

U.S.G.POL s.r.o., Laboratoř molekulární genetiky Hanáckého pluku 1153/8, 772 00 Olomouc	<b>Laboratorní příručka LMG</b>	Platné od: 1.6.2016
		Změna: 0
		Vydání: 3



# Laboratorní příručka

<b>Zpracoval:</b> ..... doc. Mgr. Radek Vodička, Ph.D., vedoucí LMG	<b>Zkontroloval:</b> ..... Mgr. Jana Böhmová, manažer kvality	<b>Výtisk číslo:</b>  <b>1</b>
<b>Schválil:</b>  ..... MUDr. Petr Polák, CSc., lékař LMG		

U.S.G.POL s.r.o., Laboratoř molekulární genetiky Hanáckého pluku 1153/8, 772 00 Olomouc	<b>Laboratorní příručka</b>	Platné od: 1.6.2016
		Změna: 2
		Vydání: 3

## OBSAH:

1. ÚVOD.....	3
2. ZÁKLADNÍ INFORMACE O LABORATOŘI.....	3
3. ZAMĚŘENÍ LABORATOŘE A SPEKTRUM NABÍZENÝCH SLUŽEB.....	4
4. PROHLÁŠENÍ O SOUHLASU.....	5
5. MANUÁL PRO ODBĚR PRIMÁRNÍCH VZORKŮ.....	5
5.1. ZÁKLADNÍ INFORMACE PRO UŽIVATELE LABORATORNÍCH SLUŽEB.....	5
5.1.1. MOLEKULÁRNĚ-GENETICKÉ METODY.....	5
5.2. IDENTIFIKAČNÍ OZNAČENÍ PRIMÁRNÍHO VZORKU.....	13
5.3. ŽÁDANKA O LABORATORNÍ VYŠETŘENÍ.....	14
5.3.1. POŽADAVKY NA URGENTNÍ VYŠETŘENÍ.....	15
5.3.2. ÚSTNÍ POŽADAVKY NA VYŠETŘENÍ.....	15
5.3.3. DŮVODY PRO ODMÍTNUTÍ VZORKŮ PRO ZPRACOVÁNÍ.....	15
5.3.4. POSTUPY PŘI NESPRÁVNÉ NEBO NEÚPLNÉ IDENTIFIKACI VZORKU NEBO ŽÁDANKY.....	15
5.4. INFORMACE PRO ODBĚR BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU VČETNĚ MINIMÁLNÍHO MNOŽSTVÍ.....	16
5.4.1. ODBĚROVÉ NÁDOBY.....	16
5.4.2. ODBĚR PLODOVÉ VODY – AMNIOCENTÉZA.....	16
5.4.3. BIOPSIE CHORIOVÝCH KLKŮ (CVS).....	17
5.4.4. ODBĚR PERIFERNÍ KRVE.....	18
5.4.5. ODBĚR SLIZNIČNÍHO STĚRU Z DUTINY ÚSTNÍ (BUKÁLNÍ STĚR).....	18
5.5. INFORMACE A NÁVODY PŘEDÁVANÉ PACIENTŮM PŘED ODBĚREM PRIMÁRNÍHO VZORKU (INFORMOVANÉ SOUHLASY).....	19
5.6. PŘÍJEM VZORKU DO LABORATOŘE.....	19
5.7. TRANSPORT A MANIPULACE S BIOLOGICKÝM MATERIÁLEM (SE VZORKY).....	19
6. FÁZE PO VYŠETŘENÍ.....	20
6.1. BEZPEČNÉ ODSTRAŇOVÁNÍ MATERIÁLŮ POUŽITÝCH PŘI ODBĚRU.....	20
6.2. MANIPULACE A SKLADOVÁNÍ MATERIÁLU.....	20
6.3. DODATEČNÁ VYŠETŘENÍ A ČASOVÝ INTERVAL PRO JEJICH POŽADOVÁNÍ.....	20
6.4. OPAKOVÁNÍ VYŠETŘENÍ STEJNÉHO PRIMÁRNÍHO VZORKU.....	21
7. VYDÁVÁNÍ VÝSLEDKŮ A KOMUNIKACE S LABORATOŘÍ.....	21
7.1. INFORMACE O FORMÁCH VYDÁVÁNÍ VÝSLEDKŮ.....	21
7.2. ZMĚNY VÝSLEDKŮ A NÁLEZŮ.....	21
7.3. INTERVALY OD DODÁNÍ MATERIÁLU K VYDÁNÍ VÝSLEDKŮ.....	22
7.4. KONZULTAČNÍ ČINNOST LABORATOŘE.....	22
7.5. ZPŮSOB ŘEŠENÍ STÍŽNOSTÍ.....	22
7.6. OBECNÉ ZÁSADY LABORATOŘE NA OCHRANU OSOBNÍCH INFORMACÍ.....	23
7.7. SMLUVNÍ LABORATOŘ.....	23
8. PŘÍLOHY.....	24

U.S.G.POL s.r.o., Laboratoř molekulární genetiky Hanáckého pluku 1153/8, 772 00 Olomouc	<b>Laboratorní příručka</b>	Platné od: 1.6.2016
		Změna: 2
		Vydání: 3

## 1. Úvod

Centrum prenatální diagnostiky U.S.G. POL s.r.o. zahájilo svou činnost v roce 2010. Přímou tak navazuje na aktivity MUDr. Petra Poláka CSc., který toto multidisciplinární zařízení založil již v roce 2008. Sídlem centra je město Olomouc, ulice Hanáckého pluku 6, kde je možnost využít bezproblémového parkování. Jde o lokalitu v těsné blízkosti samotného historického jádra města. U.S.G. POL s.r.o. patří v současné době mezi přední česká centra a poskytuje klientům služby v mnoha odvětvích prenatální diagnostiky a lékařské genetiky.

Oblast genetického poradenství vedená od 1.1.2015 MUDr. Jiřím Hyjánkem, Ph.D. zahrnuje celé spektrum geneticky podmíněných vrozených vývojových vad a dědičných onemocnění (se zaměřením na prenatální diagnostiku, onkogenetiku, asistovanou reprodukci, dárcovství gamet, reprodukční genetiku, mentální retardace u dětských pacientů...). Genetické konzultantství využívá sborníků vrozených vývojových vad a syndromů a počítačových dysmorfologických databází. Součástí centra je diagnostická poradna pro srdeční anomálie. Vedle specializovaných odborností v oblasti genetického poradenství a prenatální diagnostiky provozuje centrum také gynekologicko-porodnickou ambulanci, která zajišťuje preventivní i léčebnou péči pro ženy všech věkových kategorií.

Velký důraz v naší činnosti je kladen na kvalitu péče a odbornost lékařů i středně zdravotnického personálu. Samozřejmostí je kontinuální proces postgraduálního vzdělávání a sledování aktuálních medicínských trendů.

V roce 2013 byla při U.S.G. POL s.r.o. založena laboratoř molekulární genetiky, jejímž primárním úkolem je dokončit vytvoření uzavřené kompletní péče o těhotnou a její příbuzné v genetickém riziku.

## 2. Základní informace o laboratoři

Laboratoř molekulární genetiky (LMG) má v souladu se svým přístrojovým vybavením a odbornými možnostmi stanoven soubor metod laboratorního vyšetření, který může realizovat. Personální obsazení zaměstnanců laboratoře i ambulance splňují svým vzděláním podmínky odborné způsobilosti.

**Klientům jsou po dohodě poskytovány informace o organizaci provozu LMG.**

Laboratoř je akreditovaná dle normy ČSN EN ISO 15189:2013.

### **Kontaktní údaje:**

Laboratoř molekulární genetiky, U.S.G. POL s.r.o., Hanáckého pluku 1153/8, 772 00 Olomouc, tel: 727 900 157 (popř. 585 242 733), e-mail: lmg@usgpol.cz

### **Provozní doba:**

**Po – Pá:** 7:30 – 16:00

Víkendový provoz v nutných případech pouze po předchozí domluvě a v případě akutního genetického vyšetření.

Vedoucí laboratoře: Mgr. Radek Vodička, Ph.D.

Manažer kvality: Mgr. Jana Böhmová

U.S.G.POL s.r.o., Laboratoř molekulární genetiky Hanáckého pluku 1153/8, 772 00 Olomouc	<b>Laboratorní příručka</b> <b>LMG</b>	Platné od: 1.6.2016
		Změna: 0
		Vydání: 3

### 3. Zaměření laboratoře a spektrum nabízených služeb

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

- plodová voda
- choriové klky
- výtěr z dutiny ústní (bukální stěr)
- periferní krev
- izolovaná DNA
- po domluvě lze i z jiných primárních materiálů (potratová tkáň, bioptická tkáň, aj.)

#### Seznam akreditovaných laboratorních vyšetření:

- Vyšetření aneuploidií chromozomů 13, 18, 21 a stanovení pohlavních chromozomů X a Y analýzou STR lokusů.
- Vyšetření panelu 36 mutací v genu CFTR metodou alelospecifické PCR
- Vyšetření mikrolecí na Y-chromozomu v oblastech AZFa, AZFb, AZFc metodou alelospecifické PCR

#### Seznam neakreditovaných laboratorních vyšetření:

- Izolace a uložení DNA
- CYSTICKÁ FIBRÓZA – vyšetření dvou nejčastějších mutací „delta F508“ a „dele2,3“ v genu pro cystickou fibrózu (*CFTR*)
- SPINÁLNÍ MUSKULÁRNÍ ATROFIE – stanovení počtu kopií genů *SMN1* a *SMN2*
- Vyšetření trombofilních mutací FV Leiden, FII Protrombin
- TURNERŮV SYNDROM – vyšetření monozomie (aneuploidie) chromozomu X
- SYNDROM FRAGILNÍHO X - Stanovení počtu opakování v genu *FMR1* metodou fluorescenčně metyl-senzitivní PCR
- MENTÁLNÍ RETARDACE – MPLA panel subtelomerických delecí a duplikací
- MENTÁLNÍ RETARDACE – MPLA panel – mikroleční syndromy
- HEREDITÁRNÍ KARCINOM PRSU/OVARIA - vyšetření kauzální mutace v genu *BRCA1* nebo *BRCA2*
- HEREDITÁRNÍ KARCINOM PRSU/OVARIA - vyšetření mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2* (Stanovení mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2* metodou masivního paralelního sekvenování, potvrzení nalezené mutace Sangerovým sekvenováním, MLPA- *BRCA1*, MLPA- *BRCA2/CHEK2*)
- LYNCHŮV SYNDROM (hereditární nepolypózní kolorektální karcinom – HNPCC) – vyšetření mutací v genech *MLH1*, *MLH2*, *MSH6*, *PMS2* pomocí masivního paralelního sekvenování
- Stanovení POHLAVÍ PLODU z fetoplacentální jednotky (v indikovaných případech)  
Stanovení POHLAVÍ PLODU z periferní krve těhotné ženy (v indikovaných případech)
- DNA diagnostika na základě požadavků klienta po konzultaci s klinickým genetikem

U.S.G.POL s.r.o., Laboratoř molekulární genetiky Hanáckého pluku 1153/8, 772 00 Olomouc	<b>Laboratorní příručka LMG</b>	Platné od: 1.6.2016
		Změna: 0
		Vydání: 3

## 4. Prohlášení o souhlasu

- Lékař odebírající materiál pro laboratoř je povinen informovat pacienty a pořídit písemný informovaný souhlas s odběrem biologického materiálu a s genetickým vyšetřením. Pacient je vždy seznámen s účelem, povahou a důsledkem prováděného vyšetření. Svým podpisem stvrzuje, že souhlasí s odběrem a případným uchováváním odebraného biologického materiálu (je vždy uvedeno v informovaném souhlasu o odběru a uchování vzorku DNA).
- Samostatnou přílohou této příručky je formulář pro informovaný souhlas s odběrem biologického materiálu a s genetickým vyšetřením.
- Pro akreditovanou metodu „Vyšetření aneuploidií chromozomů 13, 18, 21 a stanovení pohlavních chromozomů X a Y analýzou STR lokusů“ je klient nebo klientka vždy informován o limitách molekulárně genetického vyšetření. Jsou poučeni zejména o tom, že pomocí tohoto vyšetření nelze rozpoznat všechny vrozené vývojové vady plodu a svým podpisem stvrzuje, že s touto skutečností byla seznámena.

## 5. Manuál pro odběr primárních vzorků

V této kapitole jsou všechny specifické pokyny týkající se správného odběru a zacházení s primárními vzorky. Tyto pokyny jsou důležité nejenom pro pracovníky laboratoře, ale i pro pracovníky odpovědné za odběry primárních vzorků. Pracovník odebírající primární vzorky vždy ručí za jejich odběr a transport. Svým podpisem na průvodce pro dané vyšetření stvrzuje, že primární vzorek byl odebrán dle pokynů této Laboratorní příručky!!!

### 5.1. Základní informace pro uživatele laboratorních služeb

#### 5.1.1. Molekulárně-genetické metody

Molekulárně genetické vyšetření je provedeno po indikaci klinickým genetikem a řádném genetickém poradenství.

Izolace DNA je výchozí krok ke všem metodám molekulární genetiky.

Laboratoř provádí:

- izolaci DNA ze vzorku periferní krve, plodové vody, choriových klků a bukálního stěru, po domluvě i z jiných primárních vzorků a analýzy z vyizolované DNA.

#### **Plodová voda a choriové klky**

Při požadavku na prenatální molekulárně-genetické vyšetření je nejčastěji primárním materiálem pro vyšetření plodová voda a z ní získané buňky (tzv. amniocyty). Vzhledem k tomu, že se jedná o invazivní vyšetření s rizikem komplikací výkonu okolo 0,5 %, musí být výkon (amniocentéza) jednoznačně indikován. Plodová voda obsahuje kožní a slizniční buňky z povrchu plodu. Odběr se provádí nejčastěji mezi 16.-18. týdnem gravidity, lze ho však provést již od 15. týdne gravidity. Choriová biopsie (CVS) je prováděna v případech pozitivního prvotrimestrálního screeningu (UZ, kombinovaný test), kdy je pro závažnost indikace nutné s vyšetřením začít před 15. týdnem gravidity, riziko výkonu se pohybuje

U.S.G.POL s.r.o., Laboratoř molekulární genetiky Hanáckého pluku 1153/8, 772 00 Olomouc	<b>Laboratorní příručka LMG</b>	Platné od: 1.6.2016
		Změna: 0
		Vydání: 3

kolem 1%. Pokud je odběr materiálu prováděn ve vyšších týdnech gravidity, je potřeba brát v úvahu, že přerušení těhotenství z důvodu poškození plodu je až na výjimky povoleno pouze do konce 24. týdne těhotenství.

### **Periferní krev**

Důvodem odběru je molekulárně-genetické vyšetření indikované klinickým genetikem. Odběr by neměl být proveden min. 6 týdnů po transfúzi ani u pacientů, kterým byla provedena alogenní transplantace kostní dřeně. V takových případech je nutné konzultovat možnosti odběru jiného typu biologického materiálu od pacienta s vedoucím laboratoře LMG.

### **Bukální stěr**

Po vypláchnutí ústní dutiny čistou vodou se provede stěr buněk ze sliznice ústní dutiny z vnitřní strany tváře pomocí sterilního kartáčku pro odběr cytologických stěrů (cca 15x se otře sliznice vnitřní strany tváře, při odběru se přitlačí přiměřeně kartáčkem na vnitřní stranu tváře).

## **SEZNAM AKREDITOVANÝCH PROVÁDĚNÝCH VYŠETŘENÍ:**

### **Vyšetření aneuploidií chromozomů 13, 18, 21 a stanovení pohlavních chromozomů X a Y analýzou STR lokusů**

- Metoda QF-PCR umožňuje rychlou diagnostiku (do dvou pracovních dnů od dodání vzorku do laboratoře) aneuploidií autozomálních chromozomů 13, 18, 21 a stanovení pohlavních chromozomů X a Y analýzou STR lokusů na automatickém genetickém analyzátoru (sekvenátoru).

#### Indikace k vyšetření:

- riziko biochemického screeningu I. a II. trimestru vyšší než 1:100
- celkové genetické riziko nad 10%
- abnormální ultrazvukový nálezn
- kombinace více rizikových faktorů

### **Vyšetření panelu 36 mutací v genu CFTR metodou alelospecifické PCR:**

- Laboratoř provádí vyšetření 36 nejčastějších mutací *CFTR* genu metodou alelospecifické PCR pomocí kitu Devyser CFTR Core (CE-IVD) (Deyser AB).
- Součástí panelu je i testování intragenovaného polymorfismu Tn variant (5T, 7T, 9T) v intronu 9 (IVS8), kdy je sledována homo- či heterozygotní přítomnost nebo absence 5T alely, včetně rozlišení TG repetice, související s kongenitální bilaterální absencí vas (CBAVD).
- Prováděné vyšetření zachytí 90,84% všech mutací *CFTR* genu v české populaci
- Test je schopen zachytit jak asymptomatické přenašeče (heterozygoty), tak postižené jedince (homozygoty).

U.S.G.POL s.r.o., Laboratoř molekulární genetiky Hanáckého pluku 1153/8, 772 00 Olomouc	<b>Laboratorní příručka</b> <b>LMG</b>	Platné od: 1.6.2016
		Změna: 0
		Vydání: 3

#### Indikace k vyšetření:

- u pacienta s příznaky cystické fibrózy
- u příbuzných pacienta s cystickou fibrózou (CF) a detekovanými mutacemi v genu *CFTR*.
- u partnera nosiče známé mutace před plánovaným těhotenstvím, případně v průběhu těhotenství
- u dospělých mužů s poruchou plodnosti
- u párů vstupujících do asistované reprodukce
- u párů s opakovanými potraty v anamnéze
- u párů s primární nebo sekundární sterilitou
- u dárců gamet
- prenatální diagnostika v případě partnerů heterozygotů pro mutaci v *CFTR* genu
- prenatální diagnostika u plodů s UZ známkami rizika CF (střevní hyperechogenita)

#### **Vyšetření mikroleceí na Y-chromozomu v oblastech AZFa, AZFb, AZFc metodou alelospecifické PCR:**

- Analýza AZF oblasti (azoospermatický faktor) na dlouhém rameni Y chromozomu je prováděna metodou alelospecifické PCR pomocí kitu Devyser AZFv2, Devyser AZF extension (CE-IVD) (Deyser AB).
- Vyšetřovány jsou oblasti AZFa, AZFb, AZFc, ve kterých se nachází geny důležité pro správnou spermatogenezi.
- Součástí testování jsou i kontrolní markery ZFXY a sY14 na krátkém raménku chromozomu Y.
- Mikrolece v AZF oblastech se vyskytují u některých skupin mužů s poruchami plodnosti, především u azoospermiků a těžkých oligospermiků.

#### Indikace k vyšetření:

- porucha plodnosti u mužů – azospermie nebo těžká oligospermie (pod 10 mil/ ml)

### **OSTATNÍ NEAKREDITOVANÁ VYŠETŘENÍ:**

#### Vyšetření trombofilních mutací FV Leiden, FII Protrombin:

- Laboratoř provádí detekci dvou genetických variant, které jsou asociovány s trombofilními stavy.
- Metoda multiplexní alelově specifické PCR nebo multiplexní minisekvenční metoda umožňují zachytit jak normální (nemutované) tak mutované alely.
- Vrozená trombofilie je často způsobena mutacemi v genech kódující koagulační faktory, jako je faktor V Leiden a faktor II Protrombin.
- Testují se trombofilní varianty v genu:
  - pro koagulační faktor V – varianta *FV* Leiden – NM\_000130.4(F5): c.1601G>A (p.Arg534Gln)
  - koagulační faktor II – Protrombin – varianta G20210A - NM\_000506.4(F2): c.\*97G>A

U.S.G.POL s.r.o., Laboratoř molekulární genetiky Hanáckého pluku 1153/8, 772 00 Olomouc	<b>Laboratorní příručka</b>	Platné od: 2.5.2017
		Změna: 2
		Vydání: 3

#### Indikace k vyšetření:

- žilní trombóza (embolie) u jedince pod 50 let
- trombóza na neobvyklém místě
- tromboembolická choroba u pacienta se zatíženou rodinnou anamnézou
- žilní trombóza v průběhu těhotenství nebo v souvislosti s užíváním hormonální terapie nebo antikoncepce
- pacient před plánovaným chirurgickým výkonem s rodinnou anamnézou
- pacientka s opakovanými potraty v II. nebo III. trimestru těhotenství bez objasněné příčiny
- indikace klinickým hematologem

#### **HEREDITÁRNÍ KARCINOM PRSU/OVARIA - vyšetření mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2*:**

- Provádí stanovení mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2* metodou masivního paralelního sekvenování tzv. NGS (NGS - Next Generation Sequencing), potvrzení nalezené mutace Sangerovým sekvenováním, MLPA- *BRCA1*, MLPA- *BRCA2/CHEK2*
- Vyšetření s využitím masivního paralelního sekvenování se provádí za účelem detekce mutací v kódující oblasti a přilehlých nekódujících oblastech genů *BRCA1* a *BRCA2*.
- Při zachycení mutace pomocí NGS analýzy se nalezená mutace potvrzuje pomocí cíleného Sangerova sekvenování příslušné oblasti zahrnující danou mutaci.
- Rozsáhlejší delece/duplikace v exonech *BRCA1* a *BRCA2* genů a tři oblasti *CHEK2* genu jsou vyšetřovány pomocí MLPA (multiple ligation-dependent probe amplification).
- Měření NGS dat probíhá na zapůjčených měřicích prostředcích mimo prostory LMG, které jsou ve vlastnictví společnosti AeskuLab k.s. – Laboratoř forenzní a lékařské genetiky, budova MephaCentra, Opavská 39/962, 708 00 Ostrava – Poruba.

#### Indikace k vyšetření:

##### 1) dle genealogických kritérií

- alespoň 3 příbuzné diagnostikované s karcinomem prsu a/nebo ovaria (bilaterální karcinom je brán jako dva nádory)
- 2 příbuzné prvního stupně s karcinomem prsu a/nebo ovaria, z nichž alespoň jedna byla diagnostikována pod 50 let věku

##### 2) dle osobní anamnézy

- pacientka s bilaterálním nádorem prsu s první diagnosou pod 50 let věku
- pacientka s nádorem prsu a ovaria v jakémkoliv věku (nádorová duplicita)
- sporadický výskyt unilaterálního karcinomu prsu nebo ovaria ve věku pod 40 let
- muž s nádorem prsu v kterémkoliv věku
- pacientka s medulárním karcinomem prsu diagnostikovaným pod 50 let věku
- pacientka s karcinomem prsu s negativitou estrogenových a progesteronových receptorů a HER2 diagnostikovaným pod 50 let věku



U.S.G.POL s.r.o., Laboratoř molekulární genetiky Hanáckého pluku 1153/8, 772 00 Olomouc	<b>Laboratorní příručka</b>	Platné od: 1.6.2016
		Změna: 0
		Vydání: 3

### **Vyšetření mutací „delta F508“ a „dele2,3“ v genu pro cystickou fibrózu (CFTR):**

- Laboratoř provádí vyšetření dvou nejčastějších mutací F508del(-CTT) a dele2,3 (21 kb) v genu *CFTR* pomocí QF-PCR s fluorescenčně značenými primery s využitím kapilární elektroforézy.
- Test je schopen zachytit jak asymptomatické přenašeče (heterozygoty), tak postižené jedince (homozygoty).

#### **Indikace k vyšetření:**

- u pacienta s příznaky cystické fibrózy.
- u příbuzných pacienta s cystickou fibrózou a detekovanými mutacemi F508del(-CTT) a/nebo dele2,3(21 kb) v genu *CFTR*.
- u partnera nosiče mutace „F508del(-CTT) a/nebo dele2,3(21 kb) před plánovaným těhotenstvím, případně v průběhu těhotenství.
- u dospělých mužů s poruchou plodnosti.
- u párů vstupujících do asistované reprodukce
- u párů s opakovanými potraty v anamnéze
- u párů s primární nebo sekundární sterilitou
- u dárců gamet
- prenatální diagnostika v případě partnerů heterozygotů pro mutaci „F508del(-CTT) nebo dele2,3 (21 kb) v *CFTR* genu
- prenatální diagnostika u plodů s UZ známkami rizika CF (střevní hyperechogenita)

### **SPINÁLNÍ MUSKULÁRNÍ ATROFIE (SMA) – stanovení počtu kopií genů *SMN1* a *SMN2*:**

- Stanovení počtu kopií genů *SMN1* a *SMN2* se provádí na základě detekce počtu kopií exonu 7 a exonu 8 v genech *SMN1* a *SMN2* metodou MLPA (multiple ligation-dependent probe amplification).
- Geny *SMN1* a *SMN2* kódují stejný protein. Důležitější je gen *SMN1*, gen *SMN2* zodpovídá pouze za tvorbu 10 – 15 % funkčního SMN proteinu ve srovnání s genem *SMN1*. Počet kopií genu *SMN2* je velmi variabilní, pouze u 60 – 70 % jedinců se vyskytují dvě kopie. Homozygotní delece genu *SMN2* je přítomna u cca 5% zdravých jedinců.
- *SMN1* a *SMN2* geny se od sebe liší dvěma jednonukleotidovými změnami: jednou v exonu 7 a druhou v exonu 8. Jednonukleotidová změna v exonech 7 obou genů, ovlivňuje sestřih mRNA transkriptů. U 96,4 % SMA pacientů se vyskytuje homozygotní delece exonu 7 i exonu 8, nebo pouze exonu 7.
- Pouze sonda pro exon 7 genu *SMN1* je určena pro stanovení počtu *SMN1* kopií. U cca 5 % vzorků může vlivem genové konverze mezi *SMN1* a *SMN2* geny dojít ke vzniku chimérického genu obsahujícího *SMN1* exon 7 sekvenci a *SMN2* exon 8 sekvenci. Takový hybridní gen je funkční a kóduje identický protein jako nehybridní *SMN1* gen.
- Limity MPLA metody:
  - 3,6 % SMA pacientů jsou složení heterozygoti s mutací na jednom chromozomu a delecí/genovou konverzí na druhém chromozomu, tyto změny nelze detekovat MLPA metodou.
  - Falešně negativní skrínink SMA přenašečů: u cca 3,3 – 8,1 % jedinců se mohou vlivem genové konverze nacházet dvě kopie *SMN1* genu na jednom

U.S.G.POL s.r.o., Laboratoř molekulární genetiky Hanáckého pluku 1153/8, 772 00 Olomouc	<b>Laboratorní příručka</b> <b>LMG</b>	Platné od: 1.6.2016
		Změna: 0
		Vydání: 3

chromozomu a žádná kopie genu SMN1 na druhém chromozomu. V takovém případě je testovaná osoba ve skutečnosti přenašečem SMA. MPLA metoda detekuje pouze počet kopií genu nikoli jejich lokalizaci.

Indikace k vyšetření:

- diagnostika přenašečství SMA u dárců gamet
- u párů vstupujících do asistované reprodukce
- u párů s opakovanými potraty v anamnéze
- u párů s primární nebo sekundární sterilitou
- diagnostika neuromuskulárních onemocnění
- výskyt SMA v rodině
- prenatalní diagnostika v případě partnerů heterozygotů pro SMA
- u partnera přenašeče SMA

**HEREDITÁRNÍ KARCINOM PRSU/OVARIA - vyšetření kauzální mutace v genu *BRCA1* nebo *BRCA2*:**

- Vyšetření se provádí metodou Sangerova DNA sekvenování za účelem detekce konkrétní mutace ve sledované oblasti *BRCA1* nebo *BRCA2* genu.

Indikace k vyšetření:

- osoby v riziku přenašečství kauzální mutace (primárně prvostupňoví, dále druhostupňoví a vícestupňoví příbuzní) nad 18. roků

**LYNCHŮV SYNDROM (hereditární nepolypózní kolorektální karcinom – HNPCC) – vyšetření mutací v genech *MLH1*, *MLH2*, *MSH6*, *PMS2*:**

- Vyšetření s využitím sekvenování nové generace (NGS - Next Generation Sequencing) se provádí za účelem potvrzení diagnózy Lynchova syndromu (HNPCC – hereditární nepolypózní kolorektální karcinom).
- Detekují se mutace v kódujících oblastech a přilehlých nekódujících oblastech genů *MLH1*, *MLH2* a *MSH6*, *PMS2*.

Indikace k vyšetření:

- pacienti splňující Amsterdamská kritéria I a Amsterdamská kritéria II
- v rodině jsou alespoň tři příbuzní s kolorektálním karcinomem (modifikovaně u II – s nádorem typickým pro HNPCC, jeden z nich je příbuzný prvního stupně ostatních dvou)
- jsou postiženy alespoň dvě generace
- alespoň jeden nemocný je pod 50 roků
- nádor byl ověřen patologem
- je vyloučena familiární adenomatozní polypóza

U.S.G.POL s.r.o., Laboratoř molekulární genetiky Hanáckého pluku 1153/8, 772 00 Olomouc	<b>Laboratorní příručka</b> <b>LMG</b>	Platné od: 1.6.2016
		Změna: 0
		Vydání: 3

### **Vyšetření monozomie (aneuploidie) chromozomu X**

- Metoda QF-PCR zaměřená na STR lokusy chromozomu X, umožňuje stanovení monozomie (aneuploidie) chromozomu X.

#### **Indikace k vyšetření:**

- UZ markery související s Turnerovým syndromem u plodu
- postnatální fenotypová stigmata související s Turnerovým syndromem u probandky

### **Stanovení počtu opakování v genu FMR1 metodou fluorescenčně metyl-senzitivní PCR:**

- Vyšetření se provádí za účelem potvrzení diagnózy syndromu Fragilního X nebo za účelem zjištění přenašečství. Stanovuje se rozmezí fyziologické, premutované a plně mutované.

#### **Indikace k vyšetření:**

- mentální zátěž v rodině
- mentální opoždění zejména u chlapců, ale také i u dívek
- dárkyně oocytů
- prenatalní diagnostika v případě přenašečství mutace FMR1 genu u těhotné matky u plodů mužského pohlaví

### **MENTÁLNÍ RETARDACE – MPLA panel subtelomerických delecí a duplikací:**

- Test umožňuje detekci delece(i)/duplikace(i) v jedné nebo více subtelomerických oblastech chromozomů metodou MLPA
- MLPA panel je navržen pro odhalení potenciální příčiny vývojového opoždění, dysmorfických rysů, dalších vrozených abnormalit a/nebo potratů
- Panel obsahuje celkem 47 MLPA sond: 2 sondy pro každý chromozom a 1 sondu pro unikátní část Y chromozomu. Celkem 41 sond je umístěno v subtelomerických oblastech. Pro akrocentrické chromozomy (13, 14, 15, 21, 22) nejsou přítomny subtelomerické sondy, ale sonda detekující q raménko chromozomu v blízkosti centromery (např. 13p). Subtelomerické sondy pro chromozom X a Y jsou stejné a detekují sekvence v pseudoautozonálních oblastech (PAR1 a PAR2).
- Limity MPLA metody:
  - MLPA metodou nelze zjistit změny, které leží mimo cílovou sekvenci sond a většinu inverzí a vyvážených translokací.
  - Při použití vzorku nekultivovaných amniocytů může kontaminace maternální DNA vést k špatnému výsledku.
  - Při použití vzorku choriových klků byly popsány rozpory v chromozomálních nálezech mezi DNA z choriových klků a DNA plodu v důsledku mateřské kontaminace, postzygotické nondisjunkce, postzygotického isochromozomového uspořádání, mozaicismu, komplikacím při odběru vzorků DNA u těhotných s dvojčaty.
  - Ne všechny detekované subtelomerických abnormality jsou patogenní. V případě pozitivních výsledků se doporučuje, aby byli testováni i rodiče.

U.S.G.POL s.r.o., Laboratoř molekulární genetiky Hanáckého pluku 1153/8, 772 00 Olomouc	<b>Laboratorní příručka LMG</b>	Platné od: 1.6.2016
		Změna: 0
		Vydání: 3

Indikace k vyšetření:

- mentální opoždění (retardace) probanda

**MENTÁLNÍ RETARDACE – MPLA panel – mikrolečnické syndromy:**

- MLPA panel obsahu sondy pro detekci 23 mikrolečnických syndromů způsobujících mentální retardaci. Slouží pro objasnění nevysvětlených vývojových zpoždění a/nebo mentálních retardací u vícenásobných mikrolečnických syndromů
- Detekované mikrolečnické syndromy: 1p36 deleční syndrom, 2p16 mikrolececi, 2q23 mikrolececi/MBD5, 2q33 mikrolececi/SATB2, 3q29 mikrolececi, 9q22.3 mikrolececi, 15q24 deleční syndrom, 17q21 mikrolececi, 22q13 / Phelan-McDermid, Cri du Chat syndrom 5p15, DiGeorge syndrom 22q11, Distal 22q11 region, 10p14 DiGeorge region 2, Langer-Giedion syndrom 8q, Miller-Dieker syndrom 17p, NF1 mikrolececi syndrom, Prader-Willi / Angelman, MECP2 / Xq28 duplikace, Rubinstein-Taybi syndrom, Smith-Magenis syndrom, Sotos syndrom 5q35.3, Williams syndrom, Wolf-Hirschhorn 4p16.3.
- Limity MPLA metody:
  - MLPA metodou nelze zjistit změny, které leží mimo cílovou sekvenci sond a většinu inverzí a vyvážených translokací.
  - Při použití vzorku nekultivovaných amniocytů může kontaminace maternální DNA vést k špatnému výsledku
  - Při použití vzorku choriových klků byly popsány rozpory v chromozomálních nálezech mezi DNA z choriových klků a DNA plodu v důsledku mateřské kontaminace, postzygotické nondisjunkce, postzygotického isochromozomového uspořádání, mozaicismu a komplikacím při odběru vzorků DNA u těhotných s dvojčaty.
  - V případě pozitivních výsledků se doporučuje aby byli testováni i rodiče k určení, zda aberace nalezená u pacienta je skutečně de novo. Nález de novo delece nebo duplikace bude s velkou pravděpodobností příčinou mentální retardace. Ale abnormalita detekovaná jedinou sondou nemusí mít fenotypový projev, ale může být následkem vzácného polymorfismu nebo změnou počtu kopií, která je také přítomna u jednoho z rodičů.

Indikace k vyšetření:

- mentální opoždění (retardace) probanda
- podezření na mikrolečnický syndrom na základě patologického fenotypu probanda
- prenatalní diagnostika v případě postižení plodu suspektního pro některý z mikrolečnických syndromů (zejména vrozené vady srdce, CNS, významné zvětšení nuchální translucence...)

U.S.G.POL s.r.o., Laboratoř molekulární genetiky Hanáckého pluku 1153/8, 772 00 Olomouc	<b>Laboratorní příručka LMG</b>	Platné od: 1.6.2016
		Změna: 0
		Vydání: 3

### **Stanovení POHLAVÍ PLODU z fetoplacentální jednotky:**

- Určení pohlaví plodu se provádí alelospecifickou PCR amplifikací specifických lokusů z chromozomu X a Y ze vzorku nekultivovaných amniocytů nebo nekultivovaných choriových klků.

#### Indikace k vyšetření:

- genetická zátěž vázaná na pohlavní chromozom

### **Stanovení POHLAVÍ PLODU z periferní krve těhotné ženy:**

- Určení pohlaví plodu se provádí alelově specifickou PCR amplifikací specifických lokusů z chromozomu X a Y z volné fetální DNA izolované krevní plazmy těhotné.

#### Indikace k vyšetření:

- genetická zátěž vázaná na pohlavní chromozom

#### DNA diagnostika na základě požadavků klienta:

#### Indikace k vyšetření:

- vždy po konzultaci s klinickým genetikem

#### Izolace a uložení DNA:

- dle požadavků klienta a vyšetření

## **5.2. Identifikační označení primárního vzorku**

Každý biologický materiál musí být označen štítkem s uvedením **minimálně**:

1. jméno a příjmení pacienta
2. rodné číslo pacienta (pokud je to možné) případně jiný kód (např. číslo pojištění, datum, rok narození apod.)

**U samoplátců (např. cizinci) je uveden jiný kód, vždy musí být zajištěna jednoznačná identifikace vzorku a dokumentů.**

#### **Poznámka:**

**Kód** - je uváděn u neznámých osob, cizinců apod. u nichž nejsou k dispozici informace o r.č. nebo pouze v částečném rozsahu.

Za jednoznačné označení průvodky a materiálu odpovídá žadatel o vyšetření. Vždy **musí zajistit nezaměnitelnost materiálu a dokumentace.**

U.S.G.POL s.r.o., Laboratoř molekulární genetiky Hanáckého pluku 1153/8, 772 00 Olomouc	<b>Laboratorní příručka LMG</b>	Platné od: 1.6.2016
		Změna: 0
		Vydání: 3

### 5.3. Žádanka o laboratorní vyšetření

Do Laboratoře molekulární genetiky je přijímán materiál doprovázený žádankou, která musí obsahovat níže uvedené údaje:

#### **Povinné údaje:**

- jednoznačná identifikaci pacienta: jméno a příjmení, rodné číslo nebo číslo pojištěnce, datum narození, pohlaví, v případě, že není totožnost pacienta známá, jiný způsob identifikace
- identifikaci žadatele o vyšetření – IČZ lékaře, adresa a kontakt
- diagnóza či indikace
- druh primárního vzorku – vyšetřovaný materiál (plodová voda – PK, choriové klky – CVS, periferní krev – PK, bukalní stěr – BS)
- požadovaná vyšetření, popř. označení „STATIM“ pro urgentní vzorky
- datum a čas odběru primárního vzorku
- podpis žadatele o vyšetření
  
- údaje, které vyplní laboratoř při příjmu vzorku: datum a čas přijetí vzorku laboratoří, evidenční číslo vzorku (pořadové), podpis či zkratka přijímající osoby.

#### **Nepovinné údaje:**

- bydliště pacienta
- razítko žadatele o vyšetření
- telefon vyšetřovaného
- poznámky, např. užívání léků, délka těhotenství, obtížnost odběru, množství odebraného materiálu
- údaje, které vyplní laboratoř při příjmu vzorku: poznámky o míře znehodnocení vzorku, vzhledu vzorku, další provedená genetická vyšetření, příbuzenský vztah k jinému vyšetřovanému aj.

Poznámka: Formulář žádanky na vyšetření obsahující předdefinované kolonky na povinné i nepovinné údaje je uveden v Laboratorní příručce našeho pracoviště a je dostupný na vyžádání bude formulář dodán indikujícím lékaři také v tištěné formě, popřípadě na webových stránkách [www.usgpol.cz](http://www.usgpol.cz)

V případě interního (společnost U.S.G.POL s.r.o.) nebo externího odběru vzorku (externí žadatel vyšetření) jsou na oddělení recepce nebo ambulance zaznamenány požadavky na vyšetření a identifikace vzorku/pacienta do systému SMART MEDIX.

Originál externí žádanky o vyšetření je vždy přikládán sestrou k žádance na vyšetření, která je předána do LMG. V případě požadavku na více typů vyšetření je originál žádanky uložen v laboratoři provádějící první indikované vyšetření.

U.S.G.POL s.r.o., Laboratoř molekulární genetiky Hanáckého pluku 1153/8, 772 00 Olomouc	<b>Laboratorní příručka LMG</b>	Platné od: 1.6.2016
		Změna: 0
		Vydání: 3

### 5.3.1. Požadavky na urgentní vyšetření

Požadavky na vyšetření STATIM (akutní, „přednostní“ vyšetření) se do laboratoře dodávají na stejných žádankách jako pro ostatní běžná vyšetření a jsou navíc označeny slovem STATIM. Průvodka musí obsahovat stejné povinné údaje jako u běžného vyšetření. Vzorek bude přednostně zpracován a odečten

### 5.3.2. Ústní požadavky na vyšetření

Laboratoř může přijmout ústní požadavek na vyšetření v případě, že byl do laboratoře doručen materiál a žádanka daného pacienta a v době, kdy je skladován pro další možná vyšetření. Požadavek je přijímán od lékaře nebo sestry, nikoli od pacientů (pokud nejsou samoplátci). Dodatečná (doindikovaná) vyšetření jsou zaznamenána do příslušného Evidenčního sešitu k danému pacientovi a na žádanku s uvedením:

- data „dalšího“ požadavku
- lékaře požadujícího vyšetření (pokud se nejedná o samoplátce)
- identifikace pracovníka přejímajícího požadavek
- požadavek je označen – „DOINDIKOVÁNO“

### 5.3.3. Důvody pro odmítnutí vzorků pro zpracování

Odmítnout lze:

- žádanku s biologickým materiálem, na které chybí nebo jsou nečitelné základní údaje a nelze je doplnit po konzultaci s indikujícím lékařem (povinné dle kapitoly 5.3),
- žádanku nebo odběrovou nádobu znečištěnou biologickým materiálem,
- nádobu s biologickým materiálem, kde není způsob identifikace materiálu z hlediska nezaměnitelnosti dostatečný, za dostatečnou identifikaci materiálu se považuje splnění uvedených pokynů o nezbytné identifikaci biologického materiálu,
- biologický materiál bez žádanky (bez uvedení požadavků oprávněné osoby),
- nádobu s biologickým materiálem, kde zjevně došlo k porušení doporučení „fáze před vyšetřením“ (výsledky vyšetření by byly negativně ovlivněny kvalitou materiálu).

V zásadě platí, že ve všech uvedených případech nemusí laboratoř vždy vzorek odmítnout, může jej zpracovat, ale výsledek uvolní až tehdy, kdy lékař indikující vyšetření převezme odpovědnost za kvalitu a dodávku vzorku.

V případě, že vzorek nelze zpracovat, bude indikující lékař informován vedoucím laboratoře nebo jeho zástupcem a domluví se na způsobu řešení.

### 5.3.4. Postupy při nesprávné nebo neúplné identifikaci vzorku nebo žádanky

- Jedná-li se o nesoulad dodaného materiálu s dokumentací, ihned se komunikují informace se žadatelem o vyšetření a je proveden záznam do sešitu „Neshody na příjmu“,
- Neúplnost údajů na žádance – údaje jsou doplněny ústní domluvou/telefonicky záznam se provádí na žádanku a do Evidenčního sešitu a žadatel je požádán o doplnění nebo zaslání nové žádanky (v rámci U.S.G. POL s.r.o. se neprovádí záznam).

U.S.G.POL s.r.o., Laboratoř molekulární genetiky Hanáckého pluku 1153/8, 772 00 Olomouc	<b>Laboratorní příručka LMG</b>	Platné od: 1.6.2016
		Změna: 0
		Vydání: 3

- V případě, že se jedná o nenahraditelný biologický materiál a není jednoznačně identifikovaný, laboratoř začne tento materiál zpracovávat, ale výsledky nebudou uvolněny, dokud požadující lékař nebo osoba odebírající materiál nepřevzme odpovědnost za doplnění správných identifikačních údajů. Pracovník přijímající vzorek doplní a podepíše informace do příslušného Evidenčního sešitu s uvedením jména lékaře, který poskytl doplňující informace.

#### **5.4. Informace pro odběr biologického materiálu včetně minimálního množství**

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

##### **5.4.1. Odběrové nádoby**

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

Doporučujeme užívat např. níže uvedené odběrové systémy:

- **Biopsie choriových klků**
  - zkumavky BD Vacutainer s fyziologickým roztokem.
- **Plodová voda**
  - zkumavky BD Vacutainer Z. Odběr do zkumavek bez konzervační látky.
- **Bukální stěry**
  - Sterilní kartáčky pro odběr cytologických stěrů či výtěrkou (např. Dispolab, OmniSwab apod.)
- **Periferní krev**
  - zkumavky Vacuette (fialové víčko) s náplní K<sub>3</sub>EDTA

Při odběru je nutné vždy odběrové nádoby vhodně označit (dle výše uvedených pravidel).

**Pozor na záměnu biologického materiálu!**

Nestandardní odběr je nutno specifikovat na průvodce.

##### **5.4.2. Odběr plodové vody – amniocentéza**

Po ultrazvukovém vyšetření a náběru krve se těhotné pacientce provede odběr plodové vody pod kontrolou ultrazvuku a za sterilních podmínek. Vlastní odběr plodové vody provádí lékař gynekolog punkcí přes stěnu břišní při kontrole ultrazvukem, aby nedošlo k poranění plodu.

Těhotná leží na lůžku, břišní stěnu dezinfikujeme a poté ultrazvukovou sondou hledáme vhodné místo pro vpich jehlou (průměr 21gauge(Braun))-menší než na odběr krve!), na kterou se nasadí sterilní 20 ml injekční stříkačka Poloha hrotu při vpichu je neustále kontrolována ultrazvukem.

- **Specifika odběru pro molekulárně genetická vyšetření:**
  - Minimální odebrané množství pro „*Vyšetření aneuploidií chromozomů 13, 18, 21 a stanovení pohlavních chromozomů X a Y analýzou STR lokusů*“ a „*Vyšetření dvou*“



U.S.G.POL s.r.o., Laboratoř molekulární genetiky Hanáckého pluku 1153/8, 772 00 Olomouc	<b>Laboratorní příručka</b> <b>LMG</b>	Platné od: 1.6.2016
		Změna: 0
		Vydání: 3

*nejčastějších mutací delta F508 a dele2,3 v genu pro cystickou fibrózu (CFTR)*“ je 1 ml, optimální množství je však 3 ml.

- Pro ostatní vyšetření je minimální odebrané množství 12 ml, optimální množství je však 16 ml.

Bolestivost výkonu je srovnatelná s běžnou injekcí nebo odběrem krve. Po výkonu, pokud se těhotná cítí dobře, může s doprovodem odejít domů.

Pro odběr plodové vody na Genetickém pracovišti je nutné objednání na naší ambulanci.

- **Specifika doby transportu pro molekulárně genetická vyšetření:**

Pokud se odběr neprovádí na našem pracovišti, je nutné zajistit transport do laboratoře co nejdříve. Při časovém odstupu delším než 8 hodin je nutné udržovat vzorek při teplotě 2 – 8 °C. Vzorek lze však zpracovat nejpozději do 14 dnů po odběru (vzorek uchováván při teplotě 2 – 8 °C).

#### **5.4.3. Biopsie choriových klků (CVS)**

Po ultrazvukovém vyšetření se těhotné pacientce provede odběr tkáně choriových klků pod kontrolou ultrazvuku a za sterilních podmínek. Vlastní odběr provádí lékař gynekolog punkcí přes stěnu břišní z oblasti choriafrondosum při kontrole ultrazvukem, aby nedošlo k poranění plodu.

Těhotná leží na lůžku, břišní stěnu dezinfikujeme a poté ultrazvukovou sondou hledáme vhodné místo pro vpich jehlou (průměr 21gauge (Braun)) - menší než na odběr krve!), na kterou se nasadí sterilní 10 ml injekční stříkačka Luer (Chirana). Poloha hrotu při vpichu je neustále kontrolována ultrazvukem.

- **Specifika odběru pro molekulárně genetická vyšetření:**

- Minimální odebrané množství pro „*Vyšetření aneuploidii chromozomů 13, 18, 21 a stanovení pohlavních chromozomů X a Y analýzou STR lokusů*“ a „*Vyšetření dvou nejčastějších mutací delta F508 a dele2,3 v genu pro cystickou fibrózu (CFTR)*“ je jeden choriový klk o rozměrech cca 1 x 3 mm, optimální množství jsou dva a více klků o rozměrech 1 x 3 mm.
- Pro ostatní vyšetření je minimální odebrané množství 4x choriový klk o rozměrech cca 1 x 3 mm, optimální množství jsou 5 a více klků o rozměrech 1 x 3 mm.

Bolestivost výkonu je srovnatelná s běžnou injekcí nebo odběrem krve. Po výkonu, pokud se těhotná cítí dobře, může s doprovodem odejít domů.

Pro odběr choriových klků na Genetickém pracovišti je nutné objednání na naší ambulanci.

- **Specifika doby transportu pro molekulárně genetická vyšetření:**

Pokud se odběr neprovádí na našem pracovišti, je nutné zajistit transport do laboratoře co nejdříve. Při časovém odstupu delším než 8 hodin je nutné udržovat vzorek při teplotě 2 – 8

U.S.G.POL s.r.o., Laboratoř molekulární genetiky Hanáckého pluku 1153/8, 772 00 Olomouc	<b>Laboratorní příručka</b> <b>LMG</b>	Platné od: 1.6.2016
		Změna: 0
		Vydání: 3

°C. Vzorek lze však zpracovat nejpozději do 14 dnů po odběru (vzorek uchováván při teplotě 2 – 8 °C).

#### 5.4.4. Odběr periferní krve

Odběr krve na molekulárně genetické vyšetření nevyžaduje žádnou speciální přípravu pacienta.

Krev se odebírá z periferní žíly v loketní jamce. Paže se volně položí, dezinfikuje se místo vpichu (např. Cutasept, Braunoderm). Po stabilizování polohy provedeme vpich jehlou s nasazeným nástavcem a po té se na nástavec nasadí příslušná zkumavka. Místo vpichu se zakryje čtverečkem z buničiny, opatrně se přitlačí a vytáhne jehla a přelepíme náplast. Vyzveme pacienta, aby si tisknul místo vpichu (cca 2-5 minut), a po cca 20 minutách si náplast odstraní.

- **Specifika odběru pro molekulárně genetická vyšetření:**

Optimální množství pro LMG je 2 ml, min. však 400 µl.

Výjimkou je vyšetření Lynchova syndromu, mutací BRCA1 a BRCA2 a kauzální mutace v BRCA1/2 genu, kde jsou požadovány 2 nezávislé odběry po 4 ml. Pro stanovení POHLAVÍ PLODU z periferní krve těhotné ženy jsou požadovány 2 zkumavky po 10 ml.

- **Specifika doby transportu pro molekulárně genetická vyšetření:**

Pokud se odběr neprovádí na našem pracovišti, je nutné zajistit transport do laboratoře co nejdříve. Při časovém odstupu delším než 8 hodin je nutné udržovat vzorek při teplotě 2 – 8 °C. Vzorek lze však zpracovat nejpozději do 14 dnů po odběru (vzorek uchováván při teplotě 2 – 8 °C). Pro stanovení POHLAVÍ PLODU z periferní krve těhotné ženy je nutné uchovávat odebranou krev v ledové lázni a dopravit ji do 4 hodin od odběru do laboratoře.

#### 5.4.5. Odběr slizničního stěru z dutiny ústní (bukální stěr)

Odběr provádí sestra, kdy pacientovi vytře sliznice dutiny ústní sterilním kartáčkem (např. MEDICAL BRUSH CERVICAL, apod.) či výtěrkou (např. Dispolab, OmniSwab apod.) a výtěr vloží do sterilní označené zkumavky.

V rámci genetického pracoviště je pacient předem objednan na naši ambulanci.

- **Specifika odběru:**

Po odběru se nechá kartáček s bukálním stěrem zaschnout alespoň 90 min na vzduchu (v případě, že není zajištěn transport vzorku do LMG do 4 hod. po odběru). Zaschlý kartáček se uzavře do označeného sterilního obalu (např. zkumavky) a doručí do laboratoře.

- **Specifika doby transportu pro molekulárně genetická vyšetření:**

Při časovém odstupu delším než 8 hodin je nutné udržovat vzorek při teplotě 2 – 8 °C. Vzorek lze však zpracovat nejpozději do 14 dnů po odběru (vzorek uchováván při teplotě 2 – 8 °C).

U.S.G.POL s.r.o., Laboratoř molekulární genetiky Hanáckého pluku 1153/8, 772 00 Olomouc	<b>Laboratorní příručka LMG</b>	Platné od: 1.6.2016
		Změna: 0
		Vydání: 3

### **5.5. Informace a návody předávané pacientům před odběrem primárního vzorku (informované souhlasy)**

Většina odběrů pro genetická vyšetření se provádí ambulantně.

Po odběrech plodové vody se nedoporučuje fyzická námaha a těhotná žena má nárok na 14-denní pracovní neschopnost.

Odběry biologického materiálu před plánovaným genetickým vyšetřením nevyžadují speciální přípravu pacienta, základní informace jsou uvedeny u konkrétních odběrů.

Kromě odběru krve pro stanovení pohlaví plodu z periferní krve těhotné ženy (chylózní plazma inhibuje analýzu) není potřeba odběry provádět nalačno, jídlo ani pití neovlivňují výsledky vyšetření.

### **5.6. Příjem vzorku do laboratoře**

Při příjmu vzorku do laboratoře pracovník přijímající vzorek ihned zkontroluje, zda je odběrová zkumavka (nádobka, apod.) čitelně a vhodně označena a zda připojená průvodka obsahuje veškeré potřebné údaje k provedení požadovaného vyšetření.

Po provedené kontrole je vzorek a průvodka (žádanka) označena přiřazeným evidenčním číslem. Požadované vyšetření je zapsáno do příslušného Evidenčního sešitu s uvedením:

- data a času příjmu požadavku, podpisu pracovníka, který vzorek přijal,
- jméno, příjmení a rodné číslo (popř. rok narození) pacienta,
- evidenčním číslem vzorku je vždy zajištěna dohledatelnost veškerých informací souvisejících s příjmem vzorku. Evidenční číslo se přiřazuje nezaměnitelně jednotlivému biologickému materiálu dle interních pravidel laboratoře.

#### **Označení požadavku:**

- na průvodce (žádance), kde jsou vypsány požadavky, křížkem do patřičného okénka
- na průvodce, kde nejsou požadavky definovány, je nutno je vypsát ručně, psacím strojem nebo přes PC
- pokud je třeba uvést i některé další údaje, tak je doplnit, jako (např. váha pacienta, délka gravidity, poslední menstruace apod.)

Vždy musí být požadavek na vyšetření jednoznačný a údaje psané rukou čitelné.

Příjem biologického materiálu probíhá po celou pracovní dobu laboratoře.

V případě zjištěné neshody mezi průvodkou a materiálem, pracovník přijímající materiál postupuje dle kapitoly 5.3 Laboratorní příručky.

### **5.7. Transport a manipulace s biologickým materiálem (se vzorky)**

#### **Informace k dopravě:**

- za zajištění transportu a zajištění bezpečnosti přepravce (vhodný způsob balení a označení) vždy odpovídá lékař požadující vyšetření
- doprava materiálu má být šetrná, rychlá a musí být dodržovány specifické podmínky – uvedené v rámci kapitoly (5.4), **zejména dodržen čas a podmínky transportu**

U.S.G.POL s.r.o., Laboratoř molekulární genetiky Hanáckého pluku 1153/8, 772 00 Olomouc	<b>Laboratorní příručka</b> <b>LMG</b>	Platné od: 1.6.2016
		Změna: 0
		Vydání: 3

- s materiálem se nesmí během přepravy prudce manipulovat, aby nedošlo k mechanickému poškození – vhodná přeprava v transportních boxech (určených pouze pro přepravu vzorků)
- průvodky musí být umístěny v samostatném obalu, např. v igelitovém sáčku tak, aby nemohlo při náhodném vylití biologického materiálu dojít k jejich potřísnění
- při transportu je důležité chránit biologický materiál před extrémní teplotou a světlem
- v případě, že nelze přepravit materiál ihned po odebrání, musí být dodrženy specifické podmínky uvedené v kapitole 5.4

### **Upozornění:**

Pokud je materiál během transportu vylitý nebo rozbitý, laboratoř Vám to telefonicky oznámí a požádá Vás o nový odběr

## **6. Fáze po vyšetření**

### **6.1. Bezpečné odstraňování materiálů použitých při odběru**

Materiál použitý při odběru primárních vzorků je považován za potencionálně infekční (vatové tampony nebo buničité čtverce, rukavice), ukládá se do nepropustného obalu a je likvidován dle dokumentované platné legislativy. V rámci pracoviště je postup specifikován v interní dokumentaci.

Použité jehly se odhazují do plastových uzavíratelných kontejnerů k tomu určených a jsou rovněž likvidovány výše zmíněným způsobem.

Skladování laboratorních vzorků a používaného materiálu probíhá v souladu dle ustanovení §5vyhlášky MZD č. 195/2005 Sb., ve znění pozdějších předpisů.

### **6.2. Manipulace a skladování materiálu**

Neprodleně po odběru zajistí odebírající pracovník jeho transport do laboratoře ke zpracování tak, aby nedošlo k jeho znehodnocení fyzikálními vlivy a k ohrožení fyzických osob.

V průběhu zpracování je materiál uchováván dle podmínek uvedených v jednotlivých SOP nebo PP pro vyšetření a tak, aby nedošlo k jeho znehodnocení.

S materiálem se manipuluje s ohledem na bezpečnost práce a ochrany zdraví pracovníka.

### **6.3. Dodatečná vyšetření a časový interval pro jejich požadování**

Laboratoř může přijmout požadavek na dodatečná vyšetření v případě, že byl do laboratoře doručen materiál a žádanka daného pacienta a v době, kdy je skladován pro další možná vyšetření. Požadavek je přijímán od lékaře nebo sestry, nikoli od pacientů (pokud nejsou samoplátci). Dodatečná vyšetření jsou limitována vlastností, množstvím a uchováním zpracovávaného biologického materiálu.

Kvalita případného dalšího opakovaného vyšetření nebo dovyšetření může být ovlivněna dobou a metodou skladování, která je uvedena výše. Dodatečná vyšetření je možné požadovat telefonicky, ale externí žadatel vždy dodá průvodku k požadovanému dovyšetření. V případě, že pro konečné vydání výsledků je nutné dovyšetření nebo

U.S.G.POL s.r.o., Laboratoř molekulární genetiky Hanáckého pluku 1153/8, 772 00 Olomouc	<b>Laboratorní příručka LMG</b>	Platné od: 1.6.2016
		Změna: 0
		Vydání: 3

případný nový odběr biologického materiálu, komunikuje s žadatelem o vyšetření vedoucí laboratoře.

#### **6.4. Opakování vyšetření stejného primárního vzorku**

Je-li potřeba opakovat vyšetření z důvodu podezření na nesprávně vydané výsledky, takové vyšetření provede laboratoř na vlastní náklady. V případě, že již primární vzorek není k dispozici, komunikuje s žadatelem vždy lékař genetického pracoviště, o potřebě zopakovat vyšetření okamžitě informuje žadatele, tj. indikujícího lékaře.

## **7. Vydávání výsledků a komunikace s laboratoří**

### **7.1. Informace o formách vydávání výsledků**

Výsledek vyšetření je nejčastěji sdělen žadateli ve formě vytištěných výsledkových listů „Zprávy o analýze DNA“. Výsledky musí být čitelné a bez přepisů.

Před vydáním jsou všechny výsledky kontrolovány dvěma pracovníky a podepsány oprávněným pracovníkem a vedoucím laboratoře nebo lékařem s odpovídající odborností.

O výsledku vyšetření může být žadatel informován také ústně (osobně, telefonicky), jde převážně o sdělení patologického nálezu plodu. Komunikace telefonem je také užívána jen v případě nebezpečí z prodlení, řešení nějakého vzniklého problému, k zajištění potřebných chybějících informací apod.

Zaměstnanec, který hlásí výsledky telefonem, je povinen se přesvědčit, že výsledky sděluje oprávněnému lékaři (dle pravidel pracoviště).

**Interpretaci výsledků provádí vždy lékař s odpovídající odborností.**

Tištěné výsledky jsou rozděleny, zařazeny do karty nebo rozeslány poštou.

Je-li to nutné, je pacient pozván na ambulanci, kde mu lékař vždy osobně výsledky sdělí, vysvětlí a doporučí případná další dovyšetření či další řešení.

Při interpretaci výsledků je důležité brát v úvahu doporučení odborných společností a platnou legislativu (například dobu pro ukončení těhotenství).

### **7.2. 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 výsledek, komunikuje s žadatelem vždy vedoucí laboratoře. Žadateli o vyšetření je dodána nová Zprávy o analýze DNA se správnými výsledky.

U.S.G.POL s.r.o., Laboratoř molekulární genetiky Hanáckého pluku 1153/8, 772 00 Olomouc	<b>Laboratorní příručka LMG</b>	Platné od: 20.4.2017
		Změna: 1
		Vydání: 3

### 7.3. Intervaly od dodání materiálu k vydání výsledků

Vzorky jsou průběžně zpracovávány podle požadovaného vyšetření v pořadí, ve kterém jsou přijímány do laboratoře.

Doba požadovaného vyšetření od příjmu vzorku do vydání závěrečné zprávy pro nabízené diagnózy se liší dle povahy požadovaného vyšetření.

- **Molekulárně-genetické vyšetření (obecně):** 1- 4 týdny (individuálně dle vyšetření)
  - vyloučení nejčastějších chromozomálních aneuploidií plodu metodou QF-PCR do 48 hodin (v pracovních dnech)
  - NGS vyšetření genů BRCA1 a BRCA2, genů *MLH1*, *MLH2* a *MSH6* (Lynchův syndrom) – 3 až 14 měsíců
  - Vyšetření kauzální mutace v genu BRCA1/2 1 až 4 měsíce

### 7.4. Konzultační činnost laboratoře

Lékařům a žadatelům vyšetření jsou poskytovány konzultace a návody v odborné oblasti související s laboratorními vyšetřeními. Kontakty jsou uvedeny v kapitole 2 Laboratorní příručky.

### 7.5. Způsob řešení stížností

- Stížnosti ze strany žadatele o vyšetření (lékaře, pacienta a ostatních účastníků) jsou řešeny s vedoucím laboratoře (v době nepřítomnosti s jeho zástupcem). Každá stížnost je prošetřena, jsou analyzovány příčiny a hledána řešení v zájmu klienta. Vedoucí laboratoře získává kladnou i zápornou vazbu od žadatelů. Stížnosti jsou podnětem pro zlepšení práce na genetickém pracovišti a zabýváme se prošetřením každé uplatněné stížnosti.

#### Stížnost lze podávat na:

- výsledky laboratorních vyšetření,
- způsob jednání pracovníků,
- nedodržení ujednání vyplívajících z uzavřené dohody o provedení vyšetření a nedodržení dohodnuté lhůty.

#### Způsob podání stížnosti:

- laboratoř reaguje pouze na písemnou formu stížnosti (poštou, faxem, e-mailem).

#### Termíny pro vyřízení stížností:

- pokud stížnost není řešena ihned, je termín na vyřízení stížnosti 30 kalendářních dnů. V tomto termínu oznámí odpovědný pracovník lékaři (nebo pacientovi) výsledek šetření. V případě, že nelze v tomto termínu stížnost dořešit, informuje stěžovatele o dosavadním postupu (např. znalecký posudek).

U.S.G.POL s.r.o., Laboratoř molekulární genetiky Hanáckého pluku 1153/8, 772 00 Olomouc	<b>Laboratorní příručka LMG</b>	Platné od: 20.4.2017
		Změna: 1
		Vydání: 3

## **7.6. Obecné zásady laboratoře na ochranu osobních informací**

Laboratoř nakládá s osobními a citlivými údaji pacientů tak, aby nemohlo dojít k jejich neoprávněnému přístupu, změně nebo zneužití. Obecné zásady pro ochranu osobních údajů:

### 1) Organizační opatření:

Osobní a citlivá data pacientů jsou vedena v listinné formě v příručních spisovných a programu Smart MEDIX.

Listinná forma záznamu je zabezpečena uzamčením vstupu do laboratoře a řízením vstupu vizí osob. Pro zabezpečení dat v PC 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 laboratoře, 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 řízení vstup do laboratoře.

Zdravotnická dokumentace uložená v PC je v době nepřítomnosti zdravotnického pracovníka chráněna heslem pro vstup do PC. Každý pracovník má přidělený rozsah oprávnění pro přístup do PC.

## **7.7. Smluvní laboratoř**

Spektrum nabízených laboratorních vyšetření LMG je uvedeno v kapitole 3 Zaměření laboratoře a spektrum nabízených služeb. Za určení laboratoře, kam bude odeslán vzorek v případě, že LMG vyšetření neprovádí, odpovídá žadatel o vyšetření. Pro vyšetření, která laboratoř neprovádí, zajišťuje na základě žádanky lékaře LMG izolaci DNA, kterou předá zpět žadateli k odeslání.

LMG využívá smluvní laboratoře v případě mimořádné události (například dlouhodobý výpadek analyzátoru, živelné pohromy, odcizení).

LMG využívá v případě mimořádných událostí (živelné pohromy, mimořádné situace), kdy nemůže provést laboratorní vyšetření pro žadatele smluvní laboratoř – IMALAB s.r.o. Požadavky na odběr, transport a uložení vzorku po odběru zůstávají stejné.

U.S.G.POL s.r.o., Laboratoř molekulární genetiky Hanáckého pluku 1153/8, 772 00 Olomouc	<b>Laboratorní příručka</b> <b>LMG</b>	Platné od: 1.6.2016
		Změna: 0
		Vydání: 3

## 8. Přílohy

Samostatné přílohy jsou dostupné na vyžádání v LMG nebo na pracovišti Centra prenatální diagnostiky U.S.G. POL s.r.o. popřípadě na webových stránkách [www.usgpol.cz](http://www.usgpol.cz).

- Informovaný souhlas vyšetřovaného (zákonného zástupce) s genetickým laboratorním vyšetřením
- Žádanka o genetické vyšetření