Laboratorní příručka

Pro uživatele služeb
Centrum lékařské genetiky - laboratoř,
odbornost: 816 – Laboratoř lékařské genetiky

Vypracovali: RNDr. Eva Macháčková, Ph.D.
Mgr. Jana Házová
Hana Pavlů

Kontrola manažerem kvality: RNDr. Eva Macháčková, Ph.D.

Schválil: MUDr. Klára Nováková, Ph.D.

Datum platnosti: **od 15.6.2026**

OBSAH

1. Úvodní informace
2. Definice a zkratky
3. Informace o laboratoři
    - 3.1 Identifikace pracoviště a důležité kontaktní údaje
        - 3.1.1 Identifikační údaje Masarykova onkologického ústavu
        - 3.1.2 Identifikační údaje oddělení
    - 3.2 Organizace, vnitřní začlenění a zaměření laboratoře
    - 3.3 Identifikační údaje laboratoře a personální zajištění odbornosti
    - 3.4 Úroveň a stav akreditace pracoviště
    - 3.5 Externí kontrola kvality
    - 3.6 Přehled všech nabízených laboratorních vyšetření
        - 3.6.1 Vyšetření indikována klinickým genetikem
        - 3.6.2 Vyšetření indikována klinickým lékařem
    - 3.7 Základní přehled metod používaných v laboratoři
    - 3.8 Časová dostupnost výsledků vyšetření
    - 3.9 Flexibilní rozsah akreditace
4. Příručka pro odběr primárních vzorků
    - 4.1 Základní informace
    - 4.2 Požadavky na vstupní dokumenty k biologickému materiálu
    - 4.3 Požadavky na urgentní vyšetření
    - 4.4 Ústní požadavky na vyšetření
    - 4.5 Požadovaný odběrový systém
    - 4.6 Příprava pacienta před odběrem
    - 4.7 Odběr venózní nesrážlivé krve a označení vzorku
    - 4.8 Požadavky na množství vstupního materiálu k vyšetření
    - 4.9 Požadavky na transport vzorků
    - 4.10 Kritéria pro přijetí vzorků k laboratornímu vyšetření
    - 4.11 Kritéria pro odmítnutí odběrového materiálu
5. Vydávání výsledků a komunikace s laboratoří
    - 5.1 Vydávání výsledků
    - 5.2 Hlášení výsledků v kritických intervalech
    - 5.3 Vydávání výsledků přímo pacientům
    - 5.4 Dodatečná vyšetření
    - 5.5 Změny výsledků a nálezů
6. Intervaly od dodání vzorku k vydání nálezu
7. Konzultační činnost laboratoře
8. Způsob řešení stížností
9. Vyšetřování smluvními laboratořemi
10. Základní informace k poskytovaným vyšetřením (nejčastější indikace)
    - 10.1 Analýza genů metodou masívního paralelního sekvenování
    - 10.2 Hereditární syndrom nádoru prsu a/nebo ovaria
    - 10.3 Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC, Lynchův syndrom):
    - 10.4 Hereditární polypózní syndromy trávicího traktu s vysokým rizikem malignizace
    - 10.5 Hereditární syndrom Li-Fraumeni
    - 10.6 Další vzácnější formy dědičné predispozice k nádorovému onemocnění

10.7 Farmakogenetické vyšetření
10.7.1 Varianty v genu DPYD
10.7.2 Gilbertův syndrom (promotor genu UGT1A1)
10.7.3 Trombofilní mutace
11. Přílohy (žádanka na vyšetření, informovaný souhlas vyšetřovaného)

1. Úvodní informace

Laboratorní příručku vydává Centrum lékařské genetiky (*do roku 2025 Oddělení epidemiologie a genetiky nádorů*) – laboratoř pro zlepšení komunikace s uživateli laboratorních služeb: pro klinické lékaře a zdravotnický personál. Informuje o nabídce vyšetření a poskytuje základní informace o požadavcích na primární vzorky, preanalytických a analytických procesech v laboratoři, vydávání výsledků a způsobu komunikace s laboratoří.

Obsah laboratorní příručky vychází z doporučení národních akreditačních standardů pro klinické laboratoře a je sestaven v souladu s mezinárodní normou ISO 15189 „Zdravotnické laboratoře – Požadavky na kvalitu a kompetenci“. Laboratorní příručka je k dispozici výhradně v elektronické podobě, volně dostupná na webových stránkách. Aktualizace laboratorní příručky se nejvíce dotýkají nabídky laboratorních vyšetření a inovace použitých laboratorních postupů vyšetření. Laboratorní příručka je průběžně aktualizována podle potřeb klinické a laboratorní praxe. Aktuální verze je dostupná na webových stránkách Masarykova onkologického ústavu www.mou.cz pod Centrum lékařské genetiky**.** Nové vydání laboratorní příručky je rozpoznatelné dle data vydání uvedeného v zápatí dokumentu.

2. Definice a zkratky

CLG	Centrum lékařské genetiky (název oddělení od 1.1.2026)
CNV analýza	„Copy Number Variation“ - v textu použito ve smyslu bioinformatické analýzy umožňující detekci rozsáhlých intragenových delecí/duplikací postihujících celé exony genů na základě změny v pokrytí analyzovaných oblastí
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EMQN	European Molecular Genetics Quality Network
EQA	externí kontrola kvality
HNPCC	Hereditární nepolypozní kolorektální karcinom (=Lynchův syndrom)
HRM	Vysokorozlišovací analýza křivek tání (High Resolution Melting)
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification: detekce rozsáhlých intragenových delecí/duplikací postihujících celé exony geny
MOÚ	Masarykův onkologický ústav
MPS ≈ NGS	masivní paralelní sekvenování ≈ sekvenování nové generace
NIS	Nemocniční Informační Systém
Odbornost 816	Laboratoř lékařské genetiky
OEGN	*Oddělení epidemiologie a genetiky nádorů (původní název oddělení do 12/2025)*
OLM	Oddělení laboratorní medicíny (pracoviště MOÚ)
PCR	Polymerázová cyklická reakce (amplifikace)
Žádanka	= požadavkový list

3. Informace o laboratoři

3.1 Identifikace pracoviště a důležité kontaktní údaje

Molekulárně genetická laboratoř spadá pod Centrum lékařské genetiky (*do roku 2025 pod názvem Oddělení epidemiologie a genetiky nádorů*), které je součástí Masarykova onkologického ústavu (dále jen MOÚ) v Brně. MOÚ je státní příspěvkovou organizací, jejímž zřizovatelem je Ministerstvo zdravotnictví ČR.

3.1.1 Identifikační údaje Masarykova onkologického ústavu

Název: Masarykův onkologický ústav
Adresa: Žlutý kopec 543/7, 656 53 Brno
IČO: 00209805
DIČ: CZ00209805
Telefon: +420543131111 (ústředna)
Fax: +420543131169
E-mail: direct@mou.cz

3.1.2 Identifikační údaje oddělení

Název: **Centrum lékařské genetiky** (dále jen CLG)
Adresa: Žlutý kopec 7, 656 53 Brno
Vedoucí oddělení: prim. MUDr. Klára Nováková, Ph.D.
Telefon: +420543136914
Fax: +420543136907

3.2 Organizace, vnitřní začlenění a zaměření laboratoře

Centrum lékařské genetiky (dále jen CLG) je diagnosticko-výzkumné pracoviště, které je vnitřně členěno na: **Ambulantní část** (zahrnuje genetickou ambulanci specializovanou na hereditární formy nádorových onemocnění a výzkumnou činnost v oblasti genetiky a epidemiologie nádorů) a **Laboratorní část** (provádějící molekulárně genetická vyšetření za diagnostickým i výzkumným účelem). Pracovníci CLG se podílí na realizaci výzkumných projektů.

a) **Genetická ambulance CLG** je v diagnostické oblasti zaměřená především na vyhledávání rizikových rodin se suspektní hereditární etiologií nádorových onemocnění, genetické poradenství u rodin s dědičným rizikem nádorového onemocnění a indikaci laboratorního vyšetření spadající do odbornosti lékařské genetiky. Vytváří plán preventivní péče o pacienty se zvýšeným rizikem vzniku nádorového onemocnění.

b) **CLG-laboratoř** (dále jen laboratoř) poskytuje v diagnostické oblasti vysoce specializovaná molekulárně-genetická vyšetření spadající do odbornosti 816 (laboratoř lékařské genetiky), zaměřená na analýzu nukleových kyselin a to především za účelem detekce mutací v genech způsobujících dědičnou predispozici ke vzniku nádorového onemocnění. Dále jsou prováděna farmakogenetická vyšetření, která zahrnují vyšetření populačně významných variant v genech ovlivňujících metabolizmus nebo působení léčiv. Farmakogenetické vyšetření umožní klinickým lékařům (onkologům) vybrat pro konkrétního pacienta vhodný lék, určit vhodnou dávku a minimalizovat riziko vzniku nežádoucích účinků u konkrétního pacienty. Cílem vyšetření je vývoj individualizovaných léčebných postupů a identifikace nejvhodnějšího typu a dávkování léčiv pro konkrétního pacienta.

3.3 Identifikační údaje laboratoře a personální zajištění odbornosti

Lékařský garant odbornosti 816 / primářka oddělení: **prim. MUDr. Klára Nováková, Ph.D.**

Zastupující lékařský garant odbornosti 816 **doc. MUDr. Lenka Foretová, Ph.D.**

Analytický garant odbornosti 816 / vedoucí laboratoře: **RNDr. Eva Macháčková, Ph.D.**

Zástupce analytického garanta odbornosti 816 a vedoucího laboratoře: **Mgr. Jana Házová**

Vedoucí laborantka: **Hana Pavlů**

Kontaktní telefon laboratoře: **+420543136713**

Provozní doba laboratoře / příjem vzorků:

Pracovní dny: **Po-Pá** **6:30-15:30**

3.4 Úroveň a stav akreditace pracoviště

Centrum lékařské genetiky je součástí Masarykova onkologického ústavu, který je poskytovatel zdravotních služeb akreditovaný Organizací evropských onkologických ústavů (OECI) a Českou společností pro akreditaci ve zdravotnictví.

CLG-laboratoř (dále jen laboratoř) je od roku 2011 držitelem osvědčení o akreditaci (*do roku 2025 pod názvem Oddělení epidemiologie a genetiky nádorů*), které vydal Český institut pro akreditaci, o.p.s. na základě posouzení splnění akreditačních požadavků podle ČSN EN ISO 15189 ed.3:2023. Laboratoř je akreditovaná jako **zdravotnická laboratoř č. 8127** pro vyšetření v odbornosti molekulární genetiky (odbornost 816).

M 8127	Centrum lékařské genetiky – laboratoř Zdravotnická laboratoř č. 8127 akreditovaná ČIA dle normy ČSN EN ISO 15189 ed.3:2023

Aktuální osvědčení je zveřejněno na webových stránkách Masarykova onkologického ústavu www.mou.cz pod oddělením Centrum lékařské genetiky**.**

Aktuální rozsah akreditace stanoví **Osvědčení o akreditaci č. 13/2026 ze dne: 8.1.2026**

Laboratoř uplatňuje flexibilní přístup k rozsahu akreditace.

Aktuální „Seznam činností v rámci flexibilního rozsahu“ je dostupný na webových stránkách https://www.mou.cz/centrum-lekarske-genetiky/t1366

3.5 Externí kontrola kvality

Laboratoř se zúčastňuje externího hodnocení kvality (EQA) organizovaného v rámci European Molecular Genetics Quality Network (EMQN; www.emqn.org) a to v programech, které nejvíce pokrývají zaměření laboratoře:

- **OVARIAN, BREAST, PROSTATE and PANCREATIC CANCERS (v Germline) [PARPi] -** vyšetření panelu HDR genů (geny homologní rekombinace a reparace dsDNA zlomů dle doporučení NCCN) významných pro nádorovou predispozici: *ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CDKN2A, CHEK2, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, EPCAM, NBN, NF1, PALB2, PTEN, RAD51C, RAD51D, STK11, TP53*
- **Lynch syndrome (hereditary non-polyposis colon cancer, HNPCC)** - vyšetření genů MMR reparace: MLH1, MSH2, MSH6, PMS2
- **Polyposis Syndromes (FAP, MAP) -** vyšetření genů APC a MUTYH
- **DNA-SEQ EQA schéma** (Sangerovo sekvenování).
- **NextGen DNA sequencing (vGermline):** masivní paralelní sekvenování
- **DPYD/UGT1A1 (farmacogenetics)**
- Případně jiné schéma dědičné predispozice k onkologickému onemocnění – dle aktuální nabídky

Aktuální výsledky EQA jsou vyvěšeny na webových stránkách laboratoře

3.6 Přehled nabízených laboratorních vyšetření

Laboratoř nabízí molekulárně genetická vyšetření nukleových kyselin, a to především za účelem **detekce mutací u genů způsobujících dědičnou predispozici ke vzniku nádorového onemocnění.**

3.6.1 Vyšetření indikována klinickým genetikem: po provedení genetického poradenství a podepsání informovaného souhlasu, **za předpokladu splnění indikačních kritérií**. Podrobný popis indikačních kritérií a doporučení následné péče o osoby s vysokým rizikem dědičných forem nádorového onemocnění je uveden v Supplementech Klinické onkologie dostupných ke stažení online na: https://www.linkos.cz/casopis-klinicka-onkologie:

- Klin Onkol 2009; 22(Suppl 1): 5. Téma: Dispenzarizace dědičných nádorových syndromů
- Klin Onkol 2012; 25(Suppl 1): 6. Téma: Hereditární nádorová onemocnění III

- Klin Onkol 2016; 29(Suppl 1): 3. Téma: Hereditární nádorová onemocnění IV.
- Klin Onkol 2019; 32(Suppl 2): Téma: Hereditární nádorová onemocnění V.
- Kniha: **Hereditární nádorová onemocnění v klinické praxi**. Foretová L,, Gaillyová R., Macháčková E. a kolektiv; Rok vydání 2022; Nakladatelství Grada; ISBN: 978-80-271-1293-7

3.6.1.1 Vyšetření neznámé mutace metodou masivního paralelního sekvenování za účelem odhalení příčiny dědičné predispozice u vysoce rizikových jedinců s podezřením na:

- ✓ **Dědičný syndrom nádoru prsu – HBC** (geny vysokého rizika: BRCA1, BRCA2, TP53, CDH1, PALB2, PTEN, STK11; jiné geny zvyšující riziko: ATM, BARD1, CHEK2, NBN)
- ✓ **Dědičný syndrom nádoru ovária – HOC** (geny vysokého rizika: BRCA1, BRCA2, BRIP1, RAD51C, MLH1, MSH2, MSH6; STK11; jiné geny zvyšující riziko: RAD51D, PALB2)
- ✓ **Dědičný syndrom nádoru prsu a ovária – HBOC** (rizikové geny pro HBC+HOC)
- ✓ **Dědičný syndrom nepolypózního kolorektálního karcinomu HNPCC** – **Lynchův syndrom** (geny vysokého rizika: MLH1, MSH2, MSH6; jiné geny zvyšující riziko: PMS2, EPCAM, CHEK2, EXO1, POLE POLD1, MLH3, APC, MUTYH, STK11, BMPR1A, SMAD4)
- ✓ **Familiární adenomatózní polypóza FAP** (geny vysokého rizika: APC – autozomálně dominantní forma; MUTYH - autozomálně recesivní forma)
- ✓ **Juvenilní a hamartomatózní polypózní syndromy** (geny vysokého rizika: PTEN, STK11, SMAD4, BMPR1A)
- ✓ **Dědičná predispozice k nádoru žaludku** (geny vysokého rizika: CDH1 – difúzní forma, ostatní rizikové geny: MLH1, MSH2, MSH6, APC, STK11, BMPR1A, SMAD4)
- ✓ **Li-Fraumeni syndrom LFS** (geny vysokého rizika: TP53; jiné geny zvyšující riziko: CHEK2, CDKN2A)
- ✓ **Dědičná forma maligního melanomu** (rizikové geny: CDKN2A, BRCA2, CDK4)
- ✓ **Dědičné nádory pankreatu** (rizikové geny: BRCA2, PALB2, CDKN2A, APC, STK11)
- ✓ **Dědičná forma nádorů ledvin** (rizikové geny: MET, FH, FLCN, SDH geny)
- ✓ **Von Hippel Lindau syndrom**: výskyt hemangioblastomu, feochromocytomu a pankreatických cyst s vysokým rizikem malignizace (rizikové geny: VHL)
- ✓ **Neurofibromatóza** (rizikové geny: NF1, NF2)
- ✓ **Tuberózní skleróza** (rizikové geny: TSC1, TSC2)
- ✓ **Dědičná forma maligního mezoteliomu a uveálního melanomu** (rizikové geny: BAP1)
- ✓ **Dědičná forma meduloblastomu** (rizikové geny: SUFU)
- ✓ **Dědičná forma rhabdoidních nádorů** (rizikové geny: SMARCB1, SMARCA4)
- ✓ **Dědičná forma paragangliomu a pheochromocytomu** (TMEM127, SDH geny)
- ✓ **Mnohočetná endokrinní neoplazie II.** – MEN2 (rizikové geny: RET)
- ✓ **Mnohočetná endokrinní neoplazie I. –** MEN1 (rizikové geny: MEN1, CDKN1B)
- ✓ **Retinoblastom** (gen RB1)
- ✓ **Wilmsův tumor –** nefroblastom (gen WT1)
- ✓ **Familiární cylindromatóza (turban tumor sy.) a mnohočetné trichoepitheliomy** (gen CYLD)
- ✓ **Nádory Sertoli–Leydigových buněk** – testikulární nádory a nádory vaječníků u mladých dospělých (gen DICER1)
- ✓ **Silver-Russell syndrom** (gen GRB7)
- ✓ **Familiární forma gastrointestinálního stromálního nádoru** – familiární GIST (gen KIT)
- ✓ **Carneyho komplex** – mnohočetné neoplázie (gen PRKAR1A)
- ✓ **Recesivní syndromy dětského věku spojené s vysokým rizikem nádorovým onemocněním:**
  - Ataxia Telangiectasia (geny ATM, MRE11A)
  - Fanconiho anemie (FANC geny, SLX4)
  - Xeroderma pigmentosum (XP ≈ ERCC geny)
  - Nijmegen breakage syndrom (gen NBN/NBS1, MRE11, RAD50)
  - Syndromy defektních helikáz s těžkým vývojovým postižením: Bloom sy., Werner sy., Rothmund-Thomson sy., Baller-Gerold sy., Rapadilino sy. (geny BLM, WRN, RECQL, RECQL5, RECQL4)

3.6.1.2. Vyšetření známé (familiární) mutace metodou HRM, LR-PCR, Sangerova sekvenování nebo MLPA (dle typu mutace):

PREDIKTIVNÍ VYŠETŘENÍ:

- ✓ Vyšetření známé rizikové mutace v genech APC, ATM, BAP1, BARD1, BLM, BMPR1A, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CDK4, CDKN2A, CHEK2, CYLD, DICER1, EPCAM, ERCC2, ERCC3, EXO1, FANCA, FANCB, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCI, FANCL, FANCM, FH, FLCN, GRB7, KIT, MCPH1, MEN1, MET, MLH1, MLH3, MRE11A, MSH2, MSH6, MUTYH, NBN, NF1, NF2, PALB2, PMS2, POLD1, POLE, PRKAR1A, PTCH1, PTEN, RAD50, RAD51, RAD51C, RAD51D, RB1, RECQL, RECQL4, RET, SBDS, SDHAF2, SDHB, SDHC, SDHD, SLX4, SMAD4, SMARCA4, SMARCB1, STK11, SUFU, TMEM127, TP53, TSC1, TSC2, VHL, WRN, WT1
- ✓ Vyšetření známých rizikových mutací v jiných genech (dle seznamu genů zahrnutých na NGS panelu) u familiární mutace detekované a potvrzované Sangerovým sekvenováním nebo MLPA na našem pracovišti.

CÍLENÉ VYŠETŘENÍ

- ✓ Masívní polypóza žaludku (GAPPS syndrom) – přímé sekvenování promotoru 1B genu APC
- ✓ Doplňující vyšetření u recesivní formy adenomatózní polypózy FAP bez nálezu mutace v genu MUTYH a APC – vyšetření na přítomnost evropské mutace v genu NTHL1: p.Q90*

3.6.2 Vyšetření indikována klinickým lékařem, za předpokladu splnění klinických příznaků, biochemických hodnot nebo vyšetření předcházející indikaci specifických léčiv (**farmakogenetika**):

- ✓ **Varianty v genu DPYD** zodpovědné za sníženou aktivitou Dihydropyrimidine dehydrogenázy ovlivňující metabolismus Fluoropyrimidinových léčiv. Vyšetření 4 frekvenčně nejčetnějších rizikových variant v populaci:
  - **a)** **haplotyp HAPB3**: riziková varianta v intronu DPYD NM_000110.3:c.1129-5923C>G způsobující kryptický sestřih (je ve vazbě se silent variantou c.1236G>A) - NFE:2.1023%, dbSNP: rs75017182
  - **b)** **DPYD** NM_000110.3:**c.1679T>G p.Ile560Ser (alela DPYD*13)**, NFE:0.062% dbSNP: rs55886062
  - **c)** **DPYD** NM_000110.3:**c.1905+1G>A (alela DPYD*2A**), sestřihová varianta, NFE: 0.57% dbSNP: rs3918290
  - **d)** **DPYD** NM_000110.3:**c.2846A>T p.Asp949Val**, NFE:0.52 dbSNP: rs67376798

- ✓ **Gilbertův syndrom** alela ***UGT1A1 alela *28/*28:*** (TA)7/(TA)7 (stanovení počtu TA repetice v promotoru UGT1A1 genu) – snižující hladinu exprese UDP-glucuronosyltransferázy, za předpokladu příznaků nekonjugované hyperbilirubinemie, většinou do 80 μmol/l, bez známek jaterního onemocnění

- ✓ **Trombofilní mutace** (vyšetření predispozičních variant – genů *F5* a *F2*, které ovlivňují složení a funkci koagulačních bílkovin (faktoru V a faktoru II), jež se významně podílí na procesu srážení krve:
  - **a)** **Leidenská mutace (FV Leiden)** genu pro koagulační faktor V – riziková varianta v genu *F5* označována jako 1691G>A vedoucí k záměně aminokyseliny argininu za glutamin: p.Arg506Gln (tradiční popis varianty). Dle aktuální systematické nomenklatury se jedná o missense variantu NM_000130.4:c.1601G>A p.Arg534Gln (**rs6025**)
  - **b)** Mutace genu pro koagulační faktor II (**F II protrombin**) – riziková varianta v genu *F2* označována jako **G20210A** (tradiční popis). Systematicky se jedná o variantu v nekódující 3´UTR oblasti NM_000506.4:c.*97G>A (**rs1799963**)

3.7 Základní přehled metod používaných v laboratoři

- ➢ Izolace nukleových kyselin (DNA) pomocí izolačních kitů QIAamp DNA Blood Maxi Kit (QIAGEN), užívaných pro izolace z 5-8ml periferní krve
- ➢ Izolace nukleových kyselin pomocí komerčních izolačních kitů na principu magnetických kuliček s užitím přístroje MagCore II (RBC Bioscience), pro izolace z 200-400μl periferní krve
- ➢ Izolace nukleových kyselin na principu centrifugace pomocí izolačních kitů QIAamp Mini QIAcube Kitů s užitím přístroje QIAcube (QIAGEN)
- ➢ PCR – polymerázová cyklická amplifikace vyšetřovaných oblastí DNA
- ➢ Vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM - High Resolution Melting) s využitím LCGreen+ na LightScanner (Idaho Tech.) – pro vyhledávání bodových mutací v heterozygotním stavu

- Sekvenování na SeqStudio Flex Genetic analyser (Applied Biosystems) – pro přesnou charakterizaci a potvrzení detekované mutace
- MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) s provedením fragmentační analýzy na SeqStudio Flex Genetic analyser (Applied Biosystems) - pro detekci velkých genomických delecí/duplikací zahrnujících celé exony analyzovaných genů
- digitálníMLPA (Digital Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) s kvantifikací amplikonů pomocí MiSeq (Illumina) platformy - pro detekci velkých genomických delecí/duplikací zahrnujících celé exony několika desítek genů zařazených v panelu vyšetření (D001 Hereditary cancer panel)
- PCR analýza dlouhých úseků (úseky v rozsahu 3-20 Kb genomické DNA) s využitím Expand Long Template PCR System (ROCHE)
- Real-time PCR (LihtCycler 96, Roche) s využitím komerčních diagnostických IVD kitů s fluorescenčně značenými sondami pro genotypizaci (SNP) konkrétních variant a genů
- Masívní paralelní sekvenování (NGS): KAPA HyperCap Target Enrichment: Principem postupu je ultrazvuková fragmentace genomické DNA > indexování a pool knihovny > enrichment/hybridizační postup (KAPA HyperCap protokol). Sekvenační běh připravené knihovny (s MiSeq Reagent kit v3) na MiSeq systému (Illumina).
- V rámci výzkumného projektu je prováděna analýza mRNA metodou RNAseq s Kapa RNA Hyper Prep kitem (Roche) a navazujícím enrichment/hybridizačním postupem (KAPA HyperCap protokol). Sekvenační běh připravené RNAseq knihovny (s MiSeq Reagent kit v3) na MiSeq systému (Illumina).
- Bioinformatická analýza pomocí FinalistDX (integrovaný výkonný výpočetní systém od firmy Institute of Applied Biotechnologies a.s.) s operačním systémem Linux (Ubuntu) umožňující bioinformatické zpracování FASTQ souborů zahrnující kontrolu kvality, zarovnání k referenčnímu genomu, analýzu pokrytí, anotaci variant, generování bam., bai., VCF souborů; včetně detailních souhrnných reportů všech detekovaných variant. FinalistDX zároveň umožňuje provedení CNV analýzy u homogenně pokrytých panelů.
- Bioinformatická analýza pomocí Software Genovesa, která umožňuje analýzu sekvenačních dat (FASTQ, BAM, VCF, CNV), kontrolu kvality dat, propojení s anotačními databázemi, filtrace i zálohování dat.

3.8. Časová dostupnost výsledku vyšetření

Laboratoř provádí indikovaná vyšetření v režimu „**rutinního provozu**“. Tj. jednotlivé vzorky jsou zařazovány do vyšetřovacího cyklu dle druhu vyšetření a data příjmu vzorku do laboratoře. Čekací doba na vyšetření je dána množstvím přijatých vzorků na konkrétní vyšetření v čase – podrobně viz. sekce 6.

V odůvodněných případech lze požadovat **přednostní (urgentní) vyšetření**: podrobně viz. 4.3.

3.9. Flexibilní rozsah akreditace

Flexibilní rozsah akreditace se vztahuje na akreditované činnosti, u nichž je povoleno zařazovat dodatečné činnosti nebo modifikovat postupy vyšetření na základě vlastního schválení při zachování principu akreditovaného vyšetření.

Laboratoř uplatňuje flexibilní přístup k rozsahu akreditace.

Aktuální „Seznam činností v rámci flexibilního rozsahu“ je dostupný na webových stránkách https://www.mou.cz/centrum-lekarske-genetiky/t1366

4. Příručka pro odběr primárních vzorků

4.1 Základní informace

Laboratoř provádí vyšetření spadající do odbornosti 816 – laboratoř lékařské genetiky.

Základní přehled nabízených vyšetření – viz sekce 3.5; podrobnější informace k nejčastějším diagnózám viz. sekce 10.

Podrobný popis indikačních kritérií a doporučení následné péče o osoby s vysokým rizikem dědičných forem nádorového onemocnění je uveden v **Supplementech Klinické onkologie** dostupných ke stažení online na: https://www.linkos.cz/casopis-klinicka-onkologie:

- Klin Onkol 2009; 22(Suppl 1): 5. Téma: Dispenzarizace dědičných nádorových syndromů
- Klin Onkol 2012; 25(Suppl 1): 6. Téma: Hereditární nádorová onemocnění III
- Klin Onkol 2016; 29(Suppl 1): 3. Téma: Hereditární nádorová onemocnění IV.
- Klin Onkol 2019; 32(Suppl 2): Téma: Hereditární nádorová onemocnění V.
- Kniha: **Hereditární nádorová onemocnění v klinické praxi**. Foretová L,, Gaillyová R., Macháčková E. a kolektiv; Rok vydání 2022; Nakladatelství Grada; ISBN: 978-80-271-1293-7

Základní informace jsou dostupné také na www.mou.cz >> Centrum lékařské genetiky

Žádanka (požadavkový list) na laboratorní vyšetření indikovaná klinickým genetikem (genetická poradna)– viz. **Příloha 1**

Informovaný souhlas pacienta s genetickým vyšetřením (genetická poradna) – viz. **Příloha 2**

Tištěné informační brožury pro pacienty genetické poradny jsou dostupné v genetické ambulanci.

Farmakogenetické vyšetření: vyšetření indikováno klinickým lékařem (onkologem nebo ambulantním lékařem jiné specializace, který indikuje léčbu pacienta) bez genetické poradny:

Objednávka (požadavek) na vyšetření u lékařů MOÚ je provedena zadáním vyšetření elektronicky v NIS. Do laboratoře je nutné dodat podepsaný Informovaný souhlas pacienta s farmakogenetickým vyšetření – viz. **Příloha 3**

V případě externího požadavku na farmakogenetické vyšetření musí být kromě IS pacienta do laboratoře doručena také žádanka na farmakogenetické vyšetření – viz. **Příloha 4**

Žádanky a informované souhlasy k vyšetření jsou dostupné na webových stránkách https://www.mou.cz/centrum-lekarske-genetiky/t1366

Příloha 1 Žádanka pro genetické vyšetření (indikace klinický genetik)
Příloha 2 Informovaný souhlas s genetickým vyšetřením (indikace klinický genetik)
Příloha 3 Informovaný souhlas – farmakogenetika (indikace klinický lékař)
Příloha 4 Žádanka na vyšetření – farmakogenetika (indikace externí klinický lékař)

4.2 Požadavky na vstupní dokumenty k biologickému materiálu

Žádanka na molekulárně genetické vyšetření dopravená se vzorkem musí obsahovat následující údaje:

Identifikační údaje pacienta

- Jméno, číslo pojištěnce (osobní zdravotní číslo) a zdravotní pojišťovnu pacienta
- Pohlaví pacienta v případě, že není dle jména jednoznačně rozpoznatelné (cizí jména)
- Bydliště (kontakt na pacienta)

Identifikační údaje pracoviště / lékaře požadujícího vyšetření

- Jméno, odbornost (IČP) a podpis lékaře indikujícího vyšetření
- Razítko s adresou pracoviště pro zaslání zprávy a kontaktní telefon

Specifikace požadovaného vyšetření

- Diagnózu a klinickou indikaci k vyšetření (podrobná rodinná anamnéza ve vztahu k indikačním kritériím - nádorová onemocnění, nejlépe zakreslený rodokmen);
- požadavek na vyšetřovaný gen/y (uvedení konkrétní mutace – je-li známa)
- Datum indikace vyšetření

Záznam o typu primárního vzorku a odběru

- Druh biologického materiálu (krev, DNA; ve specifických případech bukální stěr, parafinový blok – s patologickou specifikací nádorová / nenádorová tkáň)
- Datum a čas odběru materiálu (pouze v případě odběru krve)

Jiné záznamy nezbytné k upřesnění rozsahu vyšetření nebo interpretaci nálezu:

- V případě, že se jedná o pacienta, který v minulosti absolvoval transplantaci kostní dřeně, je třeba tuto skutečnost uvést na doprovodnou žádanku.

- Příbuzenský vztah k probandovi, číslo rodiny, identifikační údaje o probandu nebo konkrétní mutace s uvedením nomenklatury a referenční sekvence apod. v případě požadavku na prediktivní vyšetření v rodině s identifikovanou kauzální mutací

Vzhledem k privátnosti genetického vyšetření je požadován také podepsaný informovaný souhlas pacienta s genetickým vyšetřením; případně prohlášení klinického genetika o existenci podepsaného informovaného souhlasu pacienta v jeho evidenci.

V případě, že si pacient nepřeje uložení DNA po ukončení vyšetření, je tuto skutečnost nutné uvést na žádanku k laboratornímu vyšetření. V tomto případě bude DNA po ukončení vyšetření v časovém horizontu cca 2 měsíců zlikvidována a nelze v budoucnu indikovat doplňující vyšetření bez nového odběru.

4.3 Požadavky na urgentní vyšetření

V odůvodněných případech lze požadovat tzv. **přednostní vyšetření**. Přednostní vyšetření indikuje klinický genetik při riziku časového prodlení ve specifických situacích (např. plánované profylaktické operace, plán léčby PARP inhibitory u BRCA pozitivních pacientek) tak, že uvede požadavek na přednostní (urgentní) vyšetření se stručným odůvodněním **na žádanku** – v případě žádanky MOU do prostoru „Další poznámky“. Je vhodné uvést požadovaný termín pro dodání výsledku.

Požadavek na urgentní vyšetření lze doplnit také v průběhu vyšetřování telefonicky na základě žádosti indikujícího nebo ošetřujícího lékaře (onkologa, genetika, atd.) a to **v návaznosti na léčbu pacienta**.

4.4 Ústní požadavky na vyšetření

Ústní požadavky na vyšetření nejsou akceptovány. Do laboratoře je přijímán pouze řádně označený materiál (2 identifikační údaje – jméno a rodné číslo) s řádně vyplněnou doprovodnou žádankou. Není-li z rodného čísla zřejmé datum narození, je požadována informace o datu narození vyšetřovaného.

Ústně lze pouze doplnit nebo upřesnit požadovaná vyšetření u indikujícího lékaře – doplnění je v tomto případě zapsáno na žádanku pracovníkem laboratoře s datem a podpisem.

4.5 Požadovaný odběrový systém

K odběru periferní krve je v MOÚ standardně používán uzavřený odběrový systém Sarstedt Monovette® s **K3EDTA**. Ihned po odběru je nezbytné zkumavku několikrát promíchat – obrácením.

Při odběru na externích pracovištích lze provést odběr i do jiných komerčních odběrových souprav s **K3EDTA**. Ihned po odběru je nezbytné zkumavku několikrát promíchat – obrácením.

Ve speciálních případech (např. stav po transplantaci kostní dřeně) lze po dohodě s pracovníky laboratoře použít odběrovou sadu určenou pro bukální stěr (např. *FLOQSwabs* odběrová sada nebo alternativní komerční produkt). Pro pacienty MOÚ je tato odběrová sada k dispozici u lékaře genetické poradny MOÚ (vyžádání z laboratoře) včetně návodu pro správný odběr bukálního stěru – viz **Příloha 5**.

4.6 Příprava pacienta před odběrem

Odběr žilní krve pro molekulárně biologická vyšetření nespadá pod činnost laboratoře.

Genetické vyšetření nevyžaduje speciální přípravu pacienta. Odběry krve není potřeba provádět nalačno, jídlo, pití ani podávání léků nemá vliv na výsledky laboratorního vyšetření.

V případě bukálního stěru nejméně 60 minut před odběrem nejíst, nepít (mimo neslazené, nesycené nápoje), nežvýkat ani neprovádět ústní hygienu. Podrobný návod pro správný odběr bukálního stěru je k dispozici u lékaře genetické poradny MOÚ nebo v laboratoři.

V případě, že se jedná o pacienta, který v minulosti absolvoval transplantaci kostní dřeně, je třeba tuto skutečnost uvést na doprovodnou žádanku.

Před vlastním odběrem je nezbytné ověřit totožnost pacienta (dotazem na jméno a datum narození) a překontrolovat identifikační údaje.

4.7 Odběr a označení vzorku

4.7.1 Odběr venózní nesrážlivé krve

V rámci MOÚ se odběr krve provádí na odběrových místech ambulantně, případně je zajištěn na lůžkovém oddělení MOÚ. Do spuštěné modulu pro genetiku v novém informačním systému SONIS, musí být požadavky na odběry vzorku v MOÚ vyplněny formou papírové žádanky – viz. **Příloha 6 a 7**. Dle požadavku indikujícího lékaře je vytištěn primární štítek obsahující typ odběrové soupravy, jméno, rodné číslo a identifikační kód pacienta. Odběr krve se provádí standardním způsobem do předem označených zkumavek. Odebírající pracovník MOÚ provede záznam o odběru do NIS. Biologický materiál odebraný v MOÚ je přes centrální příjem na OLM dodán do laboratoře.

Podrobné informace o požadovaných postupech při odběru venózní krve v MOÚ obsahuje laboratorní příručka Oddělení laboratorní medicíny.

Při odběru vzorku na externím pracovišti je nezbytné označit zkumavky alespoň 2 identifikačními symboly (jméno + rodné číslo) a datem odběru (případně lze uvést datum a čas odběru na žádanku). Pracoviště, na kterém je vzorek odebrán, musí také zaznamenávat informace o totožnosti osoby, která primární vzorek odebrala. Totožnost osoby odebírající primární vzorek musí být dohledatelná při kontrole externími orgány.

Odběr krve může být proveden pouze ve zdravotnickém pracovišti a to odborně způsobilým personálem a se souhlasem pacienta.

Sami pacienti si vzorky pro vyšetření neodebírají.

Materiály použité při odběru se likvidují podle platných předpisů jako infekční biologický materiál. Obecné zásady strategie bezpečnosti práce s biologickým materiálem jsou obsaženy ve Vyhlášce Ministerstva zdravotnictví, kterou se upravují podmínky předcházení vzniku a šíření infekčních onemocnění a hygienické požadavky na provoz zdravotnických zařízení.

4.7.2 Odběr stěru z bukální sliznice

Pro úspěšné provedení genetické analýzy je nezbytné provedení důkladného stěru kartáčkem ze sliznice dutiny ústní a to tak, aby pro analýzu bylo získáno dostatečné množství materiálu k izolaci DNA (buněk).

Nejméně 60 minut před odběrem nejíst a nepít nic mimo neslazené nesycené vody, nežvýkat ani neprovádět ústní hygienu.

Před manipulací se stěrovou sadou si pacient důkladně umyje ruce (po důkladném vysvětlení postupu, může odběr provést pacient sám za asistence pracovníka genetické poradny nebo laboratoře). Pokud provádí odběr pracovník genetické poradny (laboratoře), pracuje pouze v jednorázových rukavicích.

Vyjmout stěrovou tyčinku ze zkumavky pouze za koncovou, nesterilní část. Během celého procesu odebírání vzorku je nutné dbát na to, aby sterilní část odběrové sady (celá tyčinka zakončená kartáčkem) nepřišla za žádných okolností do styku se žádným jiným materiálem než s buňkami bukální sliznice osoby, u které má být provedeno požadované vyšetření!!!

Stěrovou tyčinku vložit do úst a důkladně otírat bukální sliznici dutiny ústní (tzn. vnitřní strany tváří) pohybem dopředu a dozadu (jako při čištění zubů) a zároveň tyčinkou otáčet tak, aby byla plně využita celá plocha koncového kartáčku.

Pro úspěšný odběr je vhodné vyvíjet stěrovou tyčinkou přiměřený tlak na povrch sliznice a otírat sliznice obou tváří přibližně po dobu 1 minuty.

Po odběru vložit stěrovou tyčinku s odběrem do původního obalu (zkumavky) a uzavřít těsně víčkem.

Zkumavka musí být řádně označena alespoň 2 identifikačními symboly (jméno + rodné číslo nebo datum narození). Označené zkumavky vložit do uzavíratelného sáčku. Před transportem do laboratoře uchovávat zkumavku s odebraným materiálem při pokojové teplotě (nechladit, nemrazit).

Na doprovodnou žádanku k vyšetření zaznamenat datum a čas odběru a jméno osoby (pokud se liší od idikujícího lékaře), která odběr provedla (nebo u odběru bukálního stěru asistovala pacientovi). Totožnost osoby odebírající primární vzorek musí být dohledatelná při kontrole externími orgány.

Odebrané vzorky společně s požadovanou vyplněnou dokumentací (žádanka / informovaný souhlas) vložit do obálky a v nejbližším možném termínu doručit do laboratoře (nejpozději do 2 dnů od odběru).

Příloha 5 Bukální stěr – návod na odběr

4.8 Požadavky na množství vstupního materiálu k vyšetření

Standardně zpracovávaným materiálem je krev odebraná z periferní žíly do sterilní odběrové zkumavky s K3EDTA jako protisrážlivým agens. Důležité je zkumavku s krví po odběru několikrát jemně promíchat překlápěním!!!

Od pacientů indikovaných k vyšetření v MOÚ jsou standardně odebírány:

- pro kompletní vyšetření rizikových genů s požadavkem na odhalení příčiny genetické predispozice k nádorovému onemocnění: indikace **PROBAND**: 1 zkumavka s 7-9 ml krve (značení B růžová 9) a 1 zkumavka s 2-3 ml krve (značení B růžová 4) v odběrových soupravách s K3EDTA
- pro vyšetření konkrétní mutace indikace **PREDIKTIVNÍ**: 2 zkumavky po 2-3 ml krve v odběrových soupravách s K3EDTA (2x značení B růžová 4)

Pro vyšetření metodou masivního paralelního sekvenování požadujeme:

- 2 nezávisle izolované vzorky DNA pocházející ze 2 odběrů krve: 1 zkumavka s přibližně 20 µg DNA (koncentrace DNA minimálně 80 ng/µl) + další zkumavka s 0,5-1 µg DNA z jiného odběru (koncentrace DNA minimálně 20 ng/µl) pro ověření nálezu

nebo

- 1 zkumavka s 7-9 ml nesrážlivé krve v EDTA + 1 samostatná zkumavka s 2-3 ml krve v EDTA (pro potvrzení nálezu)

Na prediktivní vyšetření konkrétních familiárních mutací (variant) u příbuzného nebo na cílené vyšetření požadujeme:

- 2 nezávisle izolované vzorky DNA pocházející ze 2 odběrů krve: tj. 2 zkumavky s 0,5-2 µg DNA

nebo

- 2 zkumavky po 2-3 ml krve v EDTA (nejlépe komerční odběrové soupravy s K3EDTA)

U indikace farmakogenetického vyšetření (DPYD, Gilbertův syndrom, trombofilní mutace) je dostatečný:

- 1 vzorek DNA s 0,5-2 µg DNA

nebo

- 1 zkumavka s 2-3 ml (od malých dětí je dostatečný cca 1 ml) krve v EDTA (nejlépe komerční odběrové soupravy s K3EDTA)

4.9 Požadavky na transport vzorků

Biologický materiál odebraný v MOÚ je přes centrální příjem na OLM dodán do laboratoře v den odběru, nejlépe do 3 hodin po odběru, kdy lze nesrážlivou krev ponechat při běžné pokojové teplotě (mimo přímé sluneční záření nebo jiný zdroj tepla). Odběr bukálního stěru přijímají přímo pracovníci laboratoře.

Ve výjimečných případech (např. odběr na oddělení mimo pracovní dobu laboratoře) lze odebranou nesrážlivou krev uchovat max. do 72 hodin v lednici při cca +2 až +8°C (není požadavek na přesné rozmezí teplot) nebo nejpozději po 72 hodinách od příjmu zamrazit (při teplotě pod -15°C) – zajistí služba OLM.

Odesílání vzorků nesrážlivé krve z externích pracovišť

- odebranou krev lze uchovávat do transportu při pokojové teplotě (není požadavek na rozmezí teplot), je-li transport zajištěn po déle než 3 hodinách od odběru pak v lednici (není požadavek na rozmezí teplot)
- vzorky musí být dopraveny do laboratoře nejlépe do druhého dne po odběru, nejpozději do 72 hodin po odběru. Vzorky nemrazit ani nepřehřívat např. nevystavovat slunečnímu záření (není požadavek na rozmezí teplot).
- v případě, že nelze zajistit transport vzorku krve do 2 dnů po odběru krve, lze vzorky zamrazit na teplotu pod –15°C, ale musí pak být zajištěn transport vzorku v zamraženém stavu tak, aby vzorky nebyly během transportu a do příjmu vzorku laboratoří rozmraženy (např. dostatečné množství suchého ledu).
- Vzorky musí být zajištěny (zabaleny) takovým způsobem, aby nemohlo dojít k porušení obalu, rozlití nebo jinému poškození vzorku a ohrožení osob podílejících se na transportu.

Odesílání vzorků stěru z bukální sliznice z externích pracovišť (pouze po dohodě s laboratoří)

- Odebraný materiál uchovávat do transportu a během transportu při běžné teplotě (nechladit, nemrazit, nezahřívat).
- Zajistit transport vzorku do laboratoře co nejdříve (pouze pracovní dny), do druhého dne po odběru nejpozději však do 48 hodin.

Odesílání vzorků DNA z externích pracovišť

- DNA lze po izolaci do transportu uchovávat v lednici při cca +2 až +8°C (časově až 1 rok)
- čas doručení DNA vzorku do laboratoře není z hlediska stability vzorku limitován

- na transport DNA vzorků do laboratoře nejsou speciální požadavky na rozmezí teploty

Biologický materiál je možné dodat do laboratoře spolu s požadovanou dokumentací svozovou službou, kurýrem nebo doporučenou poštou (podle příslušných bezpečnostních předpisů) při dostatečném zajištění vzorků proti mechanickému nebo jinému poškození. V případě, že by bylo zjištěno poškození (vzorku, obalu), bude odesílající pracoviště okamžitě informováno o zjištěných problémech. Za zajištění bezpečného transportu vzorků zodpovídá odesílající pracoviště.

4.10 Kritéria pro přijetí vzorků k laboratornímu vyšetření

Ke zpracování jsou přijímány pouze vzorky odebrané do vhodné odběrové soupravy, nepoškozené, řádně označené a v dostatečném množství pro provedení požadovaného vyšetření.

Identifikace o vzorku musí být jednoznačná a ve shodě s informacemi uvedenými na doprovodné žádance.

4.11 Kritéria pro odmítnutí odběrového materiálu

Vzorky, které se buď svým obsahem nebo dokumentací odchylují od požadavků laboratoře, mohou být laboratoří odmítnuty. Důvodem k odmítnutí je:

- Nejasná identifikace jednotlivých vzorků: nepřítomnost nebo nečitelnost označení zkumavek
- Materiál ve stavu znemožňujícím standardní zpracování: vysrážená krev nebo užití nevhodného protisrážlivého agens, rozkládající se biologický materiál; DNA špatné kvality neumožňující standardní amplifikaci
- Mechanicky poškozené zkumavky potřísněné biologickým materiálem
- Nepřiložená žádanka k vyšetření nebo žádanka s neúplnými údaji znemožňující uplatnění úhrady za výkony související s požadovaným vyšetřením.

Náprava je vyžadována telefonicky, případně prostřednictvím e-mailu od zdroje vzorku, o příslušném jednání je uveden záznam na žádance k vyšetření: např. doplnění nebo oprava údajů na žádance telefonicky, včetně podpisu osoby, která jednání realizovala. Pracovník laboratoře provede záznam do evidence nestandardních událostí.

Při nedostatečném objemu vstupního materiálu k vyšetření je požadován další odběr (nebo vzorek DNA).

5. Vydávání výsledků a komunikace s laboratoří

5.1. Vydávání výsledků

Závěrečné zprávy o výsledku molekulárně genetického vyšetření jsou v tištěné podobě po stvrzení podpisem oprávněného pracovníka odesílány na zadavatelská pracoviště lékaři, který vyšetření indikoval.

V případě farmakogenetiky jsou výsledky vkládány do SONIS, do doby spuštění modulu pro genetiku jsou výsledky vkládány do Poznámky VŠ odborným pracovníkem laboratoře. Pro externí zadavatele vyšetření je výsledkový list vytištěn, opatřen razítkem, autorizován podpisem a odeslán za zadavatelské pracovišti.

5.2 Hlášení výsledků v kritických intervalech

Na nabízená vyšetření prováděné v laboratoři v rámci odbornosti klinické genetiky se kritické intervaly nevztahují. Patologické výsledky jsou předávány formou závěrečných zpráv pouze lékaři, který vyšetření indikoval. O dalším postupu ve vztahu k pacientovi rozhoduje indikující lékař.

5.3 Vydávání výsledků přímo pacientům

Výsledky laboratorního vyšetření nejsou vydávány přímo pacientům. Výsledky laboratorního vyšetření jsou vydávány pouze indikujícímu lékaři, který je odpovědný za klinickou interpretaci nálezu a předává výsledek srozumitelnou formou pacientovi v průběhu genetické konzultace.

5.4 Dodatečná vyšetření

Na dodatečná vyšetření je požadována nová žádanka od indikujícího lékaře.
Dodatečná vyšetření lze provést pouze v případě pacienta, který souhlasil s uložením DNA a za předpokladu zůstatku dostatečného množství DNA, v opačném případě je požadován také nový odběr.

5.5 Změny výsledků a nálezů

Pracovníci laboratoře se dodržováním zásad správné laboratorní praxe a kontrolními opatřeními snaží zabránit vzniku nahodilých chyb a omylů (překlepů).

Výsledková zpráva vychází z aktuálních poznatků o detekovaných variantách. Pokud dojde ke změně výsledku (např. změna biologické interpretace důsledku detekované varianty při nových poznatcích ve výzkumu), bude indikující klinický genetik informován v době zjištění změn - v závažných případech telefonicky ihned. Písemně bude vypracována opravná zpráva (případně dodatečná zpráva, jsou-li dostupné nové poznatky) se všemi náležitostmi závěrečné zprávy (identifikační údaje, datum, podpis) a odůvodněním změny.

6. Intervaly od dodání vzorku k vydání nálezu

Garantovaná doba odezvy laboratoře vychází z klinických potřeb vzhledem ke kvalitě péče o pacienta, standardnímu postupu a rozsahu požadovaného vyšetření, z kapacitních možností laboratoře a množství požadavků na vyšetření. Doba odezvy je stanovena od data přijetí vzorku (včetně doprovodné žádanky s indikací vyšetření) do laboratoře.

- **Pro vyšetření neznámé mutace v indikovaných genech metodou masivního paralelního sekvenování za účelem odhalení příčiny dědičné predispozice** u vysoce rizikových jedinců:
  - Vyšetření kompletní kódující sekvence požadovaných genů (dle diagnózy) včetně CNV analýzy rozsáhlých intragenových delecí/duplikací: **do 5 měsíců**
  - přednostní vyšetření (pouze v odůvodněných případech) kompletní kódující sekvence požadovaných genů (dle diagnózy) včetně CNV analýzy rozsáhlých intragenových delecí/duplikací: **do 2 měsíců**, v případě návaznosti na léčebný plán (např. PARP inhibitory) **do 6 týdnů** (kratší termín dle individuální domluvy a termínu plánované operace/změny léčebného plánu)
- **Pro vyšetření známé (familiární) mutace metodou (HRM, LR-PCR, MLPA, Sangerovo sekvenování) nebo cílené vyšetření konkrétní oblasti genu (např. GAPPS)**
  - Vyšetření v běžném režimu: do 3 měsíců
  - Vyšetření v urgentním režimu: do 1 měsíce (kratší termín dle individuální domluvy, termínu plánované operace nebo změny léčebného plánu)
- **Farmakogenetické vyšetření indikované pro potřeby indikace léčby** (DPYD, Gilbertův syndrom, trombofilní mutace):
  - Vyšetření v urgentním režimu: do 2 týdnů (tj. 10 pracovních dnů, kratší termín je možný dle individuální domluvy, dle termínu léčebného plánu)

7. Konzultační činnost laboratoře

Lékařské konzultace v oblasti klinické genetiky poskytuje **prim. MUDr. Klára Nováková, Ph.D.,** případně zastupující **Doc. MUDr. Lenka Foretová, Ph.D.**, a zahrnují:

a) hereditární formy nádorových onemocnění
b) informace k indikačním kriteriím k vyšetření nádorově predispozičních genů
c) klinickou interpretaci v případě záchytu patogenní (kauzální) mutace
d) doporučení ke sledování a další možná profylaktická opatření u pacientů s podezřením na hereditární nádorový syndrom nebo u nosičů patologické mutace

Konzultace v oblasti molekulární genetiky poskytuje **RNDr. Eva Macháčková, Ph.D**. a zahrnuje:

e) informace o poskytovaných metodách molekulárně-genetického vyšetření
f) biologickou interpretaci efektu detekovaných mutací (variant) u vyšetřovaných genů

Informace k odběru primárních vzorků a doprovodné žádance poskytuje: **Hana Pavlů**

8. Způsob řešení stížností

Na činnosti prováděné laboratoří mohou zadavatelé vyšetření podávat stížnost vedoucímu laboratoře nebo primáři oddělení a to písemnou formou (dopisem, faxem nebo e-mailem).

Za reklamaci výsledku není považována konzultace o klinické nebo biologické interpretaci detekované mutace (varianty).

Okruh stížností se může týkat:

- Výsledků laboratorních analýz (průběhu vyšetření, interpretace, formy závěrečných laboratorních zpráv)
- Způsobu jednání pracovníků laboratoře
- Nedodržení ujednání mezi žadatelem a laboratoří vyplývající z přijetí požadavku (žádanky) na provedení laboratorních analýz

O stížnostech, jejich vyšetření, přijatých nápravných opatřeních a informování stěžovatele (písemně, nejpozději do 30 dnů) jsou pořízeny záznamy o stížnosti.

9. Vyšetřování smluvními laboratořemi

Laboratoř v současné době nevyužívá služeb smluvní laboratoře.

10. Základní informace k poskytovaným vyšetřením

Vyšetření predispozičních genů u hereditárních nádorových syndromů je oprávněn indikovat pouze klinický genetik po provedení genetického poradenství a podepsaní informovaného souhlasu, za předpokladu splnění indikačních kritérií. Podrobný popis indikačních kritérií a doporučení následné péče o osoby s vysokým rizikem dědičných forem nádorového onemocnění je uveden v Supplementech Klinické onkologie dostupných ke stažení online na: https://www.linkos.cz/casopis-klinicka-onkologie:

- Klin Onkol 2009; 22(Suppl 1): 5. Téma: Dispenzarizace dědičných nádorových syndromů
- Klin Onkol 2012; 25(Suppl 1): 6. Téma: Hereditární nádorová onemocnění III
- Klin Onkol 2016; 29(Suppl 1): 3. Téma: Hereditární nádorová onemocnění IV.
- Klin Onkol 2019; 32(Suppl 2): Téma: Hereditární nádorová onemocnění V.
- Kniha: **Hereditární nádorová onemocnění v klinické praxi**. Foretová L,, Gaillyová R., Macháčková E. a kolektiv; Rok vydání 2022; Nakladatelství Grada; ISBN: 978-80-271-1293-7

Základní informace k frekvenčně nejčastějším nádorovým syndromům jsou dostupné také na webových stránkách oddělení: www.mou.cz >> Centrum Lékařské genetiky

10.1 Analýza genů metodou masívního paralelního sekvenování: testování nádorové predispozice

Cílené sekvenování na principu hybridizačního nabohacení cílových oblastí (Target Enrichment with hybridization capture) – s využitím panelu genů „**CZECANCA“** (cílený na hereditární nádorové syndromy)

Základní charakteristika vyšetření:

KAPA HyperCap Target Enrichment: Principem postupu je ultrazvuková fragmentace genomické DNA > indexování a pool knihovny > enrichment/hybridizační postup (KAPA HyperPrep protokol). Sekvenační běh připravené knihovny (s MiSeq Reagent kit v3) na MiSeq systému (Illumina). Bioinformatická analýza pomocí FinalistDX softwaru (Institute of Applied Biotechtologies a.s.) na operačním systému Linux (Ubuntu) a pomocí Softwaru GENOVESA (Bioxsys s.r.o) včetně CNV analýzy

Seznam genů zahrnutých na panelu (možnost změny v průběhu času):

Hereditary cancer panel: CZECANCA

Seznam zahrnutých genů: AIP; ALK; **APC**; APEX1; **ATM**; ATMIN; ATR; ATRIP; AURKA; AXIN1; BABAM1; BAP1; **BARD1**; BLM; BMPR1A; BRAP; **BRCA1**; **BRCA2**; BRCC3; BRE; **BRIP1**; BUB1B; CCND1; CDC73; **CDH1**; CDK4; CDKN1B; CDKN1C; CDKN2A; CEBPA; CEP57; CLSPN; CSNK1D; CSNK1E; CWF19L2; CYLD; DCLRE1C; DDB2; DHFR; DICER1; DIS3L2; DMC1; DNAJC21; DPYD; EGFR; EPCAM; EPHX1; ERCC1; ERCC2; ERCC3; ERCC4; ERCC5; ERCC6; ESR1; ESR2; EXO1; EXT1; EXT2; EYA2; EZH2; FAM175A; FAM175B; FAN1; FANCA; FANCB; FANCC; FANCD2; FANCE; FANCF; FANCG; FANCI; FANCL; **FANCM**; FBXW7; FH; FLCN; GADD45A; GATA2; GPC3; GRB7; HELQ; HNF1A; HOXB13; HRAS; HUS1; CHEK1; CHEK2; KAT5; KCNJ5; KIT; LIG1; LIG3; LIG4; LRIG1; MAX; MCPH1; MDC1; MDM2; MDM4; MEN1; MET; MGMT; MLH1; MLH3; MMP8; MPL; MRE11A; MSH2; MSH3; MSH5; MSH6; MSR1; MUS81; MUTYH; NAT1; NBN; NCAM1; NELFB; NF1; NF2; NFKBIZ; NHEJ1; NSD1; OGG1; **PALB2**; PARP1; PCNA; PHB; PHOX2B; PIK3CG; PLA2G2A; PMS1; PMS2; POLB; POLD1; POLE; PPM1D; PREX2; PRF1; PRKAR1A; PRKDC; **PTEN**; PTCH1; PTTG2; RAD1; RAD17; RAD18; RAD23B; **RAD50**; RAD51; RAD51AP1; RAD51B; **RAD51C**; **RAD51D**; RAD52; RAD54B; RAD54L; RAD9A; RB1; RBBP8; RECQL; RECQL4; RECQL5; RET; RFC1; RFC2; RFC4; RHBDF2; RPA1; RUNX1; SBDS; SDHA; SDHAF2; SDHB; SDHC; SDHD; SETBP1; SETX; SHPRH; SLX4; SMAD4; SMARCA4; SMARCB1; SMARCE1; **STK11**; SUFU; TCL1A; TELO2; TERF2; TERT; TLR2;

TLR4; TMEM127; TOPBP1; **TP53**; TP53BP1; TSC1; TSC2; TSHR; UBE2A; UBE2B; UBE2I; UBE2V2; UBE4B; UIMC1; VHL; WRN; WT1; XPA; XPC; XRCC1; **XRCC2**; XRCC3; XRCC4; XRCC5; XRCC6

Indikace k vyšetření: vyšetření je oprávněn indikovat pouze klinický genetik.

Primární materiál k vyšetření: periferní nesrážlivá krev v EDTA

Bližší informace o nabízeném NGS vyšetření:

Podrobnější informace o CZECANCA panelu jsou dostupné v Klinické onkologii 2016 Supplementum: Hereditární nádorová onemocnění IV: A jsou dostupná volně ke stažení na: http://www.linkos.cz/casopis-klinicka-onkologie:

- https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/200/4877.pdf

Anglická publikace: Soukupova et al. Validation of CZECANCA (CZEch CAncer paNel for Clinical Application) for targeted NGS-based analysis of hereditary cancer syndromes. PLoS One 2018; 13(4): e0195761. (doi: 10.1371/journal.pone.0195761)

Výsledek laboratorního vyšetření:

Byla/nebyla detekována kauzální (patologická) mutace v některém z nádorově predispozičních genů (dle spektra předpokládané nádorové predispozice)

Byla/nebyla detekována potenciálně riziková varianta/varianty nejasného významu v genu/genech vysokého rizika pro nádorovou predispozici.

Závěrečná laboratorní zpráva obsahuje genotyp, biologickou interpretaci nálezu (důsledku na funkci proteinu) a obecnou klinickou interpretaci rizika v případě záchytu kauzální (patogenní) mutace dle současných mezinárodních poznatků (publikované výsledky rozsáhlých studií) a doporučení.

Upozornění: výsledky vyšetření genů s nejasným vztahem k nádorovému onemocnění, které jsou na panelech zařazeny z výzkumných důvodů, nebudou laboratoří interpretovány

** Poznámka*: Za stanovení diagnózy, předání zprávy pacientovi srozumitelnou formou jakož i následná doporučení pro klinická sledování, profylaktické výkony nebo doporučení pro rodinné příslušníky je odpovědný klinický lékař indikující vyšetření.

10.2 Hereditární syndrom nádoru prsu a/nebo ovaria

Základní charakteristika syndromu:

Autozomálně dominantní syndrom s neúplnou penetrancí. Příčinou je nejčastěji kauzální (patogenní) mutace v genu BRCA1 nebo BRCA2. Celoživotní kumulativní riziko vzniku nádoru je u nosiček BRCA mutace zvýšeno na 65-85%. Zvýšený výskyt nádoru prsu a/nebo ovaria v rodinné anamnéze. Výskyt nádoru v mladém věku. Další geny zvyšující riziko výskytu nádoru prsu: TP53, PALB2, CDH1, PTEN, STK11, ATM, BARD1, CHEK2, NBN. Další geny zvyšující riziko výskytu nádoru ovaria: BRIP1, RAD51C, RAD51D, MLH1, MSH2, MSH6, STK11.

Indikace k vyšetření: vyšetření je oprávněn indikovat pouze klinický genetik

Základní indikační kritéria

- Kniha: **Hereditární nádorová onemocnění v klinické praxi**. Foretová L,, Gaillyová R., Macháčková E. a kolektiv; Rok vydání 2022; Nakladatelství Grada; ISBN: 978-80-271-1293-7

Primární materiál k vyšetření: periferní nesrážlivá krev v EDTA

Laboratorní postup vyšetření:

Vyšetření je prováděno z genomické DNA izolované z nesrážlivé periferní krve.

KAPA HyperCap Target Enrichment – panel genů CZECANCA – viz. sekce 10.1

Detekované vysoce rizikové bodové mutace jsou potvrzeny PCR amplifikací a Sangerovým sekvenováním, v případě pozitivního záchytu CNV je nález potvrzen pomocí MLPA analýzy.

Výsledek laboratorního vyšetření:

Byla/nebyla detekována kauzální (patologická) mutace v genu /genech zvyšujících riziko výskytu nádoru prsu a/nebo ovaria

Byla/nebyla detekována potenciálně riziková varianta/varianty nejasného významu v genu/genech vysokého/středního rizika pro nádorovou predispozici.

Závěrečná laboratorní zpráva obsahuje genotyp, biologickou interpretaci nálezu (důsledku na funkci proteinu) a obecnou klinickou interpretaci rizika v případě záchytu kauzální (patogenní) mutace dle současných mezinárodních poznatků (publikované výsledky rozsáhlých studií) a doporučení EMQN (European Molecular Genetics Quality Network).

** Poznámka*: Za stanovení diagnózy, předání zprávy pacientovi srozumitelnou formou jakož i následná doporučení pro klinická sledování, profylaktické výkony nebo doporučení pro rodinné příslušníky je odpovědný klinický lékař indikující vyšetření.

10.3 Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC, Lynchův syndrom)

Základní charakteristika syndromu:

Autozomálně dominantní syndrom s neúplnou penetrancí. Příčinou je nejčastěji mutace v některém z genů MMR systému (reparace chybného párování bází): vysoce rizikové geny MLH1, MSH2, MSH6. Celoživotní kumulativní riziko pro vznik kolorektálního karcinomu je u nosičů mutace zvýšeno na 28-75%. Zvýšený výskyt kolorektálního nádoru, nádoru endometria, méně časté jsou nádory prsu, GIT, pankreatu, glioblastom a dalších nádorů v rodinné anamnéze. Výskyt nádoru v mladém věku. Jiné geny, které zvyšují riziko výskytu kolorektálního karcinomu: PMS2, EPCAM, POLE, POLD1, EXO1, CHEK2, APC (atenuovaná forma), MUTYH, STK11, BMPR1A, SMAD4)

Indikace k vyšetření: vyšetření je oprávněn indikovat pouze klinický genetik

Základní indikační kritéria (podrobně viz. Amsterdamská kriteria I, II; Bethesda kriteria)

- Kniha: **Hereditární nádorová onemocnění v klinické praxi**. Foretová L,, Gaillyová R., Macháčková E. a kolektiv; Rok vydání 2022; Nakladatelství Grada; ISBN: 978-80-271-1293-7

Primární materiál k vyšetření: periferní nesrážlivá krev v EDTA

Laboratorní postup vyšetření:

Vyšetření je prováděno z genomické DNA izolované z nesrážlivé periferní krve.

KAPA HyperCap Target Enrichment – panel genů CZECANCA – viz. sekce 10.1

Detekované vysoce rizikové bodové mutace jsou potvrzeny PCR amplifikací a Sangerovým sekvenováním, v případě pozitivního záchytu CNV je nález potvrzen pomocí MLPA analýzy (je-li dostupná).

Výsledek vyšetření:

Byla/nebyla detekována kauzální (patologická) mutace v genu MLH1, MSH2 nebo MSH6 nebo v jiném genu zvyšujícím riziko výskytu CRC.

Byla/nebyla detekována potenciálně riziková varianta/varianty nejasného významu v genu/genech vysokého/středního rizika pro nádorovou predispozici.

Závěrečná laboratorní zpráva obsahuje genotyp, biologickou a klinickou interpretaci nálezu dle současných mezinárodních poznatků (publikované výsledky rozsáhlých studií) a doporučení EMQN (European Molecular Genetics Quality Network).

** Poznámka*: Za stanovení diagnózy, předání zprávy pacientovi srozumitelnou formou jakož i následná doporučení pro klinická sledování, profylaktické výkony nebo doporučení pro rodinné příslušníky je odpovědný klinický lékař indikující vyšetření.

10.4 Hereditární polypózní syndromy trávicího traktu s vysokým rizikem malignizace

Základní charakteristiky syndromů:

- Kniha: **Hereditární nádorová onemocnění v klinické praxi**. Foretová L,, Gaillyová R., Macháčková E. a kolektiv; Rok vydání 2022; Nakladatelství Grada; ISBN: 978-80-271-1293-7

Autozomálně **dominantní polypózní syndromy trávicího traktu:**

- Familiární adenomatózní polypóza (FAP) s rozvojem stovek až tisíců polypů v tlustém střevě. K výskytu polypů obvykle dochází od puberty. Příčinou jsou mutace v genu APC, vzácně AXIN2.
- Peutz-Jaghers syndrom (PJS): hamartomatózní polypy GIT (často jejunu, ileu, duodenu), nádory jícnu, žaludku, prsu, ovaria, pankreatu, často také melaninové skvrny (od cca 5 let) na rtech a bukální sliznici. Příčinou jsou mutace v genu STK11.
- Juvenilní polypóza: juvenilní polypy GIT (žaludek, tenké střevo, kolorektum), výskyt juvenilních polypů od 20 let věku. Příčinou jsou mutace v genech SMAD4, BMPR1A, PTEN.
- Masívní polypóza žaludku (GAPPS syndrom, dle Li et al., 2016): analýza promotoru 1B genu APC

Autozomálně **recesivní forma adenomatózní polypózy:**

- Bialelické mutace v genu MUTYH (MAP syndrom)
- Bialelické mutace v genu NTHL1 (NAP syndrom) – byla popsána evropská „founder" mutace: p.Gln90* v homozygotním stavu u několika evropských rodin (Weren at al., 2015). Frekvence v české populaci v současné době není známa.

Indikace k vyšetření: vyšetření je oprávněn indikovat pouze klinický genetik.

Základní indikační kritéria

- Mnohočetné adenomatózní polypy v tlustém střevě v mladém věku
- Polypy GIT traktu (hamartomatózní nebo juvenilní typ) v mladém věku

Primární materiál k vyšetření: periferní nesrážlivá krev v EDTA

Laboratorní postup vyšetření:

Vyšetření je prováděno z genomické DNA izolované z nesrážlivé periferní krve.

KAPA HyperCap Target Enrichment – panel genů CZECANCA – viz. sekce 10.1

Detekované vysoce rizikové bodové mutace jsou potvrzeny PCR amplifikací a Sangerovým sekvenováním, v případě pozitivního záchytu CNV je nález potvrzen pomocí MLPA analýzy.

V případě, že nebyla detekována mutace ve vysoce rizikových dominantních genech ani v genu MUTYH u předpokladu recesivní formy FAP, lze vyšetření doplnit o přímé sekvenování exonu 2 genu NTHL1,

Výsledek laboratorního vyšetření:

Byla/nebyla detekována kauzální (patologická) mutace ve vysoce rizikovém genu.

Byla/nebyla detekována potenciálně riziková varianta/varianty nejasného významu v genu/genech vysokého/středního rizika pro nádorovou predispozici.

Závěrečná laboratorní zpráva obsahuje genotyp, biologickou interpretaci nálezu (důsledku na funkci proteinu) a obecnou klinickou interpretaci rizika v případě záchytu kauzální (patogenní) mutace dle současných mezinárodních poznatků (publikované výsledky rozsáhlých studií) a doporučení.

** Poznámka*: Za stanovení diagnózy, předání zprávy pacientovi srozumitelnou formou jakož i následná doporučení pro klinická sledování, profylaktické výkony nebo doporučení pro rodinné příslušníky je odpovědný klinický lékař indikující vyšetření.

10.5 Hereditární syndrom Li-Fraumeni

Základní charakteristika syndromu:

Autozomálně dominantní syndrom s úplnou penetrancí. Příčinou je mutace v genu TP53. Celoživotní kumulativní riziko pro vznik nádoru dosahuje u nosičů mutace 100%. Zvýšený výskyt sarkomů, nádorů CNS, kůry nadledvin, prsu, leukémie, možné navýšení rizika pro jakýkoli nádor v rodinné anamnéze. Výskyt nádoru již v dětském věku (především dětské nádory mozku, rhabdomyosarkomy). Primární vícečetné nádory. Jiné geny zvyšující riziko vzniku nádorů ve spektru LFS: CHEK2, CDKN2A)

Idikace k vyšetření: vyšetření je oprávněn indikovat pouze klinický genetik

Základní indikační kritéria: (podrobně viz. kriteria podle Chompretové)

- 2 příbuzní s nádorem typickým pro Li-Fraumeni syndrom (sarkom, mozkový nádor, adrenokortikální karcinom, nádor prsu), alespoň jeden s diagnozou pod 45 let
- vícečetný výskyt primárních maligních nádorů (sarkom, mozkový nádor, adrenokortikální karcinom, nádor prsu)
- pacient s adrenokortikálním nádorem bez ohledu na věk
- Kniha: **Hereditární nádorová onemocnění v klinické praxi**. Foretová L,, Gaillyová R., Macháčková E. a kolektiv; Rok vydání 2022; Nakladatelství Grada; ISBN: 978-80-271-1293-7

Primární materiál k vyšetření: periferní nesrážlivá krev v EDTA

Laboratorní postup vyšetření:

Vyšetření je prováděno z genomické DNA izolované z nesrážlivé periferní krve.

KAPA HyperCap Target Enrichment – panel genů CZECANCA – viz. sekce 10.1

Detekované vysoce rizikové bodové mutace jsou potvrzeny PCR amplifikací a Sangerovým sekvenováním, v případě pozitivního záchytu CNV je nález potvrzen pomocí MLPA analýzy.

Výsledek vyšetření:

Byla/nebyla detekována kauzální (patologická) mutace v genu TP53 nebo v jiném genu zvyšujícím riziko výskytu nádorového onemocnění.

Byla/nebyla detekována potenciálně riziková varianta/varianty nejasného významu v genu/genech vysokého/středního rizika pro nádorovou predispozici.

Závěrečná laboratorní zpráva obsahuje genotyp, biologickou a klinickou interpretaci nálezu dle současných mezinárodních poznatků (publikované výsledky rozsáhlých studií) a doporučení EMQN (European Molecular Genetics Quality Network).

** Poznámka*: Za stanovení diagnózy, předání zprávy pacientovi srozumitelnou formou jakož i následná doporučení pro klinická sledování, profylaktické výkony nebo doporučení pro rodinné příslušníky je odpovědný klinický lékař indikující vyšetření.

10.6 Další vzácnější formy dědičné predispozice k nádorovému onemocnění

- ✓ **Dědičná predispozice k nádoru žaludku** (geny vysokého rizika: CDH1 – difúzní forma, ostatní rizikové geny: MLH1, MSH2, MSH6, APC, STK11, BMPR1A, SMAD4)
- ✓ **Dědičné nádory pankreatu** (rizikové geny: BRCA2, PALB2, CDKN2A, APC, STK11)
- ✓ **Dědičná forma nádorů ledvin** (rizikové geny: MET, FH, FLCN, SDH geny)
- ✓ **Von Hippel Lindau syndrom**: výskyt hemangioblastomu, feochromocytomu a pankreatických cyst s vysokým rizikem malignizace (rizikové geny: VHL)
- ✓ **Neurofibromatóza** (rizikové geny: NF1, NF2)
- ✓ **Tuberózní skleróza** (rizikové geny: TSC1, TSC2)
- ✓ **Dědičná forma maligního mezoteliomu a uveálního melanomu** (rizikové geny: BAP1)
- ✓ **Dědičná forma meduloblastomu** (rizikové geny: SUFU)
- ✓ **Dědičná forma rhabdoidních nádorů** (rizikové geny: SMARCB1, SMARCA4)
- ✓ **Dědičná forma paragangliomu a pheochromocytomu** (TMEM127, SDH geny)
- ✓ **Mnohočetná endokrinní neoplazie II.** – MEN2 (rizikové geny: RET)
- ✓ **Mnohočetná endokrinní neoplazie I. –** MEN1 (rizikové geny: MEN1, CDKN1B)
- ✓ **Retinoblastom** (gen RB1)
- ✓ **Wilmsův tumor –** nefroblastom (gen WT1)
- ✓ **Familiární cylindromatóza (turban tumor sy.) a mnohočetné trichoepitheliomy** (gen CYLD)
- ✓ **Nádory Sertoli–Leydigových buněk** – testikulární nádory a nádory vaječníků u mladých dospělých (gen DICER1)
- ✓ **Silver-Russell syndrom** (gen GRB7)
- ✓ **Familiární forma gastrointestinálního stromálního nádoru** – familiární GIST (gen KIT)
- ✓ **Carneyho komplex** – mnohočetné neoplázie (gen PRKAR1A)
- ✓ **Recesivní syndromy dětského věku spojené s vysokým rizikem nádorovým onemocněním:**
  - Ataxia Telangiectasia (geny ATM, MRE11A)
  - Fanconiho anemie (FANC geny, SLX4)
  - Xeroderma pigmentosum (XP ≈ ERCC geny)
  - Nijmegen breakage syndrom (gen NBN/NBS1, MRE11, RAD50)
  - Syndromy defektních helikáz s těžkým vývojovým postižením: Bloom sy., Werner sy., Rothmund-Thomson sy., Baller-Gerold sy., Rapadilino sy. (geny BLM, WRN, RECQL, RECQL5, RECQL4)

Indikace k vyšetření: vyšetření je oprávněn indikovat pouze klinický genetik dle platných doporučení

Základní indikační kritéria:

- ➢ vícečetný výskyt konkrétní malignity v rodině
- ➢ výskyt malignity v mladém věku (minimálně o 10 let dříve, než je zaznamenaný medián pro výskyt onemocnění)
- ➢ Vícečetná malignita u pacienta ve spektru dědičného nádorového syndromu
- ➢ Kniha: **Hereditární nádorová onemocnění v klinické praxi**. Foretová L,, Gaillyová R., Macháčková E. a kolektiv; Rok vydání 2022; Nakladatelství Grada; ISBN: 978-80-271-1293-7

Primární materiál k vyšetření: periferní nesrážlivá krev v EDTA

Laboratorní postup vyšetření:

Vyšetření je prováděno z genomické DNA izolované z nesrážlivé periferní krve.

KAPA HyperCap Target Enrichment – panel genů CZECANCA – viz. sekce 10.1

Detekované vysoce rizikové bodové mutace jsou potvrzeny PCR amplifikací a Sangerovým sekvenováním, v případě pozitivního záchytu CNV je nález potvrzen pomocí MLPA analýzy (je-li dostupná).

Výsledek vyšetření: Byla/nebyla detekována kauzální (patologická) mutace v indikovaném genu nebo v jiném genu zvyšujícím riziko výskytu nádorového onemocnění.

Byla/nebyla detekována potenciálně riziková varianta/varianty nejasného významu v genu/genech vysokého/středního rizika.

Závěrečná laboratorní zpráva obsahuje genotyp, biologickou a klinickou interpretaci nálezu dle současných mezinárodních poznatků (publikované výsledky rozsáhlých studií) a doporučení EMQN (European Molecular Genetics Quality Network).

Poznámka: Za stanovení diagnózy, předání zprávy pacientovi srozumitelnou formou jakož i následná doporučení pro klinická sledování, profylaktické výkony nebo doporučení pro rodinné příslušníky je odpovědný klinický lékař indikující vyšetření.

10. 7 Farmakogenetické vyšetření

Vyšetření indikována klinickým lékařem (onkologové, jiní kliničtí lékaři, ambulantní lékaři), za předpokladu splnění klinických příznaků, biochemických hodnot nebo vyšetření předcházející indikaci specifických léčiv

10. 7. 1 Varianty v genu DPYD zodpovědné za sníženou aktivitu Dihydropyrimidine dehydrogenázy

Varianty ovlivňující metabolismus Fluoropyrimidinových léčiv (dle mezinárodních doporučení: Lunenburg et al., Eur J Hum Genet. 2020, PMID: 31745289; Meulendijks et al., Lancet Oncol. 2015 PMID: 26603945)

Vyšetřované mutace

- **haplotyp HAPB3**: riziková varianta v intronu DPYD NM_000110.3:c.1129-5923C>G způsobující kryptický sestřih (je ve vazbě se silent variantou c.1236G>A) - NFE:2.1023%, dbSNP: rs75017182
- **DPYD** NM_000110.3:**c.1679T>G p.Ile560Ser (alela DPYD*13)**, NFE:0.062% dbSNP: rs55886062
- **DPYD** NM_000110.3:**c.1905+1G>A (alela DPYD*2A**), sestřihová varianta, NFE: 0.57% dbSNP: rs3918290
- **DPYD** NM_000110.3:**c.2846A>T p.Asp949Val**, NFE:0.52 dbSNP: rs67376798

Základní indikační kritéria:

- Léčba Fluoropyrimidinovými deriváty, případně jinými léčivy metabolizovanými Dihydropyrimidine dehydrogenázou u onkologických pacientů

Indikace k vyšetření: klinický lékař indikující léčbu

Primární materiál k vyšetření: periferní nesrážlivá krev v EDTA

Laboratorní postup vyšetření:

Vyšetření genomické DNA izolované z periferní krve. Diagnostický kit gb **PHARM DPYD** na principu alelické diskriminace (Generi Biotech). Real-time PCR na LightCycler-96 (Roche) stanovení DPYD variant: *2A (c.1905+1G>A), *13 (c.1679T>G), HapB3 (c.1236G>A, která je ve vazbě se sestřihovou intronovou variantou c.1129-5923C>G) a c.2846A>T (4 varianty dle doporučení guidelines PMID: 31745289).

Případně je možný alternativní postup: PCR amplifikaci exonů 13, 14, 22 a části intronu 10 genu DPYD a vyšetření metodou přímého Sangerova sekvenování na SeqStudio Flex *Genetic Analyser.*

Výsledek vyšetření:

Byla/nebyla zjištěna riziková varianta ve vyšetřovaných oblastech genu DPYD.

Nosičům patogenní varianty v genu DPYD je doporučeno snížení dávky 5-FU. Interpretace při záchytu varianty vychází z Guidelines dle:

- Lunenburg CATC, et al. Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG) guideline for the gene-drug interaction of DPYD and fluoropyrimidines. Eur J Hum Genet. 2020 Apr;28(4):508-517. PMID: 31745289.
- Meulendijks et al. Clinical relevance of DPYD variants c.1679T>G, c.1236G>A/HapB3, and c.1601G>A as predictors of severe fluoropyrimidine-associated toxicity: a systematic review and meta-analysis of individual patient data. Lancet Oncol. 2015 Dec;16(16):1639-50. PMID: 26603945)

Poznámka: K vyšetření nejsou požadovány informace o rodinné anamnéze. Za stanovení diagnózy, předání zprávy pacientovi srozumitelnou formou jakož i následnou medikaci je odpovědný klinický lékař indikující vyšetření.

10. 7. 2 Gilbertův syndrom: stanovení počtu TA repetice v promotoru UGT1A1 genu

Základní charakteristika:

Autozomálně recesivní typ dědičnosti. Jako Gilbertův syndrom (GS) je označována benigní forma nekonjugované hyperbilirubinemie. Polymorfismus v promotorové oblasti genu UGT1A1 (= UDP-glucuronosyltransferáza 1) je častou příčinou Gilbertova syndromu v bělošské populaci (až u 90% jedinců s klinickými příznaky GS). Inzerce di-nukleotidu TA v oblasti TATA boxu genu UGT1A1 redukuje expresi enzymu UDP-glucuronosyltransferázy. Normální („wild type“) alelu tvoří sekvence A**(TA)**$_6$TAA (označována jako alela *1), alela s inzercí je A**(TA)**$_7$TAA (označována jako alela *28 ≈

UGT1A1*28). Homozygotní genotyp UGT1A1*28/*28 A**(TA)**$_7$TAA / A**(TA)**$_7$TAA - zkráceně **(TA)**$_7$**/(TA)** $_7$ se nachází u cca 9% evropské populace, heterozygotní forma UGT1A1*1/*28 A**(TA)**$_6$TAA / A**(TA)**$_7$TAA - zkráceně **(TA)**$_6$**/(TA)** $_7$ u 32% evropské populace.

Jedinci s genotypem UGT1A1*28/*28 $(TA)_7/(TA)_7$ mají vysoké riziko závažné neuropenie a gastrointestinální toxicity při léčbě irinotecanem. Je nutná zvýšená opatrnost (doporučené dávkování viz. PMID: 34860573)

Vyšetřované mutace:

Genotypizace promotorové oblasti genu UGT1A1: stanovení počtu TA repetice

Základní indikační kritéria:

- Chronická nekonjugovaná bilirubinémie bez přítomnosti jiných příznaků jaterního onemocnění
- Léčba irinotekanem u onkologických pacientů

Indikace k vyšetření: klinický lékař

Primární materiál k vyšetření: periferní nesrážlivá krev v EDTA

Laboratorní postup vyšetření:

Vyšetření genomické DNA izolované z periferní krve. Diagnostický kit gb PHARM UGT1A1 (Generi Biotech) na principu analýzy křivek tání s využitím Real-time PCR LightCycler-96 (Roche). Kit umožňuje detekovat varianty polymorfismů 5TA (UGT1A1*36), 6TA (UGT1A1*1), 7TA (UGT1A1*28) a 8TA (UGT1A1*37).

Najčastější výsledek vyšetření:

Genotyp UGT1A1 alela *1/*1: $(TA)_6/(TA)_6$ - homozygot pro nativní „wild type“ alelu, nerizikový genotyp

Genotyp UGT1A1 alela *1/*28: $(TA)_6/(TA)_7$ - heterozygot s průměrnými hodnotami aktivity enzymu

Genotyp UGT1A1 alela *28/*28 $(TA)_7/(TA)_7$ - homozygot asociovaný s příznaky Gilbertova syndromu, rizikový genotyp

Raritní nálezy:

alela UGT1A1*37 repetice 8TA [$(TA)_8$TAA] snižuje aktivitu promotoru UGT1A1 výrazněji než alela *28 – asociována s příznaky Gilbertova syndromu = nižší hladina enzymu

alela UGT1A1*36 repetice 5TA – raritní alela s protektivním efektem, asociovaná se zvýšenou aktivitou promotoru (Dean et al., 2015 PMID: 28520360) = vyšší hladina enzymu

** Poznámka*: K vyšetření nejsou požadovány informace o rodinné anamnéze. Za stanovení diagnózy, předání zprávy pacientovi srozumitelnou formou jakož i následnou medikaci je odpovědný klinický lékař indikující vyšetření.

10. 7. 3 Trombofilní mutace

- vyšetření predispozičních variant genů *F5* a *F2*, které ovlivňují složení a funkci koagulačních bílkovin (faktoru V a faktoru II), jež se významně podílí na procesu srážení krve:

Vyšetřované mutace:

- **Leidenská mutace (FV Leiden)** genu pro koagulační faktor V – riziková varianta v genu *F5* označována jako 1691G>A vedoucí k záměně aminokyseliny argininu za glutamin: p.Arg506Gln (tradiční popis varianty). Dle aktuální systematické nomenklatury se jedná o missense variantu NM_000130.4:c.1601G>A p.Arg534Gln (**rs6025**)
- Mutace genu pro koagulační faktor II (**F II protrombin**) – riziková varianta v genu *F2* označována jako **G20210A** (tradiční popis). Systematicky se jedná o variantu v nekódující 3´UTR oblasti NM_000506.4:c.*97G>A (**rs1799963**)

Základní indikační kritéria:

Před indikací hormonální terapie, při pozitivní rodinné anamnéze trombotických příhod, u opakované trombózy.

Indikace k vyšetření: klinický lékař indikující léčbu

Primární materiál k vyšetření: periferní nesrážlivá krev v EDTA

Laboratorní postup vyšetření:

Vyšetření genomické DNA izolované z periferní krve. Diagnostický kit gbHEMO **FV (G1691A) a FII (G20210A)** na principu alelické diskriminace (Generi Biotech). Real-time PCR na LightCycler-96 (Roche) stanovení trombofilních mutací F5 NM_000130.4:c.1601G>A a F2 NM_000506.3:c.*97G>A.

Případně je možný alternativní postup: PCR amplifikace vyšetřovaných úseků a analýza metodou přímého Sangerova sekvenování na SeqStudio Flex *Genetic Analyser.*

Výsledek vyšetření:

Byla/nebyla zjištěna mutace trombofilní mutace.

- Leidenská mutace (**FV Leiden 1691G>A**) je nejčastější genetickou příčinou tromboembolické nemoci v evropské populaci (3-8%). Heterozygotní nosiči Leidenské mutace mají 5-7x vyšší riziko vzniku hluboké žilní trombózy; u homozygotů je pravděpodobnost trombofilních komplikací uváděno až s 80x navýšením.
- **Mutace v genu pro faktor II (F2 Protrombin G20210A)** patří mezi populačně časté mutace ovlivňující srážlivost krve. Alelická frekvence výskytu v evropské populaci je NFE:1.25% (gnomAD). Tato mutace je asociována se zvýšenou hladinou protrombinu a zvýšeným rizikem hluboké žilní trombózy, které je v případě heterozygotní mutace zvýšeno 2-3x ve srovnání s běžnou populací (OMIM *176930).

** Poznámka*: K vyšetření nejsou požadovány informace o rodinné anamnéze. Za stanovení diagnózy, předání zprávy pacientovi srozumitelnou formou jakož i následnou medikaci je odpovědný klinický lékař indikující vyšetření.

11. Přílohy

Příloha 1 Žádanka pro genetické vyšetření (indikace klinický genetik)
Příloha 2 Informovaný souhlas s genetickým vyšetřením (indikace klinický genetik)
Příloha 3 Informovaný souhlas – farmakogenetika (indikace klinický lékař)
Příloha 4 Žádanka na vyšetření – farmakogenetika (indikace externí klinický lékař)
Příloha 5 Bukální stěr – návod na odběr
Příloha 6 Požadavek na odběr na farmakogenetické vyšetření
Příloha 7 Požadavek na odběr na genetické vyšetření

Přílohy jsou dostupné na webových stránkách https://www.mou.cz/centrum-lekarske-genetiky/t1366

SEZNÁMENÍ PRACOVNÍKŮ

Datum	Jméno	Podpis