG-02	Molekulárně genetické vyšetření mikroleceí v azoospermické oblasti chromozómu Y (AZFa, AZFb, AZFc) multiplex PCR
SP-MG-03	Molekulárně genetické vyšetření mutací v genech metodou reverzní hybridizace.
SP-MG-04	Molekulárně genetické vyšetření aneuploidií chromozómů 13, 18, 21, X, Y pomocí STR markerů metodou QF PCR (Amnio PCR)
SP-MG-06	Molekulárně genetické vyšetření mutací v genech metodou Real-Time PCR
SP-MG-08	Mutační analýza/screening genů metodou Sangerova sekvenování
SP-MG-09	Mutační analýza genů metodou masivně paralelního sekvenování (platforma MiSeq, Illumina) *
SP-MG-10	Molekulárně genetické vyšetření syndromu fragilního X chromozómu (FRAXA) metodou PCR a TP-PCR
SP-MG-11	Vyšetření intragenových přestaveb metodou MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification)
SP-MG-12	Vyšetření přestaveb lidského genomu metodou Array CGH
SP-MG-13	Neinvasivní prenatální vyšetření (NIPT) metodou masivně paralelního sekvenování (Illumina)
SP-MG-14	Molekulárně genetické vyšetření HLA alel asociovaných k celiakii/lepkové intoleranci metodou SSP-PCR

\*ONKO: ATM, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, NBN, PALB2, PTEN, RAD51C, STK11, TP53, APC, CDH1, EPCAM, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, BARD1, FAM175A, RAD50, RAD51D, PMS2/PMS2CL.

ONKO Plus: ATM, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, NBN, PALB2, PTEN, RAD51C, STK11, TP53, APC, EPCAM, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, BARD1, FAM175A, RAD50, RAD51D, PMS2, PMS2CL, MRE11A, PIK3CA, XRCC2

##### Neakreditovaná vyšetření

SP-CG-03	Vyšetření biologického materiálu metodou FISH – PGD
SP-CG-05	Stanovení orientačního spermogramu
SP-MG-15	Vyšetření přestaveb lidského genomu u embryí metodou Array CGH.

#### 3.2 Úsek molekulární genetiky

##### 3.2.1 Izolace a uchování vzorků DNA

Prvním krokem molekulárně genetických metod je izolace DNA z různých biologických materiálů. Izolace DNA je prováděna za pomoci komerčně vyráběných izolačních kitů nebo pomocí poloautomatického izolátoru a je zaměřena na:

- a) izolace DNA z periferní krve;
- b) izolace cfDNA z krevní plazmy;
- c) izolace DNA z nekultivovaných buněk plodové vody;
- d) izolace DNA z kultivovaných buněk plodové vody;
- e) izolace DNA z choriových klků (CVS);
- f) izolace DNA z buněk bukalní sliznice (BC);
- g) izolace DNA z tkáně potracených plodů.

### **3.2.2 Molekulárně genetické vyšetření mutací v genech metodou PCR-RFLP a Real-Time PCR - trombofilní stavy**

Vyšetření trombofilních stavů je zaměřeno na odhalení mutace FV Leiden (G1691A) v genu pro koagulační faktor V, mutace G20210A v genu pro koagulační faktor II a mutací C677T a A1298C v genu pro methylenetetrahydrofolát reduktázu (MTHFR). Pro testaci je používána amplifikace s následným restrikcčním štěpením anebo kvantitativní PCR s vyhodnocením v reálném čase.

### **3.2.3 Molekulárně genetické vyšetření mikrodeleci azoospermické oblasti chromozómu Y (AZFa, AZFb, AZFc) multiplex PCR**

Diagnostické testování mikrodeleci v AZF oblasti je prováděno PCR amplifikacemi pomocí STS primerů. Analyzovány jsou vždy dva STS lokusy v každé AZF oblasti. Pro multiplex PCR jsou používány následující STS primery: AZFa oblast (sY84, sY86), AZFb oblast (sY127, sY134) a AZFc oblast (sY254, sY255). Do analýzy byl dále zahrnut gen SRY a gen ZFX/ZFY.

### **3.2.4 Molekulárně genetické vyšetření mutací v genech metodou reverzní hybridizace – gen pro cystickou fibrózu**

K vyšetření mutací v genu CFTR je v současné době používán kit CF StripAssay™ vyráběný firmou ViennaLab.

Pomocí zmíněného kitu je vyšetřováno celkem 34 mutací v genu CFTR: CFTRdel2,3(21kb), I507del (-ATC), F508del (-CTT), 1717-1G>A, G542X, G551D, R553X, R560T, 2143delT, 2183AA>G, 2184delA, 2184insA, 2789+5G>A, R1162X, 3659delC, 3905insT, W1282X, N1303K, G85E, 394delTT, R117H, Y122X, 621+1G>T, 711+1G>T, 1078delT, R334W, R347H, R347P, A455E, 1898+1G>A, 3120+1G>A, 3272-26A>G, Y1092X, 3849+10kbC>T. Dále je odhalen intragenový polymorfismus Tn variant (5T, 7T, 9T) v intronu 8, kdy je identifikována homo- či heterozygotní přítomnost nebo absence 5T alely související s CBAVD (congenital bilateral absence of the vas deferens).

K vyšetření mutací v genu CFTR jsou používány kity Amplification CFTR kit, INNO-LiPA CFTR19 a INNO-LiPA CFTR17+Tn Update vyráběné firmou INNOGENETICS.

Pomocí zmíněných kitů je vyšetřováno celkem 36 mutací v genu CFTR: F508del, G542X, N1303K, W1282X, G551D, 1717-1G→A, R553X, CFTRdele2,3(21kb), I507del, 711+1G→T, 3272-26A→G, 3905insT, R560T, 1898+1G→A, S1251N, I148T, 3199del6,

3120+1G→A a Q552X. 621+1G→T, 3849+10kbC→T, 2183AA→G, 394delTT, 2789+5G→A, R1162X, 3659delC, R117H, R334W, R347P, G85E, 1078delT, A455E, 2143delT, E60X, 2184delA a 711+5G→A. Dále je odhalen intragenový polymorfismus Tn variant (5T, 7T, 9T) v intronu 8, kdy je identifikována homo- či heterozygotní přítomnost nebo absence 5T alely související s CBAVD (congenital bilateral absence of the vas deferens).

K vyšetření mutací v genu CFTR a zejména stanovení počtu TG repetice u potenciálně patogenní varianty 5T je používán neakreditovaný postup využívající diagnostickou soupravu Devyser CFTR Core - CE IVD vyráběnou firmou Devyser. Varianta poly-T regionu CFTR genu 5T je variantou s variabilní klinickou konsekvencí. Alela 5T v 90 % znemožňuje normální sestřih exonu 9. Důsledkem je pak chybění exonem 9 kódované části CFTR proteinu.

### **3.3.5. Molekulárně genetické vyšetření aneuploidii chromozómů 13, 18, 21, X, Y pomocí STR markerů metodou QF PCR (Amnio PCR)**

Vyšetření Amnio PCR je rychlou diagnostickou metodou odhalující obecně známé chromozomální abnormality (aneuploidie chromozómů 13, 18, 21, X a Y) využívající PCR techniku. K vyšetření aneuploidii chromozómů 15, 16, 22 je používán neakreditovaný postup využívající diagnostickou soupravu Devyser Extend M1 v2 – CE IVD vyráběnou firmou Devyser.

### **3.3.6. Molekulárně genetické vyšetření HLA alel asociovaných k celiakii/lepkové intoleranci metodou SSP-PCR**

Celiakie/lepková intolerance je chronické celoživotní onemocnění, charakterizované trvalou nesnášenlivostí lepku (glutenu). Výskyt je celosvětový, s výraznými regionálními rozdíly a v naší střeoevropské oblasti je udáván počtem 1:200 – 300. Dokladem genetické dispozice je autozomální dědičnost s neúplnou penetrancí. U příbuzných 1. stupně se celiakie vyskytuje v 8-18%, u jednovaječných dvojčat v 70%.

Celiakie je multifaktoriální onemocnění asociované s alelami HLA-DQ2 (DQA1\*05/DQB1\*02), HLA-DQ8 (DQA1\*0301/DQB1\*0302) nebo HLA-DRB1\*04. Expresse zmíněných alel je nezbytná, ne však dostatečná k propuknutí celiakie, předpokládá se pouze asi 50% vliv genetické složky na vzniku celiakie. HLA DQ2 alela je exprimována u většiny osob trpící celiakií (>90%), DQ8 alela poté asi u 8%. Z malé skupiny osob trpících celiakií a negativních pro HLA-DQ2 alelu, je drtivá většina pozitivní na HLA-DRB1\*04 alelu. Z tohoto pohledu je absence zmíněných alel velmi dobře využitelná pro vyloučení celiakie.

### **3.3.7 Mutační analýza/screening genů metodou Sangerova sekvenování – BRCA1, BRCA2, ONKO, ONKO Plus**

Přímé sekvenování DNA patří již řadu let ke standardním postupům používaných při molekulárně genetické diagnostice dědičných chorob. Z molekulárních analýz je jeho největší výhodou možnost zachytit a identifikovat mutaci zodpovědnou za onemocnění u postižených

jedinců a ve sledované rodině. Podmínkou této metody je však znalost lokalizace genu a znalost jeho standardní/referenční sekvence. Mutační analýza zahrnuje namnožení kódujících genových sekvencí a následnou charakterizaci genových alterací přímým sekvenováním produktů PCR.

Sangerovým sekvenováním jsou dále neakreditovaně ověřovány nalezené varianty v rámci vyšetření ONKO a ONKO Plus panelu (vyjma BRCA1 a BRCA2).

### **3.3.8 Mutační analýza genů metodou masivně paralelního sekvenování (platforma MiSeq, Illumina) – BRCA1, BRCA2, ONKO, ONKO Plus**

Mutační analýzy genů, prováděné standardními metodami (přímé sekvenování a další) jsou technicky časově i finančně velmi náročné. Sekvenování nové generace ("next-generation sequencing", NGS) je revoluční technologie, která poskytuje levné, správné a přesné informace o genomické sekvenci. Umožňuje paralelní sekvenování multiplexů různých DNA fragmentů. Kombinace metody multiplex PCR (amplifikace specifických cílových sekvencí) s následným resekvenováním za využití platformy firmy Illumina umožňuje resekvenovat a charakterizovat široké spektrum genů nebo oblastí genů, zodpovědných nebo podílejících se na genetických onemocněních, a to u mnoha pacientů současně. Tento metodický postup umožňuje vysoce výkonné a finančně efektivní sekvenování, přináší ve výrazně kratší době správné a přesné výsledky o velmi vysoké vypovídací hodnotě.

Systém Illumina MiSeq® kombinuje osvědčenou technologii Sequencing by synthesis (SBS), která umožňuje generování klusterů, sekvenování a analýzu dat na jediném přístroji.

Sekvenační technologií jakou je masivně paralelní sekvenování je možné testování sekvencí desítek až stovek genů současně, což umožňuje testování známých, vysoce rizikových i potencionálně rizikových genů.

Použitím CE IVD diagnostické soupravy Hereditary Cancer Solution by Sophia Genetics je možné analyzovat v jednom sekvenačním běhu 27 genů asociujících k hereditárním nádorovým onemocněním. Z těchto 27 genů byly sestaveny dva panely ONKO (analýza vybraných 24 genů) a ONKO Plus (kompletní analýza všech 27 genů), kde jsou analyzovány geny s převažující predispozicí k nádorům prsu, ovárií a dělohy a nádory gastrointestinálního traktu.

ONKO: ATM, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, NBN, PALB2, PTEN, RAD51C, STK11, TP53, APC, CDH1, EPCAM, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, BARD1, FAM175A, RAD50, RAD51D, PMS2/PMS2CL.

ONKO Plus: ATM, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, NBN, PALB2, PTEN, RAD51C, STK11, TP53, APC, EPCAM, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, BARD1, FAM175A, RAD50, RAD51D, PMS2, PMS2CL, MRE11A, PIK3CA, XRCC2.

O vhodnosti volby testovaného panelu genů rozhoduje klinický genetik na základě podrobné genetické konzultace. V rámci tohoto vyšetření je se souhlasem pacienta prováděno uchování jeho genetického materiálu v bance Centra za účelem eventuálního pozdějšího dovyšetření v závislosti na pokroku ve výzkumu v této oblasti.

### 3.3.9 Molekulárně genetické vyšetření syndromu fragilního X chromozómu (FRAXA) metodou PCR a TP-PCR

Syndrom fragilního X chromozómu (FRAXA, Martin-Bell syndrom) je X vázané dědičné onemocnění, které je v naprosté většině případů způsobeno expanzí CGG repetitivní sekvence, nacházející se v 5' nepřekládané oblasti *FMRI* genu (Xq27.3). Projevuje se mentální retardací spojené s dysmorfickými rysy, kterými jsou především vysoké čelo, úzký protažený obličej, výrazná brada, velké odstávající uši a u mužů makroorchidismus. Často jsou pozorovány poruchy chování zahrnující hyperaktivitu a autizmus. Onemocnění se může vlivem lyonizace X chromozómu projevit také u žen. Asi jedna třetina žen nesoucí plnou mutaci má mírnou nebo střední mentální retardaci. Incidence tohoto onemocnění je uváděna jako 1:3000 – 1:5000 u mužů.

AmplideX™ *FMRI* PCR Kit je diagnostický komerční kit určený pro použití v klinických laboratořích za účelem amplifikace a detekce cytosin-guanin-guanin (CGG) repetitivní sekvence v 5'-netranslatované oblasti *FMRI* genu. Tento kit je určen k diagnostice syndromu fragilního X a syndromů s ním asociovaných, jako např. Tremor-ataxie syndrom (FX-TAS) a primární ovariální insuficience (FX-POI).

### 3.3.10 Vyšetření intragenových přestaveb metodou MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification) – *BRCA1*, *BRCA2*, *SMN1* a *SMN2*, *ONKO*, *ONKO Plus*

Patogenní mutace v genu *BRCA1* jsou nejčastější monogenně podmíněnou příčinou hereditární formy nádoru prsu a ovaria. Záchyt patogenních mutací u vysoce rizikových pacientů závisí kromě přísnosti výběrových kritérií také na zvolených postupech molekulárně genetického vyšetření. Jednou z možností podhodnocení záchytu u vysoce rizikových rodin může být přítomnost intragenového přeskupení, které nelze detekovat v rámci standardního screeningu založeného pouze na PCR metodách. U vysoce rizikových jedinců je k tomuto screeningu vhodné zařadit také vyšetření umožňující detekci velkých genomických delecí/duplikací zahrnujících celé exony genu.

Podle údajů z literatury se množství nalezených genových přestaveb v *BRCA1* a *BRCA2* genu v různých populacích značně liší. Záchyt se pohybuje v rozmezí ~10% z celkového počtu detekovaných mutací v těchto genech a detekovaná přeskupení jsou často populačně specifická.

SMA je po Duchennově svalové dystrofii druhé nejčastější neuromuskulární onemocnění, je to také druhá nejčastější příčina úmrtnosti kojenců na autozomálně recesivní onemocnění. Tato choroba postihuje přední rohy míšni a často i motorická jádra hlavových nervů. Periferní nervy ani cerebrospinální dráhy nejsou postiženy. Projevuje se především výraznou svalovou hypotonií s hypo – až areflexií končetin, svalovou hypotrofií až atrofií a fascikulacemi jazyka. Patogeneze ani kauzální terapie SMA doposud není známa, diagnostika je založena na molekulárně-genetickém vyšetření. V 95 % proximálních forem SMA byla prokázána kauzální mutace v *SMN* genu na chromozomu 5q13.

Stěžejní roli zde hrají dva sekvencně vysoce podobné geny: *SMN1* a *SMN2*, lokalizované na chromozomu 5q13. Oba dva geny kódují stejný protein a liší se pouze dvěma single-nukleotidovými rozdíly: jeden se nachází v exonu 7 a druhý v exonu 8. Tento single-

nukleotidový rozdíl má vliv na sestřih mRNA a ve výsledku je gen *SMN2* efektivní pouze z 10-15% v produkci funkčního SMN proteinu v porovnání s genem *SMN1*.

Více než 95% pacientů postižených SMA mají homozygotní delecii alespoň exonu 7 genu *SMN1*. Naprostá většina nositelů SMA může být identifikována přítomností pouze jedné kopie exonu 7 *SMN1* genu. Počet kopií *SMN2* genu je velmi variabilní. Jedinci, kteří nesou obě kopie tohoto genu jsou v obecné populaci zastoupeni pouze v rozmezí 60-70%. Za podmínky, že je přítomna alespoň jedna kopie *SMN1* genu, úplná absence *SMN2* genu nemá žádné klinické dopady na jedince. Počet kopií *SMN2* genu hraje velmi významnou roli pro pacienty postižené SMA. Čím více kopií pacient nese, tím je očekávána méně agresivní forma onemocnění.

Metodou MLPA jsou dále neakreditovaně ověřovány rozsáhlé intragenové přestavby nalezené v rámci vyšetření ONKO a ONKO Plus panelu (vyjma BRCA1 a BRCA2).

### **3.3.11 Vyšetření přestaveb lidského genomu metodou Array CGH**

Principem metody je komparativní genomová hybridizace za účelem vyšetření mikrodelecií a mikroduplikací v celém genomu.

### **3.3.12 Neinvazivní prenatální vyšetření (NIPT) metodou masivně paralelního sekvenování (Illumina)**

Sekvenování nové generace ("next-generation sequencing", NGS) je revoluční technologie, která poskytuje levné, správné a přesné informace o genomické sekvenci. Umožňuje paralelní sekvenování multiplexů různých DNA fragmentů. Kombinace metody multiplex PCR (amplifikace specifických cílových sekvencí) s následným resekvenováním za využití platformy firmy Illumina umožňuje resekvenovat a charakterizovat široké spektrum genů nebo oblastí genů, zodpovědných nebo podílejících se na genetických onemocněních, a to u mnoha pacientů současně. Tento metodický postup umožňuje vysoce výkonné a finančně efektivní sekvenování, přináší ve výrazně kratší době správné a přesné výsledky o velmi vysoké vypovídací hodnotě. Systém Illumina MiSeq®, NextSeq® a další kombinuje osvědčenou technologii Sequencing by synthesis (SBS), která umožňuje generování klusterů, sekvenování a analýzu dat na jediném přístroji.

Neinvazivní prenatální testování (NIPT) je moderní technikou využívající masivní paralelní nebo cílené sekvenování volné fetální DNA (cfDNA) z krve těhotné ženy pro přesnou detekci chromozomálních vad u plodu v současné graviditě.

Clarigo v2 (CE IVD) je určen pro neinvazivní testování nejčastějších početních odchylek chromozómů 13 (Patauův syndrom), 18 (Edwardsův syndrom) a 21 (Downův syndrom) a pro zjištění pohlaví plodu. Test může stanovit riziko vad pohlavních chromozómů. Stanovení rizik vad pohlavních chromozómů není dosud validováno a nevylučuje tedy možnost anomálií pohlavních chromozómů u plodu.

Metodika je zaměřena na analýzu volných fragmentů DNA plodu cirkulujících v mateřské krvi, díky nimž je detekováno více než 4000 oblastí lokalizovaných na chromozómech 13, 18, 21, X a Y. Početní odchylka je pak charakterizována statisticky významným zvýšením četnosti fragmentů z určitého chromozómu.

### 3.3 Úsek cytogenetiky

#### 3.3.1 Chromozomální vyšetření

Slouží k určení karyotypu klasickými cytogenetickými metodami a fluorescenční in situ hybridizací. Vyšetření je možno provádět z:

- Z plodové vody/CVS.
- Z periferní krve.
- Z tkáně potracených plodů.

Účelem vyšetření je stanovení početních, strukturních, případně získaných chromozomálních aberací.

## 4 Prohlášení o souhlasu

Některé odběry pro laboratorní vyšetření prováděná v rámci CLG patří mezi invazivní a lékař odebírající materiál je povinen informovat pacienty a pořídit písemný souhlas o tomto informování. Pacient je vždy seznámen s účelem, povahou a důsledkem prováděného vyšetření.

Svým podpisem stvrzuje, že souhlasí s odběrem a případným uchováváním odebraného genetického materiálu (je vždy uvedeno v informovaném souhlasu DNA).

**Samostatnou přílohou této příručky jsou formuláře pro informovaný souhlas:** (přesné odkazy na naše INFO souhlasy)

- **Informovaný souhlas k odběru vzorku DNA**
- **Informovaný souhlas k odběru plodové vody**
- **Informovaný souhlas k odběru krve, uchování DNA a s molekulárně genetickým vyšetřením ONKO a ONKO Plus**
- **Souhlas vyšetřované (zákonného zástupce) s neinvazivním prenatálním testováním testem aneuploidii chromozomů 21, 18 a 13 (NIPT Clarigo test)**

Součástí informovaného souhlasu jsou pokyny pro pacienty, které obsahují informace související s přípravou pacienta před odběrem vzorků.

## 5 Manuál pro odběr primárních vzorků

V této kapitole jsou uvedeny požadavky a pokyny pro odběr zpracovávaných biologických materiálů – doporučené odběrové nádoby, minimální odebírané množství, požadavky na transport a případné zvláštní načasování odběru.

## 5.1 Základní informace pro odběr primárního vzorku včetně zvláštního načasování

### *Klinické informace*

Důvodem odběru plodové vody je požadavek na chromozomální vyšetření buněk plodu z amniocytů, stanovení hladiny alfafetoproteinu, popř. vyšetření jednotlivých genů. Odběr se provádí nejčastěji mezi 16.-18. týdnem gravidity, lze ho však provést již od 14. týdne gravidity. Odběr se provádí i v pozdějších týdnech gravidity, zde je potřeba brát v úvahu, že přerušení těhotenství z důvodu poškození plodu je až na výjimky povoleno pouze do konce 24. týdne těhotenství.

Termíny dodání výsledků se vztahují na běžný provoz laboratoře. Termíny kultivace preparátů se pohybuje mezi 10–20 dny podle množství a typu amniocytů. Jedná se o invazivní vyšetření, proto musí být uveden jasný důvod k provedení amniocentézy. Buňky se začínají kultivovat v den odběru, kultivace a vyhodnocení výsledku trvá cca 4 týdny. Při odběru je tedy potřeba počítat s dostatečnou lhůtou na kultivaci a zpracování vzorku. V případě využití metody FISH jsou výsledky k dispozici do 5 pracovních dnů (statimová do 3 pracovních dnů). Výsledky vyšetření Amnio PCR/QF PCR jsou k dispozici do 5 pracovních dnů. Pro odběr krve matky, příp. otce, určené k porovnání s výsledkem vyšetření Amnio PCR/QF PCR plodu, je nutná informace, zda pár nepodstoupil umělé oplodnění s využitím dárcovství oocytů či spermatu.

Chromozomální vyšetření z krve se provádí z dělicích se buněk T-lymfoctů stimulovaných phytohaemaglutininem. Nelze odebírat pacientovi a zejména novorozenci krev po infúzi a už vůbec po transfúzi (do 3 měsíců po výkonu) či transplantaci kostní dřeně (výsledkem zkoušky by byl karyotyp dárce a ne pacienta). Výsledek vyšetření je k dispozici do 4 týdnů, v případě statimového požadavku do 3 týdnů.

Periferní krev/stěry z bukálních sliznic jsou dále odebírány z důvodu molekulárně genetického vyšetření jednotlivých genů. Vzorek krve nelze odebírat pacientovi a zejména novorozenci po infúzi a už vůbec ne po transfúzi (do 3 měsíců po výkonu) či transplantaci kostní dřeně. Výsledek vyšetření je k dispozici do 3 týdnů (individuálně podle vyšetření), v případě statimového požadavku za 5 pracovních dnů.

Odběr periferní krve za účelem separace krevní plazmy určené k NIPT vyšetření nelze realizovat z následujících důvodů: chromozomální aberace matky, mozaicismu u plodu, chimérizmu, těhotenství z darovaného oocytu, vícečetného těhotenství, syndromu mizejícího dvojčete, absolvování transfúze krve, imunoterapii, terapii kmenovými buňkami, transplantaci či radiační terapii (**minimální odstup 6 měsíců**), BMI těhotné ženy nad >35. Před odběrem je doporučován dostatečný pitný režim a minimálně den před plánovaným odběrem střídá strava se sníženým obsahem tuků v potravinách. Výsledek vyšetření je k dispozici do 3 týdnů, v případě statimového požadavku za 2 týdny.

## 5.2 Vlastní odběr včetně minimálního množství

### 5.2.1 Odběrové nádoby

Materiál musí být dodáván do laboratoře ve sterilních odběrových nádobách nebo zkumavkách, pokud možno na jedno použití.

Plodová voda a chorium jsou odebírány do kultivačních nádobek nebo sterilních zkumavek. Pro odběr periferní krve doporučujeme užívat uzavřený vakuový systém s barevně rozlišenými zkumavkami s vhodnými konzervanty.

Doporučené odběrové systémy, minimálně konzervační látky, jsou:

- **plodová voda**
  - zkumavky Vacuette - žluté víčko. Odběr do zkumavek bez konzervační látky;
- **periferní krev**
  - chromozomální vyšetření:
    - zkumavky Vacuette – zelené víčko (náplň lithium heparin);
  - molekulárně genetické vyšetření:
    - zkumavky Vacuette – fialové víčko (náplň K<sub>3</sub>EDTA);
  - neinvazivní prenatální testování:
    - zkumavky STRECK
- **tkáň potracených plodů**
  - zkumavka s médiem Amniomax – fa Gibco nebo s fyziologickým roztokem;
- **choriové klky**
  - zkumavky Vacuette 9 ml – zelené víčko (náplň sodium heparin)
- **buňky bukalní sliznice**
  - nylonové sterilní tampony

Při odběru je nutné vždy odběrové nádoby vhodně označit (dle uvedených pravidel). Zamezit možnosti záměny a kontaminace biologického materiálu! Je-li dodán materiál v transportní nádobce, která je zevně potřísněna, nemůže být takový vzorek dále zpracováván. Celá odběrová nádobka i s biologickým materiálem je likvidována v souladu s předpisy o likvidaci infekčního materiálu.

Odběr provedený nestandardním postupem je nutno specifikovat na žádance o vyšetření.

### 5.2.2 Odběr plodové vody – amniocentéza

Vlastní odběr se provádí na specializovaném pracovišti v odběrovém sále odborně proškoleným personálem pod kontrolou ultrazvukem, aby nedošlo k poranění plodu.

K chromozomálnímu vyšetření karyotypu z buněk plodové vody je potřeba získat 15-20 ml plodové vody, která je již při odběru rozdělena do dvou sterilních zkumavek a řádně označena. Pokud je požadováno vyšetření metodami FISH či Amnio PCR je odebráno o 2-5

ml více.

Při vlastním odběru je pod kontrolou ultrazvuku proveden vpich do dutiny břišní za pomoci jehly o průměru 0,9 mm s mandrenem. Nejprve je odsáto cca 1 ml plodové vody, která není použita pro kultivaci. Tímto úkonem je zamezena možná kontaminace materiálem pocházejícím od matky, který by mohl zkreslit výsledek. Teprve poté je odebráno potřebné množství pro vyšetření. Minimální odebrané množství potřebné pro vyšetření je 10 ml, optimum 15-20 ml.

V případě, že plodová voda je odebrána na jiném pracovišti než v CLG, je při transportu do laboratoře vhodné užívat transportní nádobu – např. „termotašku“ nebo „termosku“. Transport do laboratoře je nutno zajistit v co nejkratší době, nejpozději do 24 hodin. Materiál je doprovázen řádně vyplněnou žádankou o vyšetření.

### **5.2.3 Odběr periferní krve**

Odběr periferní krve na cytogenetické i molekulárně genetické vyšetření nevyžaduje žádnou speciální přípravu pacienta. Pacientkám před odběrem pro neinvazivní prenatální testování je doporučován dostatečný pitný režim a omezený příjem tučných jídel.

Krev je odebírána z periferní žíly v loketní jamce za použití uzavřeného vakuového systému Vacuteiner s barevně rozlišenými zkumavkami s různými protisrážlivými přísadami. Pro odběr na cytogenetické vyšetření je používána zkumavka se zeleným uzávěrem (heparin), pro molekulárně genetické s uzávěrem fialovým (K<sub>3</sub>EDTA). Pro neinvazivní prenatální testování vakueta STRECK.

Paže pacienta je volně položena, dezinfikována (dezinfekční látka bez obsahu jódu – negativně ovlivňuje kultivaci) a po stabilizaci polohy žíly je proveden vpich s nástavcem, do něhož je vložena zkumavka. Bezprostředně po odběru je nutné zkumavku s krví důkladně promíchat, aby bylo zabráněno tvorbě sraženin. Rána po vpichu je přelepena náplastí a pacient si tiskne místo vpichu (cca 2-5 minut).

Optimální odebrané množství je 4–5 ml krve, minimálně však 2 ml (např. u malých dětí). Odebraná krev je uchovávána v lednici, při teplotě 4–9 °C. Je nutné zabránit zmrznutí nebo přehřátí krve, aby se zachovaly živé buňky. Materiál pro neinvazivní prenatální testování je uchováván při pokojové teplotě, nejdéle 48 hodin do jeho zpracování (separace krevní plazmy).

Při transportu do laboratoře je vhodné užívat transportní nádobu – např. „termotašku“ nebo „termosku“. Transport do laboratoře je nutno zajistit v co nejkratší době, nejpozději do 96 hodin. Materiál je doprovázen řádně vyplněnou žádankou o vyšetření.

### **5.2.4 Odběr potracené tkáně**

Odběr je prováděn za účelem chromozomálního vyšetření buněk potraceného plodu. Materiál musí být odebrán za sterilních podmínek, vložen do sterilní, řádně označené zkumavky či nádoby s médiem nebo fyziologickým roztokem. K vyšetření je potřeba zaslat vzorek o velikosti několika mm. Vzorek je do laboratoře odeslán nejlépe ihned po odběru, nejdéle však do 24 hodin s řádně vyplněnou žádankou o vyšetření.

### **5.2.5 Odběr choriových klků**

Vlastní odběr se provádí na specializovaném pracovišti v odběrovém sále odborně

proškoleným personálem pod kontrolou ultrazvukem. Odebrané choriové klky jsou pro DNA vyšetření vloženy do mikrozkrumavky a do zpracování skladovány v chladícím zařízení při teplotě 4–9 °C.

Při vlastním odběru je pod kontrolou ultrazvuku proveden vpich do dutiny břišní za pomoci jehly o průměru 0,9 mm s mandrenem. Následně jsou choriové klky odebrány do vacuety.

V případě, že CVS jsou odebrány na jiném pracovišti než v CLG, je při transportu do laboratoře vhodné užívat transportní nádobu – např. „termotašku“ nebo „termosku“. Transport do laboratoře je nutno zajistit v co nejkratší době, nejpozději do 24 hodin. Materiál je doprovázen řádně vyplněnou žádankou o vyšetření.

#### **5.2.6 Odběr buněk bukalní sliznice**

Odběr je prováděn sterilními nylonovými tampony důkladným vytřením sliznice dutiny ústní. Výtěrky jsou vloženy do řádně označených zkumavek. Materiál je do zpracování uchovávan v chladícím zařízení při teplotě 4–9 °C.

## **6 Transport a manipulace s biologickým materiálem**

### **6.1 Skladování odebraných vzorků**

Odebraný materiál, pokud není bezprostředně zpracován, je uložen do lednice při teplotě 4–9 °C, vyjma periferní krve pro NIPT testování, do nádoby k tomu určené. Tím je materiál do doby zpracování chráněn před znehodnocením, rozlitím, kontaminací, přímému vlivu slunečního záření apod. Veškerá manipulace s biologickým materiálem musí probíhat dle ustanovení § 6 Vyhlášky MZD č. 440/2000 Sb.

### **6.2 Informace k dopravě vzorků**

V případě zasílání vzorků k vyšetření do laboratoří CLG musí být při dopravě dbáno na šetrnost, rychlost a adekvátní teplotu transportu. Lékař požadující vyšetření odpovídá za zajištění transportu a zajištění bezpečnosti přepravce (vhodný způsob balení a označení odebraného vzorku).

Při transportu do laboratoře je vhodné užívat transportní nádobu (určenou pouze pro přepravu vzorků) – např. „termotašku“ nebo „termosku“. Transport do laboratoře je nutno zajistit v co nejkratší době, nejpozději do 24–48 hodin dle druhu materiálu (kapitoly 5.2.2-5.2.4). Materiál je doprovázen řádně vyplněnou žádankou o vyšetření. Během přepravy materiálu je nutné zabránit jakékoliv manipulaci, která by mohla být příčinou mechanického poškození. Dále je důležité odebraný materiál chránit před extrémními teplotami (před zmrznutím či přehřátím) a světlem, aby si buňky uchovaly schopnost kultivace a růstu. V případě, že nelze materiál přepravit ihned po odebrání uchováváme jej v lednici při 4–9 °C. Materiál pro neinvazivní prenatalní testování je uchovávan při pokojové teplotě, nejdéle 48 hodin do jeho zpracování.

Žadanky o vyšetření musí být uloženy odděleně v samostatném obalu, aby nedošlo při manipulaci s materiálem k jejich případnému poškození.

**Upozornění:**

Pokud došlo během transportu k mechanickému poškození odběrové nádoby s materiálem, je zákazník o této situaci telefonicky seznámen a požádán o zajištění nového odběru.

## **7 Příjem vzorků do laboratoře**

Veškerý biologický materiál musí být jednoznačně označen a doprovázen žádankou (požadavkovým listem, průvodkou) na vyšetření.

### **7.1 Identifikační označení primárního vzorku**

Každý materiál musí být označen štítkem s uvedením minimálně:

1. příjmení pacienta
2. rok narození nebo rodné číslo

V případě shodného příjmení je doplněn štítek o další upřesňující údaje (jméno, pořadové číslo atd.)

Neoznačený materiál může být odmítnut laboratoří k dalšímu zpracování.

### **7.2 Žádanka na laboratorní vyšetření**

Do laboratoře je přijímán materiál doprovázený žádankou (vždy podle druhu požadovaného vyšetření).

Žádanka musí vždy obsahovat:

**Povinné údaje:**

- jednoznačnou identifikaci pacienta
  - jméno, rodné číslo nebo datum narození (novorozenci, cizinci). V případě, že není totožnost pacienta známá, jiný způsob identifikace.
- identifikaci žadatele o vyšetření – IČZ lékaře, adresa a kontakt na žadatele (razítkem)\*
- diagnóza
- druh primárního vzorku – vyšetřovaný materiál – je patrný z názvu žádanky (AC – plodová voda, CVS – choriové klky, PER – periferní krev, DNA, FISH PCR – uvedeno v žádance, NIPT)
- požadovaná vyšetření
- informace o pacientovi
  - pohlaví, věk (pokud jsou důležité pro výsledky vyšetření) – a nelze je identifikovat z r.č., jména – uváděno u cizinců (Ž-žena, M-muž)
- datum a čas odběru primárního vzorku
- identifikaci pracovníka odebírajícího materiál\*\*
- datum a čas přijetí vzorku laboratoří (uveden na žádance/konkrétní Lab. knize/deníku)

**Nepovinné údaje:**

- Bydliště pacienta

➤ Telefon

*Poznámky:*

*\*V případě, že vyšetření FISH požaduje jako doplňkové pracovník laboratoře (na základě výsledku cytogenetických) není vyplňováno razítko a podpis lékaře*

*\*\*jestliže se jedná o odběr plodové vody/choriových klků – je odebírající pracovník totožný s žadatelem o vyšetření*

Pokud je zpracováván materiál odebraný mimo CLG s.r.o., musí být doprovázen žádankou s výše uvedenými náležitostmi.

### 7.2.1 Ústní nebo dodatečná vyšetření

Je to neobvyklá forma objednávání provedení vyšetření daného vzorku. Lze ji připustit jen ve výjimečných a urgentních situacích, kdy se jedná o doordínování některých vyšetření od pacientů a v případě, že je v laboratoři materiál a je vhodný ke zpracování.

V případě, že je v laboratoři materiál a je vhodný ke zpracování může žadatel o vyšetření požadovat další dovyšetření.

Požadavek je přijímán od lékaře nebo sestry, nikoli od pacientů (pokud nejsou samoplátci). V takovém případě je požadavek doplněn do Laboratorní knihy s uvedením data, žadatele a pracovníka převírajícího požadavek. Nebo je požadavek zaznamenán do sešitu Doplňující vyšetření – s výše uvedenými náležitostmi – kdy identifikace vzorku je dle příslušného laboratorního deníku.

U cytogenetických vyšetření je možné případná dovyšetření požadovat do 48 hodin od příjmu vzorku laboratoří. Na úseku MG lze požadovat vyšetření do doby uchování biologického materiálu (doba uchování dle informovaného souhlasu).

Laboratoř může využít buněčnou suspenzi uchovanou ve zkumavkách eppendorf – užívá se v rámci cytogenetického vyšetření, vyšetření FISH nebo molekulárně genetického vyšetření (doba uchování dle informovaného souhlasu).

### 7.2.2 Požadavek na statimová vyšetření

V případě, že lékař či žadatel o vyšetření požaduje urgentní/statimové vyšetření biologického materiálu, využije stejné žádanky jako pro ostatní běžná vyšetření a zřetelně je označí červeným slovem **STATIM**. Takto označená žádanka bude zpracována a **přednostně** odečtena.

### 7.2.3 Kritéria pro přijetí nebo odmítnutí vadných (kolizních) primárních vzorků

Odmítnout lze:

- žádanku s biologickým materiálem, na které chybí nebo jsou nečitelné základní údaje a nelze je pracovníky laboratoře zjistit (povinné dle kapitoly 7.2),
- žádanku nebo odběrovou nádobu znečištěnou biologickým materiálem,
- nádobu s biologickým materiálem, kde není způsob identifikace materiálu z hlediska nezaměnitelnosti dostatečný (příjmení, rok narození pacienta) \*

- nádobu s biologickým materiálem, kde zjevně došlo k porušení fáze před vyšetřením (nedodržení doby dodání materiálu na zpracování, špatné uložení vzorku)
- biologický materiál bez žádanky (bez uvedení požadavků oprávněné osoby)

*Poznámka:*

*\*v případě, že se jedná o těžce dostupný materiál (PV/CVS) je vždy zahájeno jeho zpracování, ale výsledky nejsou uvolněny, dokud pracovník odebírající vzorek nebo vedoucí úseku nepřevzme odpovědnost za jeho identifikaci.*

#### **7.2.4 Řešení neshod na příjmu**

Jedná-li se o nesoulad dodaného materiálu s dokumentací, ihned se zjišťují informace se žadatelem o vyšetření.

Biologický materiál, který nelze zpracovat (znehodnocen, nedostatek materiálu, porušení fáze před vyšetřením, neoprávněný požadavek) je zapsán do knihy „Neshod“.

Žadatel o vyšetření je informován o odmítnutí, obeznámen s důvody a požádán o nový odběr materiálu (záznamy jsou uvedeny v Knize neshod).

V případě, že vzorek neodpovídá požadavkům laboratoře (na kvalitu) je uvedeno v Laboratorní knize – v poznámce a pracovník, který vyhodnocuje výsledky, uvede případný vliv na konečný výsledek v poznámce/komentáři.

## **8 Fáze po vyšetření**

### **8.1 Bezpečné odstraňování materiálů použitých při odběru**

Veškerý materiál použitý při odběru primárních vzorků (vatové tampóny nebo buničité čtverce, rukavice) je považován za potencionálně infekční, ukládá se do nepropustného řádně označeného obalu a je likvidován v souladu s platnou legislativou. Za likvidaci odpovídá pracovník odebírající materiál. Ostré materiály (injekční jehly) jsou ukládány do plastových uzavíratelných nádob k tomu určených a jsou likvidovány obdobným způsobem. Skladování laboratorních vzorků a používaného materiálu probíhá v souladu s ustanoveními § vyhlášky 6 MZD č. 440/2000 Sb. ve znění pozdějších předpisů.

### **8.2 Dodatečná vyšetření a časový interval pro jejich požadování**

Časové rozpětí, ve kterém je možno požadovat dodatečné vyšetření:

a) u cytogenetických vyšetření do 48 hodin. Laboratoř může využít buněčnou suspenzi uchovanou ve zkumavkách eppendorf – užívá se v rámci cytogenetického vyšetření nebo vyšetření FISH.

b) u molekulárně genetických vyšetření do doby uchování biologického materiálu (dle informovaného souhlasu).

Dodatečná vyšetření nelze provést vždy. V případě požadavku na dodatečné vyšetření informuje oprávněný žadatel laboratoř s vyjasněním požadavků na dodatečné vyšetření.

Žadatel dodá kompletní žádanku s požadavky na dodatečná vyšetření. V případě požadovaných vyšetření u materiálu, který musí být okamžitě po doručení zpracován a nelze

jej skladovat (plodová voda, choriová tkáň apod.), lze některá dodatečná vyšetření provést do doby, než byl vzorek zpracován. Některá dodatečná vyšetření lze provést z již nakultivovaných buněk, požadavky na dodatečná vyšetření lze v těchto případech dodat po celou dobu kultivace.

Jedná-li se o vzorky periferní krve, je možné provést dodatečná vyšetření z opakované kultivace, výsledek však může být ovlivněn dobou skladováním materiálu (VŠ pracovník rozhodne o možnosti provedení dodatečného vyšetření).

### **8.2.1 Opakování vyšetření nebo další vyšetření stejného primárního vzorku.**

V případě, že je potřeba opakovat vyšetření z důvodu podezření na nesprávnost výsledku, je toto opakování provedeno na náklady laboratoře. Pokud primární vzorek již není k dispozici, je zahájena komunikace se žadatelem vyšetření, komunikaci zajišťuje lékař-genetik.

## **8.3 Manipulace a skladování materiálu**

Materiál je neprodleně po odběru uložen do lednice při teplotě 4–9 °C. Materiál pro neinvazivní prenatalní testování je uchováván při pokojové teplotě, nejdéle 48 hodin do jeho zpracování. Oprávněný pracovník jej převezme a dopraví do laboratoře ke zpracování tak, aby nedošlo k jeho znehodnocení fyzikálními vlivy, případně k ohrožení fyzických osob. V průběhu jeho zpracování je materiál uchováván dle podmínek uvedených v jednotlivých standardních postupech pro vyšetření. S materiálem je zacházeno v souladu s bezpečností práce a ochrany zdraví pracovníka.

### **8.3.1 Skladování před a v průběhu vlastního vyšetření**

Materiál zpracováváný v laboratoři molekulární genetiky je skladován před vyšetřením v lednici při 4–9 °C. Materiál pro neinvazivní prenatalní testování je uchováván při pokojové teplotě, nejdéle 48 hodin do jeho zpracování. Odebrané plodové vody (CVS či potracená tkáň) určené k vyšetření karyotypu jsou bezprostředně po odběru nasazeny. Plodová voda určená k vyšetření FISH je skladována před vyšetřením v lednici při 4–9 °C. Periferní krev určená k cytogenetickému vyšetření (karyotyp, FISH) je uložena taktéž v lednici při 4–9 °C. Konkrétní specifika jsou uvedena ve standardních postupech pro dané vyšetření.

### **8.3.2 Skladování po vyšetření**

Materiál (DNA) zpracováváný v laboratoři molekulární genetiky je po vyšetření skladován v chladicím zařízení při teplotě  $\pm - 28^{\circ}\text{C}/\pm - 80^{\circ}\text{C}$  dle informovaného souhlasu. Plná krev pro izolaci DNA je skladována do vydání výsledků vyšetření. Plodová voda/CVS/BC a PER pro neinvazivní prenatal. testování je zpracována beze zbytku.

Periferní krev zpracováváná v cytogenetické laboratoři je po vyšetření skladována v lednici při teplotě 4–9 °C nejvýše 5 dní. Po vytvoření preparátu je krev přemístěna do sběrných nádob určených k likvidaci. Plodová voda/CVS je zpracována beze zbytku. Při vytvoření preparátů v cytogenetické laboratoři je nevyužitá buněčná suspenze uchována v eppendorfkách po dobu 1 roku a skladována v mrazicím zařízení při  $\pm - 18^{\circ}\text{C}$ .

### 8.3.3 Likvidace biologického materiálu po vyšetření laboratoří

Plná krev zpracovávaná v molekulárně genetické laboratoři je likvidována do sběrných nádob a likvidována jako potencionálně infekční materiál, plodová voda/CVS/BC a PER pro neinvazivní prenatal. testování je zpracována beze zbytku.

Plná krev a materiál buněčné suspenze je v cytogenetické laboratoři likvidován ve sběrných nádobách jako potencionálně infekční.

## 9 Vydávání výsledků a komunikace s laboratoří

### 9.1 Termíny dodání výsledků

Vzorky jsou průběžně zpracovávány dle požadovaného vyšetření v pořadí, ve kterém jsou přijímány do laboratoře. Vzorky označené STATIM jsou zpracovávány přednostně. Doba požadovaného vyšetření od přijetí vzorku do vydání výsledkového listu by při běžném provozu neměla přesáhnout časový interval 4 týdnů (vyjma vyšetření SP-MG-08, SP-MG-09, SP-MG-11 – ONKO geny).

#### 9.1.1 Úsek molekulární genetiky

SP-MG-01	Molekulárně genetické vyšetření mutací v genech metodou PCR-RFLP	2 týdny
SP-MG-02	Molekulárně genetické vyšetření mikroleceí v azoospermické oblasti chromozómu Y (AZFa, AZFb, AZFc) multiplex PCR	2 týdny
SP-MG-03	Molekulárně genetické vyšetření mutací v genech metodou reverzní hybridizace	3 týdny
SP-MG-04	Molekulárně genetické vyšetření aneuploidií chromozómů 13, 18, 21, X, Y pomocí STR markerů metodou QF PCR (Amnio PCR)	5 pracovních dnů
SP-MG-06	Molekulárně genetické vyšetření v genech metodou Real-Time PCR	2 týdny
SP-MG-08	Mutační analýza/screening genů metodou Sangerova sekvenování	
	BRCA1, BRCA2, ONKO, ONKO Plus: - prediktivní testování a STATIM	1 rok 3 měsíce
SP-MG-09	Mutační analýza genů metodou masivně paralelního sekvenování (platforma MiSeq, Illumina)	
	BRCA1, BRCA2, ONKO, ONKO Plus: - prediktivní testování a STATIM	1 rok 3 měsíce
SP-MG-10	Molekulárně genetické vyšetření syndromu fragilního X chromozómu (FRAXA) metodou PCR a TP-PCR	3 týdny STATIM 10 pracovních dnů
SP-MG-11	Vyšetření intragenových přestaveb metodou MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification)	
	BRCA1, BRCA2, ONKO, ONKO Plus:	1 rok

## Laboratorní příručka

Vydání: 20.

Změna: 0

Datum: 17.6.2019

	- prediktivní testování a STATIM	3 měsíce
	SMN1, SMN2:	3 týdny STATIM 10 pracovních dnů
SP-MG-12	Vyšetření přestaveb lidského genomu metodou Array CGH	3 týdny od nasazení čipu
SP-MG-13	Neinvasivní prenatální vyšetření (NIPT) metodou masivně paralelního sekvenování (Illumina)	3 týdny 2 týdny STATIM
SP-MG-14	Molekulárně genetické vyšetření HLA alel asociovaných k celiakii/lepkové intoleranci SSP-PCR	3 týdny

### 9.1.2 Úsek cytogenetický

SP-CG-01	Stanovení karyotypu z lidských buněk	4 týdny
SP-CG-02	Vyšetření biologického materiálu metodou FISH	5 pracovních dnů

## 9.2 Informace o formách vydávání výsledků

Laboratoř molekulární genetiky v CLG s.r.o. využívá jako způsob vydávání výsledků tisk výsledkových listů ke konkrétním vyšetřením ve formátu Microsoft Word.

Výsledky cytogenetických vyšetření jsou zaznamenávány do formuláře „Žádanka + výsledkový list“. Výsledky musí být uvedeny čitelně a bez přepisů. Před vydáním jsou výsledky kontrolovány a podepsány oprávněným pracovníkem a lékařem-genetikem.

Tištěné výsledky jsou vloženy do laboratorního informačního systému AMICUS, doplněny závěrečným doporučením lékaře-genetika, závěrečná zpráva je vytištěna a 1 vyhotovení s doporučením lékaře genetiky zůstává včetně výsledkového listu laboratoře v dokumentaci pacientky, 1 vyhotovení zprávy doplněné o klinickou interpretaci lékaře genetiky je zasíláno na vědomí pacientce a 1 vyhotovení zprávy je zasláno ošetřujícímu lékaři.

## 9.3 Stanovení varovných nebo kritických rozmezí

K jednotlivým výsledkům vyšetření jsou stanoveny referenční meze (v případě, že lze) a hlášení překročení daných mezí zváží pracovník vyhodnocující výsledek dle závažnosti nálezů.

Výsledkem vyšetření je slovní hodnocení – pozitivní/negativní hodnocení vzorku nebo vyjádření doporučeným názvoslovím mezinárodní nomenklatury ISCN, HGVS apod.

V případě patologických nálezů (pozitivních nálezů) je informován žadatel o vyšetření, který dále komunikuje s pacientem.

## 9.4 Změny výsledků a nálezů

Ke změně výsledků by nemělo docházet. Pokud by k němu došlo je zaznamenán datum a jméno osoby, která změnu dodatečně provedla.

V případě, že laboratoř zjistí chybně vydaný nález, komunikuje se žadatelem vždy vedoucí úseku. Žadateli o vyšetření (ošetřujícímu lékaři) je dodán nový výsledkový list se správnými výsledky.

## 9.5 Revize klasifikací nálezů a interpretací výsledků

Interpretace výsledků a nálezů je prováděna s ohledem na současné znalosti a vědomosti v cytogenetické, molekulárně cytogenetické a molekulárně genetické oblasti lékařské genetiky. Laboratoř si vyhrazuje právo provést revize klasifikací nálezů či interpretací výsledků v závislosti na pokroku ve výzkumu a s ohledem na nově získané a upřesňující znalosti v dané problematice. O změnách je informován žadatel o vyšetření (ošetřující lékař) formou revidovaného výsledkového listu.

## 9.6 Konzultační činnost laboratoře

Informace v souvislosti s výsledky vyšetření podávají lékaři CLG. Kontaktní údaje jsou uvedeny v kapitole č. 2.

## 9.7 Způsob řešení stížností

Případné stížnosti lékaře, pacienta či ostatních účastníků je podnětem pro zlepšení práce v laboratořích CLG a naše pracoviště každou uplatněnou stížnost prošetřuje. Stížnost lze podávat na:

- výsledky požadovaných laboratorních vyšetření;
- způsob jednání pracovníků CLG;
- nedodržení ujednání vyplývajících z uzavřené dohody o provedení vyšetření a nedodržení dohodnuté lhůty.

Stížnost je možné podat písemnou formou (poštou, faxem, e-mailem) či formou ústní (telefonicky, osobní jednání). Pokud stížnost není neprodleně řešena, termín jejího vyřízení je 30 pracovních dnů. Odpovědný pracovník zákazníkovi sdělí výsledek šetření telefonicky.

## 9.8 Obecné zásady laboratoře na ochranu osobních informací

Laboratoř se řídí pravidly a podmínkami Obecného nařízení o ochraně osobních údajů (GDPR). Laboratoř nakládá s osobními a citlivými údaji pacientů tak, aby nemohlo dojít k jejich neoprávněnému přístupu, změně neb zneužití. Obecné zásady pro ochranu osobních údajů:

### 1) Organizační opatření:

Osobní a citlivá data pacientů jsou vedena v listinné formě v příručních spisovných, v programu AMICUS a na serveru laboratoře.

Listinná forma záznamu je zabezpečena uzamčením vstupu do prostor laboratoří a řízením vstupu cizích osob. Pro zabezpečení dat v programu AMICUS mají pracovníci přidělena přístupová práva s ohledem na jejich kompetence. Pracovníci mají ve své pracovní náplni podepsanou mlčenlivost a jsou seznámeni prokazatelně s vnitřními předpisy CLG, ve kterých jsou stanoveny pravidla pro nakládání s osobními údaji.

### 2) Technická opatření:

Technická opatření jsou stanovena na úrovni mechanického zabránění přístupu neoprávněných osob do míst, kde je uložena zdravotnická dokumentace. Jedná se o řízený vstup do laboratoře.

Zdravotnická dokumentace uložená v programu AMICUS a na serveru je v době nepřítomnosti zdravotnického pracovníka chráněna heslem pro vstup do PC a systému AMICUS. Každý pracovník má přidělený rozsah oprávnění pro přístup do AMICUS.

## 10 Přílohy

Samostatné přílohy:

### Příloha č.1 – **Žádanky**

1.1	<i>Žádanka na molekulárně genetické vyšetření</i>
1.2	<i>Žádanka na vyšetření FISH – PCR</i>
1.3	<i>Žádanka na vyšetření karyotypu z PER</i>
1.4	<i>Žádanka na vyšetření karyotypu z plodové vody</i>
1.5	<i>Žádanka na vyšetření karyotypu z choriových klků</i>
1.6	<i>Žádanka na vyšetření ONKO</i>
1.7	<i>Žádanka na vyšetření ONKO Plus</i>

### Příloha č.2 – **Výsledkové listy**

### Příloha č.3 – **Informované souhlasy**

3.1	<i>Informovaný souhlas s vyšetřením DNA</i>
3.2	<i>Informovaný souhlas s vyšetřením plodové vody</i>
3.3	<i>Informovaný souhlas s vyšetřením choriových klků</i>
3.4	<i>Souhlas vyšetřované (zákonného zástupce) s neinvazivním prenatalním testem aneuploidii chromozómů 21, 18 a 13 (NIPT Clarigo test)</i>
3.5	<i>Informovaný souhlas k vyšetření ONKO</i>
3.6	<i>Informovaný souhlas k vyšetření ONKO Plus</i>



**Laboratorní příručka**

Vydání: 20.

Změna: 0

Datum: 17.6.2019

**Evidence změn**

Změna č.	Popis změny	Zpracoval	Platnost od