

Laboratorní příručka

Zpracoval: Jan Ištváněk (166810)

Přezkoumal: Alexandra Bittnerová (444093), Klára Mollová (174800), Jana Nečasová (341501), Tomáš Pexa (238383), Dana Trávníčková (343455), Ditta Leznarová (188678)

Schválil: Jan Ištváněk (166810)

Změnový protokol:

přidána nová vyšetření:

Metabolismus léčiv, např. kodeinu, tramadolu, antidepressiv, analgetik, antipsychotik aj. (stanovení rychlosti metabolismu léčiv a vhodnosti jejich užívání s ohledem na genotyp genu CYP2D6);

Metabolismus xenobiotik – schopnost detoxikačních enzymů odbourávat karcinogeny, volné radikály, toxiny a léčiva (varianty genu GST: GST-T1, GST-M1, GST-P1);

Riziko myopatií při léčbě statiny (stanovení přítomnosti rizikové varianty genu SLCO1B1).

Obsah

1. Úvod.....	7
2. Informace o laboratoři.....	8
2.1 Základní údaje o společnosti	8
2.2 Zaměření laboratoře	9
2.3 Stav akreditace pracoviště.....	9
2.4 Organizace laboratoře, vnitřní členění.....	10
2.5 Spektrum nabízených služeb	11
3. Informace pro uživatele služeb	12
3.1 Základní informace	12
3.2 Žádanky	12
3.3 Ústní dodatečné požadavky na vyšetření.....	13
3.4 Odběrový systém	13
3.5 Odběry primárních vzorků	14
3.5.1 Klinická DNA diagnostika	14
3.5.1.1 Nesrážlivá periferní krev – vyšetření DNA	14
3.5.1.2 Nesrážlivá periferní krev – vyšetření RNA	14
3.5.1.3 Krevní skvrna – vyšetření DNA	14
3.5.1.4 Stěr z bukální sliznice – vyšetření DNA.....	15
3.5.2 Forenzní DNA diagnostika	16
3.5.3 Bezpečnostní aspekty.....	16
3.6 Doprava vzorků	16
4. Preanalytická fáze v laboratoři	17
4.1 Příjem žádanek a vzorků.....	17
4.2 Vyšetřování ve smluvních laboratořích.....	18
5. Postanalytická fáze – Vydávání výsledků a komunikace s laboratoří.....	19
5.1 Typy vydávání výsledkových zpráv.....	19
5.2 Změny výsledků a nálezů.....	20
5.3 Doby odezvy jednotlivých vyšetření	20
5.4 Konzultační činnost.....	20
5.5 Stížnosti	20
5.6 Skladování vzorků a jejich likvidace	21
6. Seznam jednotlivých vyšetření	22
α-1 antitrypsin (varianty PI*S = E288V a PI*Z = E366K v genu SERPINA1).....	22

β-fibrinogen (-455G>A) – zvýšené riziko infarktu myokardu a ischemické mozkové příhody.....	23
ACE (Ins/Del) – predispozice k hypertenzi	24
Alfa-talasémie - detekce 21 patogenních variant v genech <i>HBA1</i> a <i>HBA2</i>	25
Androgenní alopecie - vyšetření 5 predispozičních variant v genech <i>EDA2R</i> a <i>AR</i>	28
<i>ApoB</i> (R3500Q) – familiární hypercholesterolemie a zvýšené riziko aterosklerózy	29
<i>ApoE</i> (E2, E3, E4) – zvýšené riziko Alzheimerovy choroby a časného infarktu myokardu.....	30
Astma - varianty R16G a Q27E genu <i>ADRB2</i>	31
Autozánětlivá onemocnění (analýza celých genů, jejich kódujících oblastí a míst sestřihu: <i>ACP5, ADA2, ADAM17, ADAR, CARD14, COPA, ELANE, HOIL1, IFIH1, IL1RN, IL10, IL10RA, IL10RB, IL36RN, LPIN2, MEFV, MVK, NLRC4, NLRP1, NLRP3, NLRP12, NOD2, OTULIN, PLCG2, PSMB8, PSTPIP1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, SAMHD1, SH3BP2, SLC29A3, TMEM173, TNFAIP3, TNFRSF1A, TREX1</i>)	32
Bechtěrevova nemoc – ankylozující spondylitida (přítomnost alely HLA-B*27)	35
Beta-talasémie - detekce 22 patogenních variant v genu <i>HBB</i>	36
Calreticulin – myeloproliferativní neoplasie (nejčastější varianty v exonu 9 genu <i>CALR</i> - del52bp, ins5bp)	38
Celiakie – predispozice k abnormální imunitní odpovědi na lepek (<i>DQA1, DQB1</i> , serologické ekvivalenty DQ2 a DQ8)	39
Crohnova choroba – varianty R702W, G908R, 3020insC v genu <i>NOD2/CARD15</i>	41
Cystická fibróza - 68 nejčastějších patogenních variant vč. polyT a polyTG v genu <i>CFTR</i>	42
Delece v <i>AZF</i> genu na Y chromozómu (<i>AZF_{a,b,c}</i>)	45
Fragilní X – stanovení počtu CGG repetice v promotoru genu <i>FMR1</i>	46
Fruktózová intolerance – varianty A149P, A174D, N334K a delece del4E4 v genu <i>ALDOB</i>	48
Gilbertův syndrom – chronická nekonjugovaná hyperbilirubémie (inzerce nukleotidů TA v promotoru genu <i>UGT1A1</i> ; detekce alely <i>UGT1A1*28</i>).....	49
Glykoprotein GPIa (C807T) – zvýšené riziko infarktu myokardu a ischemické mozkové příhody.....	50
Glykoprotein GPIIb/IIIa (L33P) – trombocytopenie, rizikový faktor časného infarktu myokardu a mozkové příhody	51
Hemochromatóza - porucha metabolismu železa (varianty C282Y, H63D a S65C v genu <i>HFE</i>)	52
Histaminová intolerance – vyšetření 4 variant v genu pro DAO asociovaných s její sníženou produkcí a aktivitou	54
HLA typizace – typizace lokusů HLA-A, HLA-B a HLA-DR.....	55

Chronická pankreatitida - vyšetření nejčastějších patogenních variant v genech <i>PRSS1</i> a <i>SPINK1</i>	56
Chronická pankreatitida - 68 nejčastějších patogenních variant vč. polyT a polyTG v genu <i>CFTR</i>	58
Chronická pankreatitida - detekce delecí/duplikací v genech <i>PRSS1</i> , <i>SPINK1</i> a <i>CTRC</i>	61
Ichtyóza (nejčastější varianty v genu <i>FLG</i>)	62
Ichtyózy (analýza celých genů, jejich kódujících oblastí a míst sestřihu: <i>ABCA12</i> , <i>ALOX12</i> , <i>ALOX12B</i> , <i>ALOXE3</i> , <i>CERS3</i> , <i>CYP4F22</i> , <i>KRT1</i> , <i>KRT2</i> , <i>KRT10</i> , <i>NIPAL4</i> , <i>PNPLA1</i> , <i>SPINK5</i> , <i>STS</i> , <i>TGM1</i>)	63
<i>JAK2</i> – polycytemia vera (somatická varianta V617F v genu <i>JAK2</i>)	65
<i>JAK2</i> exon 12 – polycytemia vera (nejčastější varianty v exonu 12 genu <i>JAK2</i>)	66
Karcinom prsu, vaječníků a prostaty (NGS) - geny <i>BRCA1</i> a <i>BRCA2</i> - analýza celých genů, jejich kódujících oblastí a míst sestřihu	67
Karcinom prsu, vaječníků a prostaty (MLPA) - <i>BRCA1</i> a <i>BRCA2</i> – vyšetření velkých genových přestaveb	69
Karcinom prsu a vaječníků - rozšířený NGS panel 21 genů (analýza celých genů, jejich kódujících oblastí a míst sestřihu: <i>ATM</i> , <i>BARD1</i> , <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> , <i>BRIP1</i> , <i>CDH1</i> , <i>CDK12</i> , <i>FAM175A</i> , <i>FANCD2</i> , <i>CHEK2</i> , <i>MRE11</i> , <i>MSH6</i> , <i>NBN</i> , <i>PALB2</i> , <i>PMS2</i> , <i>RAD51B</i> , <i>RAD54L</i> , <i>TP53</i> , <i>RAD50</i> , <i>RAD51C</i> , <i>RAD51D</i>).....	70
Karcinom prostaty - rozšířený NGS panel 26 genů (analýza celých genů, jejich kódujících oblastí a míst sestřihu: <i>AKT1</i> , <i>APC</i> , <i>AR</i> , <i>ATM</i> , <i>BRAF</i> , <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> , <i>CDH1</i> , <i>CDK12</i> , <i>CTNNB1</i> , <i>HOXB13</i> , <i>CHEK2</i> , <i>IDH1</i> , <i>KRAS</i> , <i>MED12</i> , <i>MLH1</i> , <i>MSH2</i> , <i>MSH6</i> , <i>MYC</i> , <i>PIK3CA</i> , <i>PIK3R1</i> , <i>PMS2</i> , <i>PTEN</i> , <i>RB1</i> , <i>SPOP</i> , <i>TP53</i>).....	72
Kolorektální karcinom a karcinom pankreatu - NGS panel 16 genů (analýza celých genů, jejich kódujících oblastí a míst sestřihu: <i>APC</i> , <i>BRAF</i> , <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> , <i>CTNNB1</i> , <i>KRAS</i> , <i>MLH1</i> , <i>MSH2</i> , <i>MSH6</i> , <i>MUTYH</i> , <i>MYC</i> , <i>PIK3CA</i> , <i>PMS2</i> , <i>PTEN</i> , <i>STK11</i> , <i>TP53</i>).....	74
Kolorektální karcinom – Lynchův syndrom (MLPA) – geny <i>MLH1</i> , <i>MSH2</i> , <i>PMS2</i> , <i>EPCAM</i> , <i>MSH6</i> a <i>MUTYH</i> – vyšetření velkých genových přestaveb	77
Kolorektální karcinom - polypózní (MLPA) - gen <i>APC</i> - vyšetření velkých genových přestaveb.....	78
KREC/TREC - vyšetření primárních imunodeficiencí - SCID a XLA	79
Laktózová intolerance – varianty -13910C>T a -22018G>A v genu <i>LCT</i>	80
<i>LTA</i> (C804A) – silně prozánětlivý faktor spojen s koronárními onemocněními	81
Metabolismus antikoagulantů, antidepresiv, antiepileptik, inhibitorů protonové pumpy, antikonvulziv, hypnotik, sedativ, antimalarik, antiretrovirik, antimykotik aj. (gen <i>CYP2C19</i> alely *1, *2, *3, *17).....	82
Metabolismus léčiv, např. kodeinu, tramadolu, antidepresiv, analgetik, antipsychotik aj. (stanovení rychlosti metabolismu léčiv a vhodnosti jejich užívání s ohledem na genotyp genu <i>CYP2D6</i>).....	83
Metabolismus mědi – vyšetření nejčastějších patogenních variant v genu <i>ATP7B</i>	84

Metabolismus myorelaxans, např. suxamethonia, mivacuria (gen <i>BCHE</i> alely A, K, F1, F2, S1).....	85
Metabolismus Thiopurinů – stanovení genotypu ovlivňujícího metabolismus thiopurinů (gen <i>TPMT</i> alely *1, *2,*3A, *3B, *3C)	86
Metabolismus Warfarinu - stanovení genotypu ovlivňujícího dávkování warfarinu (polymorfismy v cytochromu <i>CYP2C9</i> *1, *2, *3, a genu <i>VKORC1</i>)	87
Metabolismus xenobiotik – schopnost detoxikačních enzymů odbourávat karcinogeny, volné radikály, toxiny a léčiva (varianty genu <i>GST</i> : <i>GST-T1</i> , <i>GST-M1</i> , <i>GST-P1</i>).....	89
MPL – myeloproliferativní neoplasie (nejčastější varianty v exonu 10 genu <i>MPL</i> - W515L, W515K, W515A, S505N	90
Myeloidní panel - DNA (vyšetření nejčastějších somatických variant v DNA u pacientů s AML, MDS, MPN, CML, aj.).....	91
Myeloidní panel - RNA (vyšetření nejčastějších somatických genových fúzí a abnormální exprese u pacientů s AML, MDS, MPN, CML, aj.).....	93
Nádorové syndromy - NGS panel 50 genů (analýza celých genů, jejich kódujících oblastí a míst sestřihu: <i>AKT1</i> , <i>APC</i> , <i>AR</i> , <i>ATM</i> , <i>ATR</i> , <i>BARD1</i> , <i>BLM</i> , <i>BRAF</i> , <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> , <i>BRIP1</i> , <i>CDH1</i> , <i>CDK12</i> , <i>CTNNB1</i> , <i>EPCAM</i> , <i>FAM175A</i> , <i>FANCD2</i> , <i>GATA3</i> , <i>GEN1</i> , <i>HOXB13</i> , <i>CHEK2</i> , <i>IDH1</i> , <i>KRAS</i> , <i>MED12</i> , <i>MLH1</i> , <i>MRE11</i> , <i>MSH2</i> , <i>MSH6</i> , <i>MUTYH</i> , <i>MYC</i> , <i>NBN</i> , <i>NF1</i> , <i>PALB2</i> , <i>PIK3CA</i> , <i>PIK3R1</i> , <i>PMS2</i> , <i>PTEN</i> , <i>RAD50</i> , <i>RAD51B</i> , <i>RAD51C</i> , <i>RAD51D</i> , <i>RAD54L</i> , <i>RB1</i> , <i>RET</i> , <i>SPOP</i> , <i>STK11</i> , <i>TP53</i> , <i>VHL</i> , <i>WT1</i> , <i>XRCC2</i>).....	95
Narkolepsie – průkaz predispozičního haplotypu <i>DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602</i> 98	
Osteoporóza – přítomnost predispozičních alel v genech <i>VDR</i> a <i>COL1A1</i>	99
Ověření konkrétní varianty	100
Predispozice k žilním trombózám.....	101
Faktor II Protrombin (<i>G20210A</i>)	101
Faktor V Leiden (<i>G1691A</i>).....	101
Faktor V R2 (<i>H1299R</i>).....	101
Faktor XIII (<i>V34L</i>).....	101
PAI-1 (<i>4G/5G</i>).....	101
MTHFR (<i>C677T</i> , <i>A1298C</i>).....	101
Prelinguální hluchota - vrozená nesyndromová ztráta sluchu (všechny varianty v kódující sekvenci a intrononová varianta c.-23+1G>A genu <i>GJB2</i>)	103
Psoriáza – Lupénka – genetická predispozice <i>HLA-C*06</i>	104
Revmatoidní artritida - průkaz sdíleného epitopu u všech známých <i>HLA-DRB1</i> alel a rozlišení homozygotů a heterozygotů.....	105
Rezistence k viru HIV - varianta chemokinového receptoru <i>CCR5</i>	106
Riziko myopatií při léčbě statiny – stanovení přítomnosti rizikové varianty v genu <i>SLCO1B1</i>	107

Sklerodermie - varianta -945C>G genu <i>CTGF</i>	108
Spinální muskulární atrofie - delece/duplikace exonu 7 a 8 v genech <i>SMN1</i> a <i>SMN2</i> ...	109
Stanovení DNA profilu – identifikace osob, určování otcovství a příbuzenských vztahů pomocí STR analýzy	111
Stanovení fúzního genu BCR-ABL – Ph1 chromozom (přestavby M-bcr, m-bcr a μ -bcr)	112
Toxicita Irinotecan (gen <i>UGT1A1</i>)	113

1. Úvod

Vážení kolegové, vážení zákazníci,

pro přehlednou orientaci jsme pro Vás připravili Laboratorní příručku, která popisuje pokyny k odběrům biologického materiálu, identifikaci vzorků, příjem vzorků, analýzy a vydávání výsledkových zpráv.

Naší snahou je minimalizace chyb a maximální spokojenost Vás, zákazníků, proto prosím věnujte tomuto dokumentu pozornost.

Laboratorní příručka je pravidelně aktualizována na www.unilabs.cz.

Věříme, že Vám tato Laboratorní příručka v mnoha směrech poradí a přispěje ke zkvalitnění vzájemné spolupráce.

Kolektiv laboratoře

2. Informace o laboratoři

2.1 Základní údaje o společnosti

Obchodní název: Unilabs Diagnostics, k.s.
Sídlo společnosti: Evropská 2589/33b, 160 00 Praha 6
Webová stránka: <http://www.unilabs.cz/>

Základní údaje o laboratoři:

Název: Laboratoř forenzní a lékařské genetiky
Vedoucí laboratoře: Mgr. Jan Ištváněk, Ph.D.
Adresa: Škrobárenská 502/1, 617 00 Brno
tel.: 515 511 460

Identifikační údaje: IČO: 60470488
DIČ: CZ699007457

Provozní doba laboratoře: Po – Pá: 7:00 – 15:30

Příjem vzorků: Po – Pá: 7:00 – 15:30

2.2 Zaměření laboratoře

Laboratoř forenzní a lékařské genetiky (dále laboratoř) vznikla v roce 1998 v Brně jako nestátní zdravotnické zařízení a zařadila se mezi první pracoviště, která začala provádět forenzně genetická testování v České republice. Primárním cílem společnosti je provádět klinickou DNA diagnostiku pro lékaře z řad klinických genetiků, hematologů, kardiologů, internistů, pediatrů, gynekologů a dalších.

V srpnu 2009 byla společnost zapsána do prvního oddílu Seznamu ústavů kvalifikovaných pro znaleckou činnost, vedeného Ministerstvem spravedlnosti České republiky. Rozsah znaleckého oprávnění zahrnuje obor zdravotnictví, specializace identifikace osob a určování příbuzenských vztahů analýzou DNA. V současnosti patří mezi největší privátní znalecké pracoviště v České republice.

V květnu 2010 obdržela společnost rozhodnutím ředitele Státního ústavu pro kontrolu léčiv povolení k činnosti diagnostické laboratoře k provádění laboratorního vyšetřování vzorků biologických materiálů odebraných dárčům pro posouzení zdravotní způsobilosti a výběr dárce.

V roce 2012 došlo k rozšíření znaleckého oprávnění o obor kriminalistika, jež zahrnuje oprávnění pro vyhledávání, identifikaci, dokumentaci, zajištění stop biologického původu a forenzní genetikou.

Společnost se pravidelně účastní externích kontrol kvality klinických vyšetření. Ve forenzní oblasti se účastní mezinárodních testů odbornosti GEDNAP, pořádaných Institutem pro forenzní vědy a soudní medicínu v Německu.

Od roku 2017 je laboratoř součástí společnosti AeskuLab k.s., která se 1.6.2023 přejmenovala na Unilabs Diagnostics, k.s.

2.3 Stav akreditace pracoviště

Laboratoř je akreditována dle ČSN EN ISO 15 189. Konkrétní rozsah akreditovaných vyšetření najdete na webových stránkách www.cai.cz pod číslem 8141. Laboratoř využívá flexibilní rozsah akreditace.

2.4 Organizace laboratoře, vnitřní členění

Pracoviště: Laboratoř forenzní a lékařské genetiky

Pracovníci laboratoře

Mgr. Jan Ištváněk, Ph.D. – vedoucí laboratoře, VŠ odborný pracovník se specializací: bioanalytik pro klinickou genetiku

Mgr. Jana Nečasová – zástupkyně vedoucího laboratoře, VŠ odborný pracovník se specializací: bioanalytik pro klinickou genetiku, znalkyně v oboru zdravotnictví, odvětví genetika, specializace identifikace osob a určování příbuzenských vztahů analýzou DNA

Mgr. Tomáš Pexa – VŠ odborný pracovník, znalec v oboru zdravotnictví, odvětví genetika, specializace identifikace osob a určování příbuzenských vztahů analýzou DNA, znalec v oboru kriminalistika, odvětví kriminalistika, specializace forenzní genetika

Mgr. Alexandra Bittnerová – VŠ odborný pracovník se specializací: bioanalytik pro klinickou genetiku

Mgr. Klára Mollová – VŠ odborný pracovník

Mgr. Dorota Nižňanská – VŠ odborný pracovník

MUDr. Ditta Leznarová – lékař, klinický genetik s atestací

Bc. Jana Dederová – vedoucí laborantka, zdravotní laborantka s atestací

Dana Olejníčková – zdravotní laborantka s atestací

Lenka Pokorná – zdravotní laborantka s atestací

Leona Jarošová – zdravotní laborantka s atestací

2.5 Spektrum nabízených služeb

Klinická DNA diagnostika

Seznam vyšetření najdete v Kap. 6. Seznam jednotlivých vyšetření.

Informovaný souhlas najdete na webových stránkách: <http://www.unilabs.cz>

Forenzní DNA diagnostika

- Znalecké posudky v rozsahu znaleckého oprávnění jednotlivých znalců
- Soukromé DNA testy – určení otcovství
 - vyhotovení znaleckých posudků do jednoho měsíce od obdržení opatření/usnesení (po domluvě lze provést v expresní lhůtě za příplatek) za podmínky, že vzorky ke zpracování v dané věci jsou kompletní
 - odborné posouzení relevantnosti zajištěných vzorků ve vztahu k případu (vyloučení vzorků s případem zjevně nesouvisejících – úspora materiálních prostředků)
 - rozšíření již vyhotovených znaleckých posudků, popř. odborných vyjádření v rozsahu znaleckého oprávnění
 - konzultační a poradenská činnost pro policejní orgány, státní zástupce, soudce, advokáty a ostatní laickou i odbornou veřejnost
 - na základě předběžné domluvy je možné v nejkratším možném čase na kterémkoliv místě v republice odborně poradit a pomoci při úkonech, které mohou účast odborného personálu naší laboratoře vyžadovat

3. Informace pro uživatele služeb

3.1 Základní informace

Pracovníci laboratoře provádí odběry pouze pro forenzní účely. Postupy pro preanalytickou, analytickou a postanalytickou fázi, včetně příjmu a evidence žádanky a biologického materiálu jsou podrobně popsány v následujících kapitolách tohoto dokumentu.

3.2 Žádanky

Laboratoř má vytvořenou svou vlastní žádanku s rozsahem vyšetření dle pracoviště. Aktuální verze žádanky je k dispozici na webových stránkách: <http://www.unilabs.cz>

V žádance musí lékař/zadavatel vyšetření vyplnit:

- identifikaci pacienta – jméno, příjmení, rodné číslo, číslo pojišťovny či samoplátce
- pohlaví pacienta
- druh primárního vzorku
- jméno lékaře (žadatele o vyšetření), adresa ambulance
- identifikační číslo zdravotnického zařízení
- odbornost indikujícího lékaře
- soupis požadovaných vyšetření
- klinické informace o pacientovi (hlavní klinická diagnóza a případné vedlejší diagnózy)
- datum a čas odběru primárního vzorku

Příjem / odběr vzorků k vyšetření

Vzorky k vyšetření přebírá pracovník laboratoře od svozové služby společnosti Unilabs diagnostics, k.s.

V případě požadavku na forenzní analýzu DNA dopraví vzorky do laboratoře zadavatel, tj. policie, soud, soukromá osoba, v některých případech může být biologický vzorek odebrán přímo v laboratoři.

Odběrové nádoby musí být nezaměnitelně označeny.

Odebraný biologický materiál je při příjmu přezkoumán pracovníky laboratoře společně s žádankou.

Přezkoumání požadavků na vyšetření vzorků

Účelem přezkoumání je zajistit, aby se k dalšímu zpracování nedostal biologický vzorek, k němuž není připojena žádanka, případně vzorek, k němuž je připojena žádanka s neúplnými informacemi. V žádném případě nelze analyzovat vzorek s nedostatečnou identifikací. Přezkoumání úplnosti informací v žádance a ověření identifikace vzorků probíhá při příjmu

vzorků. Příjem provádí pracovník laboratoře, který před zpracováním přezkoumává, zda vzorek je vhodný k požadovanému vyšetření.

Potvrzením shody s požadavky je přidělení identifikačního čísla danému vzorku a jeho zanesení elektronickým způsobem do databáze v Laboratorním informačním systému.

Forenzní vzorky jsou zapsány do knihy „Evidence/Příjem forenzních vzorků“.

Pokud je dodán materiál bez žádanky a jedná se o nenahraditelný vzorek, laboratoř tento vzorek vyšetří, ale výsledek bude uvolněn, až zadavatel doplní identifikační údaje, tedy žádanku. Pokud je dodán neoznačený vzorek a jedná se o nenahraditelný vzorek (likvor, apod.) se žádankou, tak laboratoř tento vzorek vyšetří, ale výsledky uvolní, až zadavatel převezme odpovědnost za identifikaci a přijetí vzorku nebo za poskytnutí informace, nebo za všechno současně.

V případě, že pacient nedá souhlas (uvedený na žádance) s uložením vzorku pro další analýzu, nebo s anonymním využitím DNA k lékařskému výzkumu, je vzorek zlikvidován do 1 měsíce po posledním vyšetření.

Nakládání s osobními údaji

Pracovníci laboratoře nakládají s osobními údaji pacientů podle Předpisu č. 372/2011 Sb. – Zákon o zdravotních službách a jejich poskytování, a to podle § 51 o zachování mlčenlivosti a podle § 65 o nahlížení do zdravotnické dokumentace.

3.3 Ústní dodatečné požadavky na vyšetření

Laboratoř přijímá ústní požadavky na vyšetření. Lékař nebo zdravotní sestra může, dle stability biologického vzorku a množství dodaného vzorku, doobjednat další vyšetření. Zadavatel je povinen vždy dodat novou žádanku s dodatečnými požadavky na vyšetření. V opačném případě vzorek nebude vyšetřen. Výsledková zpráva je vydána po dodání žádanky.

3.4 Odběrový systém

Pracovníci laboratoře provádí forenzní odběry, stěry bukalní sliznice, sami. Tyto odběry spadají do oblasti forenzní DNA diagnostiky.

V případě klinické DNA diagnostiky jsou odběry prováděny zadavateli. Stav pacienta, vlastní odběr materiálu, jeho transport do laboratoře, uchování a další manipulace se vzorkem před analýzou mohou významnou měrou ovlivnit vlastní konečný výsledek analýzy. Další informace k odběrovému systému viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Odběr vzorku, typ a množství vzorku

Množství vzorku souvisí se zadaným počtem vyšetření na žádance – viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Podstatné nedodržení odebíraného objemu, způsobené například vadnou technikou odběru, či technickou závadou materiálu může být důvodem k neprovedení vyšetření.

3.5 Odběry primárních vzorků

3.5.1 Klinická DNA diagnostika

Ke genetickému vyšetření je možné dodat:

3.5.1.1 Nesrážlivá periferní krev – vyšetření DNA

- zkumavka s protisrážlivou látkou K3EDTA nebo citrátem sodným.
- Krev nesmí být odebrána do heparinu!
- Pro molekulárně-genetické vyšetření stačí jedna malá zkumavka krve (2 ml).
- Odběr není třeba provádět nalačno!
- Odebraný biologický materiál je třeba skladovat při 4–8 °C, pokud není bezprostředně po odběru zaslán do laboratoře. Za těchto podmínek je možné biologický materiál uchovávat 7 dnů.
- Pokud se předpokládá delší uskladnění biologického materiálu před odesláním do laboratoře, je vhodné odebraný biologický materiál zamrazit, kromě vyšetření založených na analýze RNA a vyšetření, u kterých jsou specifikovány jiné podmínky odběru a transportu (viz níže).
- **U vyšetření dědičných nádorových onemocnění zašlete dva nezávislé odběry, pro případné ověření pozitivního výsledku.**
- *U onkohematologických vyšetření somatických variant v DNA odebrat min. 6 ml nesrážlivé krve. Krev uložit při teplotě do 4-8 °C bezprostředně po odběru.*

3.5.1.2 Nesrážlivá periferní krev – vyšetření RNA

- **do speciální odběrové zkumavky Tempus Blood RNA Tube s modrým víčkem, která stabilizuje RNA až na 5 dní při pokojové teplotě a nejméně měsíc při 4°C. Odebrat minimálně 3 ml periferní krve!**
- zkumavka s protisrážlivou látkou K3EDTA. V tomto případě je potřeba odebrat minimálně 4 ml periferní krve. Odebraný biologický materiál je třeba skladovat při 4–8 °C a odeslat do laboratoře týž den, kdy byl proveden odběr. Nemrazit!
- Odběr není třeba provádět nalačno!
- Krev nesmí být odebrána do heparinu!

3.5.1.3 Krevní skvrna – vyšetření DNA

Tento odběr je možné využít u pacientů s komplikovaným odběrem periferní krve pro vyšetření vrozených genetických variant a predispozic. Tento odběr NENÍ VHODNÝ pro somatické varianty a vyšetření dědičných nádorových onemocnění.

- Odběr tří kapek krve (jedna kapka na terčík) na dodanou kartu pro odběr suchých kapek krve (odběr provádíme opatrně, oblasti terčíků se nedotýkáme holýma rukama z důvodu možné kontaminace; používejte vyšetřovací rukavice).
- Lancetou či injekční jehlou propíchnout kůži na patičce dítěte (u větších dětí můžeme krev odebrat i z prstu). V momentě, kdy se zformuje kapka krve, přiložíme

odběrovou kartu a na jeden terčík tuto krev otiskneme. Toto opakujeme, dokud nemáme odebrány alespoň tři terčíky. Formaci dostatečně velké kapky krve, případně dalších kapek, můžeme podpořit mírným tlakem v okolí vpichu. Po odběru alespoň tři terčíků necháme krev vsáknout do filtračního papíru (stačí 10-20 sekund). Složíme odběrovou kartu, popíšeme jménem a rodným číslem pacienta, vyplníme žádanku, informovaný souhlas (ten si lékař zakládá do zdravotnické dokumentace pacienta) a zašleme svozem či poštou do laboratoře.

- **Stabilita vyšetření:** Odebrané krevní skvrny jsou stabilní při pokojové teplotě po dobu min. 14 dnů. Skladovat v suchu, nevystavovat vysokým teplotám, slunečnímu záření a UV záření.

3.5.1.4 Stěr z bukální sliznice – vyšetření DNA

Tento odběr je možné využít u pacientů s komplikovaným odběrem periferní krve pro vyšetření vrozených genetických variant a predispozic. Dále je tento typ odběru preferován pro identifikaci osob a určení příbuzenských vztahů (např. testy otcovství). Tento odběr NENÍ VHODNÝ pro somatické varianty, KREC/TREC – vyšetření primárních imunodeficiencí SCID a XLA a vyšetření dědičných nádorových onemocnění.

- Nejméně 60 minut před odběrem nejezte, nepijte nic mimo neslazené nesycené vody, nežvýkejte ani neprovádějte ústní hygienu.
 - Před manipulací se stěrovou sadou si umyjte ruce, použijte vyšetřovací rukavice.
 - Vyjměte zkumavku z uzavíratelného sáčku, popište ji identifikátory pacienta. **Při odběru více osob dbejte zvýšené opatrnosti, aby dané osoby byly odebrány do správné zkumavky.**
 - Vyjměte stěrovou tyčinku ze zkumavky (tyčinku držte pouze za koncovou, nesterilní část). **Během celého procesu odebírání vzorku dbejte vždy 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 vložte do úst a důkladně otírejte bukální sliznici dutiny ústní (tzn. vnitřní strany tváří) a záhybů mezi dásněmi pohybem dopředu a dozadu (jako při čištění zubů) a zároveň tyčinkou otáčejte, 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 30-60 sekund. Pokud se Vám v průběhu stěru tvoří sliny, polkněte je (setřít sliny tamponem je nežádoucí!).
 - Po odběru vložte tampón zpět do původního obalu (zkumavky). Dbejte, aby byla zkumavka těsně uzavřena víčkem, jehož součástí je odběrová tyčinka.
 - Před odesláním zkumavky vždy uchovávejte při pokojové teplotě, nemrazte je, ani nevkládejte do lednice.
- DNA rozpuštěnou např. v TE pufru nebo ve sterilní H₂O. DNA izolovaná z různých materiálů může být skladována krátkodobě při 4–8 °C a dlouhodobě při minimálně -18 °C. Vzorky musí být dopravovány v chlazené nádobě a oddělené od příslušných

žádanek. Na každém vzorku musí být uvedeno celé jméno pacienta a rodné číslo. Všechny údaje uvedené na vzorku musí být shodné s údaji uvedenými na žadance!

3.5.2 Forenzní DNA diagnostika

Pro testování otcovství a příbuzenských vztahů je možné odebrat vzorek buněk sliznice dutiny ústní od domnělého otce, dítěte (dětí) a matky (není podmínkou). **Nepřijímáme vzorky, u kterých lze předpokládat, že byly odebrány bez vědomí dospělé, svéprávné osoby nebo bez souhlasu zákonného zástupce.**

3.5.3 Bezpečnostní aspekty

Každý vzorek biologického materiálu je považován za potenciálně infekční, proto je nutné zamezit možnému kontaktu pacientů i veřejnosti s biologickým materiálem po odběru. Svoz vzorků je zajišťován v uzavřených chladicích boxech tak, aby během transportu nedošlo k jeho rozlítí nebo jinému znehodnocení, nedošlo ke kontaminaci osob nebo dopravních prostředků použitých k přepravě. V případě rozlítí je třeba se řídit platnými zásadami dezinfekce a dekontaminace.

3.6 Doprava vzorků

Transport biologického materiálu

Svoz biologického materiálu je zajišťován oddělením logistiky společnosti Unilabs Diagnostics k. s.

V ordinaci lékaře či na jiném místě, vždy ale s ohledem na dodržení pravidel GDPR, řidič načte čárový kód na žadance pomocí přenosné čtečky. Tím dojde k zaevidování vzorku a propojení se záznamem transportní teploty v transportním boxu. Při příjezdu do místa vykládky biologického materiálu řidič načte RFID kód příslušného místa a ukončí tak sledování vzorku. Primární vzorky jsou transportovány do laboratoře v plastových stojáncích, či přepravech ve svislé poloze, a to z důvodu eliminace znehodnocení primárních vzorků. Ojedinele jsou vzorky transportovány ve dvoukomorových sáčcích, kde je oddělena žádanka od primárního vzorku z důvodu prevence kontaminace žádanky. Samotné žádanky jsou transportovány odděleně od primárních vzorků v neprůhledných plastových a omyvatelných deskách.

Biologický materiál je transportován ve dvou zónových transportních boxech umístěných do vestavby vozidla. Box aktivně řídí teplotu v obou teplotních zónách, a to 15-25 °C a 2-8 °C. Po vyložení vzorku v laboratoři jsou informace o teplotě transportu dostupné VŠ pracovníkům laboratoře v LIS přímo na žadance pro daná vyšetření. Data o teplotách jsou pravidelně přenášena a zálohována.

V případě, že není vozidlo vybaveno aktivním boxem, je vzorek převážen v pasivním transportním boxu s manuální regulací teploty pomocí chladicích vložek nebo termoforu. Transportní teplota je po příchodu do laboratoře zaznamenána pracovníkem laboratoře nebo logistiky do příslušného formuláře.

Konkrétní požadavky na teplotu transportu naleznete v kapitole [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Vzorky se speciálními požadavky na transport (např. led, suchý led aj.) jsou transportovány dle doporučení.

Druh vzorku	Stabilita vzorku 15-25 °C	Stabilita vzorku 2-8 °C	Stabilita vzorku -20 °C
nesrážlivá periferní krev (K3EDTA nebo citrát sodný) - vyšetření DNA	7 dnů	1 měsíc	možno déle
DNA rozpuštěná např. v TE pufru nebo ve sterilní H ₂ O.	7 dnů	1 měsíc	možno déle
kapka zaschlé periferní krve na Guthrieho kartě nebo jiném vhodném nosiči – pouze vyšetření DNA	stabilní	-	-
nesrážlivá periferní krev (K3EDTA) - vyšetření RNA	nestabilní!	3 dny	nemrazit!
nesrážlivá periferní krev odběr do Tempus odběrové zkumavky se stabilizačním médiem – pouze vyšetření RNA	5 dnů	možno déle	nemrazit!
bukální stěr/výtěr – pouze vyšetření DNA	14 dnů	možno déle	-

4. Preanalytická fáze v laboratoři

4.1 Příjem žádank a vzorků

Biologický materiál je přijímán během celé provozní doby.

Aktuální žádanky:

Aktuální verze žádanky je k dispozici na webových stránkách: <http://www.unilabs.cz>

Pracovník na příjmu provede:

- přiřazení biologického materiálu k žadance dle identifikačních údajů: jméno a příjmení pacienta a rodné číslo, případně rok narození a kontrolu materiálu.
- kontrolu žádanky – **identifikace pacienta**
 - jméno a příjmení pacienta
 - rodné číslo, případně rok narození

- pohlaví pacienta
- zdravotní pojišťovnu pacienta
- základní diagnózu

- identifikace odesílajícího subjektu

- jméno lékaře (žadatele o vyšetření), adresa ambulance
- identifikační číslo zařízení
- odbornost indikujícího lékaře
- razítko a podpis lékaře
- telefon nebo jiný kontakt pro sdělení výsledku

- identifikace materiálu

- datum odběru primárního vzorku
- druh primárního vzorku
- soupis požadovaného vyšetření

- kontrolu vstupních atributů

- neporušenost obalu
- správnost odběru – protisrážlivé činidlo, zkumavka
- množství

Na potvrzení shody s požadavky přidělí pracovník laboratoře vzorku identifikační číslo a zapíše ho elektronickým způsobem do Laboratorního informačního systému. Současně vzorek označí přiděleným identifikačním číslem, které rovněž poznamená na žadance včetně data a času příjmu vzorku a podpisu pracovníka laboratoře, jež vzorek přijímá. Kritéria pro odmítnutí primárních vzorků

- nedostatečná identifikace vzorku se žádankou z hlediska nezaměnitelnosti
- neoznačenou nádobu s biologickým materiálem – laboratoř takovýto vzorek přijme pouze v případě, že se jedná o nenahraditelný vzorek. Za takovýto vzorek musí převzít písemně odpovědnost požadující lékař. Pokud tak neučiní, nebude uvolněn výsledek.
- nesprávný odběr

4.2 Vyšetřování ve smluvních laboratořích

Laboratoř smluvní laboratoře nevyužívá.

5. Postanalytická fáze – Vydávání výsledků a komunikace s laboratoří

5.1 Typy vydávání výsledkových zpráv

Laboratoř vydává výsledkové zprávy v tištěné formě.

Před vydáním výsledkové zprávy jsou výsledky zkontrolovány a uvolněny oprávněnou osobou včetně její autorizace kvalifikovanou osobou. Výsledkové zprávy jsou vydávány ve formátu pdf.

Výsledkové zprávy musí vždy obsahovat:

- jasnou identifikaci laboratoře, která výsledek vydala
- identifikaci vyšetření
- identifikaci pacienta (jméno a příjmení, rodné číslo nebo rok narození)
- identifikaci žadatele (jméno, adresa, IČP)
- datum a čas odběru primárního vzorku
- datum a čas příjmu vzorků
- diagnózu pacienta
- výsledek vyšetření
- druh biologického materiálu
- slovní vyjádření
- datum a čas vydání výsledkové zprávy
- identifikace pracovníka uvolňujícího výsledkovou zprávu

* na výsledkové zprávě označuje vyšetření v rozsahu akreditace.

Vydávání výsledků přímo pacientům

Samoplátcům se vydávají tištěné výsledky po předložení průkazu totožnosti, nebo jsou zasílané poštou, případně šifrovaným e-mailem. Heslo pro zobrazení výsledkové zprávy je generováno pracovníkem laboratoře. Způsob generování hesla je dostupný u vedoucího laboratoře. V případě poskytnutí e-mailové adresy i mobilního telefonního čísla je využit automatický systém, kdy je na e-mailovou adresu odeslán odkaz na vyzvednutí výsledku a SMS zprávou heslo pro jeho vyzvednutí.

V případě forenzní DNA diagnostiky je zadavateli výsledek zaslán doporučeně poštou nebo si jej může osobně převzít.

Opakovaná a dodatečná vyšetření

Viz kapitola [3.3 Ústní dodatečné požadavky na vyšetření](#).

5.2 Změny výsledků a nálezů

U vydaných výsledkových zpráv se provádějí opravy:

- v identifikační části
- ve výsledkové části

Oprava identifikační části

Opravou v identifikační části výsledkových zpráv je myšlena oprava rodného čísla, příjmení, pojišťovny po odeslání výsledků zadavateli. V laboratoři je dohledatelná původní chybně odeslaná výsledková zpráva a opravená výsledková zpráva.

Oprava v nálezové části

V případě opravy komentáře nebo hodnoty vydaného výsledku se vydává tzv. revidovaný výsledek k původnímu výsledku, včetně uvedení změny a podpisu osoby odpovědně za změnu. V laboratoři je dohledatelná původní chybně odeslaná výsledková zpráva a opravená výsledková zpráva.

Opis výsledkové zprávy

V případě požadavku na vyšetření, které již bylo pacientovi v naší laboratoři v minulosti provedeno na germinálním genomu, se převezme výsledek z databáze a neúčtuje se vyšetření. Je vydán opis původní výsledkové zprávy a do komentáře je vložen text: TOTO JE OPIS VÝSLEDKOVÉHO PROTOKOLU. PACIENT(KA) JIŽ BYL(A) VYŠETŘEN(A) NA TOTO GENETICKÉ VYŠETŘENÍ V NAŠÍ LABORATOŘI DŘÍVE. VÝSLEDEK TESTOVANÍ ZÁRODEČNÉHO GENOMU SE V PRŮBĚHU ŽIVOTA NEMĚNÍ.

5.3 Doby odezvy jednotlivých vyšetření

Doba odezvy je stanovena jako doba nezbytná od příjmu vzorku po vydání výsledkové zprávy, kterou naše laboratoř deklaruje zákazníkovi.

Jednotlivé doby odezvy jsou uvedeny v kapitole [6. Seznam jednotlivých vyšetření](#)

5.4 Konzultační činnost

Konzultační činnost laboratoře je poskytována zadavateli vyšetření k výsledkům vyšetření odbornými pracovníky laboratoře.

5.5 Stížnosti

V případě oficiální písemné stížnosti případného stěžovatele vedení laboratoře do 30 dnů po převzetí prošetří stížnost a vyjádří se formou písemného záznamu, který může být případně stěžovateli předán na osobní schůzce.

V případě drobných stížností, např. telefonických, je stížnost interně zaznamenána a řešena vedoucím pracoviště. Odstranění stížnosti je interně zaznamenáno.

Stížnosti lze podávat na:

- průběh laboratorního vyšetření
- rozsah laboratorního vyšetření
- termín provedení laboratorního vyšetření
- výsledky laboratorního vyšetření
- způsob jednání pracovníků laboratoře

5.6 Skladování vzorků a jejich likvidace

Primární vzorky se uchovávají v mrazáku min. 1 měsíc, izolovaná DNA v ledničce do konečného zpracování (max. 1 měsíc), následně v mrazáku, a to podle velikosti skladovacích prostor laboratoře. Likvidace biologického materiálu, o níž se učiní záznam do formuláře F_LBR_GEN_057 „Likvidace biologického materiálu“, se provádí dle Provozního řádu laboratoře.

V případě, že pacient nedá souhlas (uvedený na žádance) s uložením vzorku pro další analýzu, nebo s anonymním využitím DNA k lékařskému výzkumu, je vzorek zlikvidován do 4 měsíců po posledním vyšetření.

6. Seznam jednotlivých vyšetření

[α-1 antitrypsin \(varianty PI*S = E288V a PI*Z = E366K v genu SERPINA1\)](#)

Alfa-1 antitrypsin patří mezi inhibitory serinových proteáz (SERPINA = serine protease inhibitors) a jeho funkcí je regulace neutrofilní elastázy v plicích. Varianty v genu pro α-1 antitrypsin způsobují změnu ve struktuře výsledného proteinu, který není schopen vykonávat svou funkci. Deficit α-1 antitrypsinu je má za následek vážné onemocnění plic, chronickou obstrukční plicní nemoc (CHOPN). Kouření, pobyt v prašném prostředí či opakované infekce dýchacích cest jsou poté rizikovými faktory ovlivňující nástup příznaků tohoto onemocnění. Deficit α-1 antitrypsinu se projevuje také onemocněními jater, jako je hepatitida či cirhóza jater. Může docházet až k orgánovému selhání s nutností transplantace jak u dětí, tak dospělých.

Nejčastější varianty způsobující deficit α-1 antitrypsinu jsou PI*S a PI*Z. Varianta PI*S je charakterizována záměnou E288V a způsobuje mírné snížení hladiny proteinu. Varianta PI*Z je charakterizována záměnou E366K a způsobuje významné snížení množství α-1 antitrypsinu v krevním séru. Frekvence varianta PI*S je v Evropě okolo 3,5 %, přičemž vyšší výskyt je v jižní Evropě (9-11 %). Méně častá varianta PI*Z má výskyt okolo 1 %, přičemž vyšší výskyt je v severní Evropě (2-4 %)

Referenční hodnoty:

Negat. - negativní = nemutovaný homozygot = *wild type* = wt / wt;

Heteroz. – heterozygot = wt / mut;

Homozyg. - mutovaný homozygot = mut / mut;

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x týdně

Doba odezvy: 7 pracovních dnů

β -fibrinogen (-455G>A) – zvýšené riziko infarktu myokardu a ischemické mozkové příhody

Fibrinogen, koagulační faktor I, je 340 kDa velký rozpustný glykoprotein, který se běžně vyskytuje v krevní plazmě a v granulích krevních destiček. Patří mezi klíčové proteiny hemokoagulace, účastní se agregace destiček a ovlivňuje viskozitu plazmy. Jednotlivé řetězce fibrinogenu α , β , a γ jsou kódovány třemi různými geny na 4. chromozómu v oblasti q28. Experimentální studie prokázaly, že substituce nukleotidů G za A v pozici -455 v promotorové oblasti má významný efekt na jeho transkripci. Přítomnost A-alely (v populaci rozšířená přibližně ve 20 %) je spojena s výrazně zvýšenou promotorovou aktivitou genu a tím se zvýšenou hladinou fibrinogenu v plazmě. Polymorfismus -455 G>A je tedy významný ve vztahu k hladině fibrinogenu u osob s koronární nemocí i u pacientů po revaskularizaci bypassem. Nebyl však prokázán přímý vztah polymorfizmu ke koronární nemoci a infarktu myokardu. Je obecně přijímanou skutečností, že zvýšení koncentrace fibrinogenu je ve vztahu k tíži postižení koronárního řečiště, vztah mezi polymorfizmem a nemocí však zatím prokázán nebyl.

Referenční hodnoty:

Negat. - negativní = nemutovaný homozygot = *wild type* = wt / wt

Heteroz. – heterozygot = wt / mut;

Homozyg. - mutovaný homozygot = mut / mut;

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x týdně

Doba odezvy: 10 pracovních dnů

ACE (Ins/Del) – predispozice k hypertenzi

Angiotenzin konvertující enzym (ACE) je karboxyl-terminální dipeptidyl-exopeptidáza obsahující Zn, která hraje důležitou roli v regulaci krevního tlaku jako součást reninangiotenzinového systému (RAS). Umožňuje konverzi angiotenzinu I na vazokonstrikční aldosteron stimulující peptid angiotenzin II (ATII). ACE odstraňuje z dekaeptidu angiotensinu I dvě karboxy-terminální aminokyseliny a tvoří oktapeptid AT II, který bývá označován jako prozánětlivý, protože zvyšuje hladinu prozánětlivých cytokinů. Angiotenzin II se podílí na vazokonstrikci a působí při vzniku a rozvoji aterosklerózy, chronického srdečního selhání, cévní mozkové příhody, schizofrenie, demence, Alzheimerovy choroby a dalších akutních nebo chronických zánětlivých onemocnění. ACE je přítomný na endoteliálních buňkách v mnoha tkáních (například děloha, placenta, srdce, mozek, ledviny, leukocyty, alveolární makrofágy, periferní monocyty, neurony). Gen tvoří 26 exonů, je lokalizovaný na chromozomu 17q23, a obsahuje inzerčně(I)/deleční(D) polymorfismus v intronu 16 charakterizovaný přítomností nebo absencí 287 bp dlouhé Alu repetitivní sekvence. Mechanismus účinku inzerčně delečního polymorfismu není přesně znám. Přítomnost alely D je spojována se zvýšenou aktivitou enzymu a vyššími hladinami ACE v plazmě.

Referenční hodnoty:

Negat. - negativní = nemutovaný homozygot = *wild type* =Ins/Ins;

Heteroz. – heterozygot = Ins/Del;

Homozyg. - mutovaný homozygot = Del/Del;

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x týdně

Doba odezvy: 10 pracovních dnů

Alfa-talasémie - detekce 21 patogenních variant v genech *HBA1* a *HBA2*

Alfa-talasémie je forma talasémie, která zahrnuje geny *HBA1* a *HBA2*. Talasémie je skupina dědičných onemocnění, které mají za následek narušenou produkci hemoglobinu. Normální hemoglobin se skládá ze dvou alfa řetězců a dvou beta řetězců. U alfa-talasémie dochází ke kvantitativnímu snížení množství alfa řetězců, což má za následek tvorbu menšího množství normálních molekul hemoglobinu a k tvorbě nestabilních molekul beta globinu, které způsobují zvýšenou destrukci červených krvinek. Stupeň poškození a vážnost onemocnění přitom závisí na počtu postižených alel *HBA* genů.

Symptomy onemocnění:

-běžné:

- Anémie: U lidí s alfa-talasémií dochází ke snížení produkce červených krvinek a ke zvýšení destrukce červených krvinek, což vede k dalším příznakům, jako je únava a závratě.
- Zvětšená slezina
- Žlučové kameny
- Zpožděný růst

-vzácné:

- Žloutenka
- Výrazné čelo: K tomu dochází v důsledku zvětšení objemu kostní dřevě v čelní kosti lebeční, která tvoří větší počet červených krvinek ke kompenzaci anémie. [8]
- Extramedulární hematopoéza (tvorba krve mimo kostní dřevě)
- Hypertenze (v těhotenství)

Snížená produkce alfa-globinových řetězců vede k nadbytku β řetězců u dospělých a přebytku γ řetězců u novorozenců. Přebytek β řetězců tvoří nestabilní tetramery nazývané hemoglobin H nebo Hb H, který tvoří čtyři beta řetězce. Přebytek γ řetězců tvoří tetramery, které mají příliš velkou afinitu ke kyslíku a ten tak není v perifériích uvolňován do tkání. Homozygotní α^0 talasémie, kde se vyskytuje jen hemoglobin tvořený γ_4 řetězci (označováno jako Hb Barts), často končí smrtí brzy po narození.

V diagnostice alfa-talasémie se uplatňuje především genetické vyšetření. Toto onemocnění totiž může být zaměněno za anémii způsobenou nedostatkem železa, protože oba stavy mají za následek mikrocytární anémii. Genetické vyšetření také odhalí případné nositele postižených alel α -globinových genů, kteří na sobě nepozorují příznaky nebo jsou jejich příznaky mírné (delece nebo varianty pouze v jednom nebo dvou alfa-globinových genech). Tato diagnostika

má přitom význam především do budoucí generace s ohledem na možnost narození dítěte postiženého touto nemocí závažněji.

Typy α -talasémie:

Pro α -globin existují dva geny (HBA1 a HBA2), každý člověk tak má ve svém genomu čtyři kopie (alely) genu pro α -globin. Dvě alely jsou mateřského a dvě otcovského původu. Závažnost α -talasémie koreluje s počtem postižených alel α -globinu: čím víc postižených alel, tím závažnější budou projevy nemoci.

Počet postižených alel	Popis	Genotyp
1	Tzv. tichá alfa-talasémie má na syntézu hemoglobinu minimální dopad. Tři funkční alely α -globinu jsou dostatečné pro normální produkci hemoglobinu. Jediným projevem je mikrocytóza (malé erytrocyty). Takto může být vadný gen nepozorovaně předán do další generace. Často jsou lidé s tichým nosičstvím odhaleni až poté, co se jim narodí dítě s talasémií. Jedinou možností diagnostiky je v tomto případě genetické vyšetření DNA.	- α/α
2	Alfa-talasémie minor – 2 postižené alely způsobují lehkou chronickou mikrocytární (malý MCV – střední objem erytrocytu), hypochromní (snížené množství krevního barviva v červené krvi) anémii. Anémie je většinou bezpříznaková. Nemoc v této formě může být zaměněna za anémii způsobenou nedostatkem železa, avšak nereaguje na substituční terapii železem.	- $-\alpha/\alpha$ nebo $-\alpha/-\alpha$

3	<p>Tento stav se nazývá onemocnění hemoglobinu H. V tomto případě je již produkce α-globinových řetězců natolik redukována, že dochází k výraznému přebytku β řetězců. β řetězce se shlukují do tetramerů, tzv. hemoglobinu H, který je viditelný uvnitř červených krvinek při vyšetření nátěru periferní krve. Choroba Hb H se projevuje středně těžkou až těžkou anémií, ale může způsobit vážné zdravotní problémy jako je splenomegalie (zvětšení sleziny) a deformity kostí. Klinický obraz je extrémně různorodý. Někteří pacienti nemají žádné příznaky, jiní mají těžkou anémií, zvětšení jater, sleziny a žloutenku a potřebují pravidelnou lékařskou péči.</p>	- -/ - α
4	<p>Alfa-talasémie major (také nazývána choroba hemoglobinu Barts nebo Hydrops fetalis). Jedná se o nejzávažnější variantu alfa-talasémie. Nejsou produkovány žádné alfa řetězce, a proto nemůže vzniknout HbA ani fetální HbF. Plod se stává anemickým již v časně fázi těhotenství, dochází k rozvoji zvětšení srdce a jater a celkovému hydropsu. Diagnóza je často stanovena pozdě, až v posledních měsících těhotenství, na základě nálezu hydropsu plodu při ultrazvukovém vyšetření. Asi v 80% případů má matka zároveň toxémii a může se u ní vyvinout i těžké poporodní krvácení. Plody postižené alfa-talasémií major jsou obvykle potraceny nebo umírají krátce po porodu. Ve velmi raritních případech tyto děti přežily po podání nitroděložních transfúzí a po narození jsou léčeny pomocí transplantace kostní dřeně a pokračující chronické transfuze.</p>	- -/ - -

" α " označuje funkční alfa řetězec; "-" patologický.

Referenční hodnoty:

Viz tabulka výše.

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x 2 týdny

Doba odezvy: 20 pracovních dnů

Androgenní alopecie - vyšetření 5 predispozičních variant v genech *EDA2R* a *AR*

Androgenní alopecie (AGA) je nejběžnější typ plešatosti charakterizovaný typickým progresivním vzorcem vlasové ztráty. Podíl postižených mužů se zvyšuje s věkem, existují odlišnosti v závislosti na etnické příslušnosti, a ačkoliv je to biologicky benigní onemocnění může mít AGA vliv na psychický a sociální stav postiženého jedince a významně ovlivňovat jeho kvalitu života. Etiologie AGA byla poprvé popsána Hamiltonem na základě genetické predispozice a hormonální nedostatečnosti.

AGA je polygenně dědičné X-vázané onemocnění. Bylo popsáno několik genetických faktorů jako je androgenní receptor (AR), ektodysplazinový receptor A2 (EDA2R) a oblast 20p11, které jsou s ním asociovány. Androgeny jsou nejdůležitějšími regulátory vlasového růstu, stimulují i brání růstu vlasu, a to v závislosti na části lidského těla. Paradoxně mohou zvětšovat vlasový folikul v androgen-dependentních oblastech, zatímco v oblasti skalpu mohou u suspektních jedinců růst vlasu zpomalovat a vlas miniaturizovat, což vede v závěru k jeho ztrátě.

Léčba je v současné době možná farmakologická (minoxidil, finasterid – spojeno ale s řadou vedlejších účinků), chirurgická a kosmetická.

Polymorfismy asociované se ztrátou vlasů jsou:

rs1385699 (*EDA2R*, NM_021783.5, c.170G>A),

rs6152 (*AR*, NM_001348061.1, c.639G>A),

rs6625163 (chromozom X),

rs1160312 a rs2180439 (chromozom 20).

Referenční hodnoty:

Negat. - negativní = nemutovaný homozygot = *wild type* = *wt / wt*;

Heteroz. – heterozygot = *wt / mut*;

Homozyg. - mutovaný homozygot = *mut / mut*;

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x týdně

Doba odezvy: 20 pracovních dnů

ApoB (R3500Q) – familiární hypercholesterolemie a zvýšené riziko aterosklerózy

Familiární defekt apolipoproteinu B-100 (FDB) je autozomálně kodominantní onemocnění, spojené s hypercholesterolemií a zvýšeným rizikem onemocnění koronárních arterií. Příčinou je defekt ligandu pro LDL receptor – apolipoproteinu B100. V genu *ApoB* (lokalizace 2p24) se zjistila řada variant, které mění konfiguraci ApoB-100, a tak znemožní jeho vazbu na LDL receptor. Z nichž nejrozšířenější a nejlépe prostudovaná je varianta R3500Q. V typické heterozygotní formě jsou v krvi pacienta přítomny 2 subpopulace LDL částic: jedna s funkčním ApoB100, druhá s vadným. Částice LDL s vadným ApoB-100 nejsou dostatečně rychle odstraňovány z krve a tím se enormně zvyšuje hladina LDL cholesterolu. Frekvence heterozygotů je 1:500, frekvence mutovaných homozygotů 1:1 000 000. Koncentrace cholesterolu u heterozygotů se pohybuje 8-12 mmol/l, u homozygotů je větší než 15 mmol/l.

Referenční hodnoty:

Negat. - negativní = nemutovaný homozygot = *wild type* = *wt / wt*;

Heteroz. – heterozygot = *wt / mut*;

Homozyg. - mutovaný homozygot = *mut / mut*;

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x týdně

Doba odezvy: 10 pracovních dnů

ApoE (E2, E3, E4) – zvýšené riziko Alzheimerovy choroby a časného infarktu myokardu

Apolipoprotein E je z převážné většiny syntetizován parenchymatickými buňkami v játrech a je rovněž hlavním apolipoproteinem chylomikronů. ApoE je součástí VLDL, jehož hlavní funkcí je odstraňování přebytečného cholesterolu z krve a jeho transport do jater k dalšímu zpracování, a proto se významnou měrou podílí na zajištění normální hladiny cholesterolu (a tudíž prevenci kardiovaskulárních onemocnění). Byly identifikovány tři běžně se vyskytující alely genu pro *ApoE* (E2-E2, E3-E3, E4-E4) kódující tři izoformy lipoproteinu (ApoE2, ApoE3, ApoE4). Nejběžnější alela E3 je charakteristická cysteinem na místě 112 a argininem na místě 158 v AMK řetězci. Alela E2 má na místě 158 cystein a alela E3 má na místě 112 arginin vzhledem k alele E3. Varianta ApoE2 vykazuje méně než 2% normální vazebné aktivity k receptoru (vzhledem k variantám ApoE3 a ApoE4), což vede ke zvýšené hladině lipidů, případně lipoproteinů v krevní plazmě. Homozygot E2/E2 je tak vystaven vyššímu riziku výskytu hyperlipoproteinémie typu III (familiární dysbetalipoproteinémie). Naopak izoforma ApoE4 v heterozygotní, ale hlavně homozygotní konstituci, je predikujícím faktorem pro aterosklerózu díky zvýšené hladině celkového cholesterolu a současně pro vývoj Alzheimerovy choroby. Navíc alela E4 byla shledána jako významný a nezávislý (na věku, pohlaví a aterosklerotickém onemocnění) prediktivní faktor pro vývoj aortální stenózy.

Referenční hodnoty:

Genotyp pacienta: E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4, E4/E4

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x týdně

Doba odezvy: 10 pracovních dnů

Astma - varianty R16G a Q27E genu *ADRB2*

Na základě několika populačních studií byla varianta G16R (Gly16Arg) v genu *ADRB2* (genu pro adrenergní beta-2-povrchový receptor) asociována nokturnálním astmatem, s těžko léčitelným astmatem, urychleným poklesem plicních funkcí a vyšší prevalencí hyperreakivity dýchacích cest.

Varianta G16 (Gly16) je asociována s predispozicí k nokturnálnímu astmatu. Tato varianta totiž zvyšuje negativní regulaci adrenergního receptoru jeho antagonisty v porovnání s variantou R16 (Arg16). Pokud je spolu s variantou R16 (Arg16) nalezena varianta Q27 (Glu27; lokus Q27E), je výsledný receptor k negativní regulaci rezistentní, na rozdíl od varianty E27 (Gln27).

U pacientů s astmatem je záměna nukleotidů c.46G>A (alela R16 = Arg16) obecně spojována s horším průběhem onemocnění, především u pacientů, kteří denně nebo častěji inhalují léčiva na bázi krátkodobě i dlouhodobě působících beta(2)-receptor antagonistů. Použití těchto léčiv (albuterolu nebo salmeterolu) může být u mladších nositelů jedné nebo dvou těchto alel spíše kontra-produktivní.

Referenční hodnoty:

- určení genotypu pacienta:
 - lokus R16G: G/G, G/R, R/R
 - lokus Q27E: Q/Q, Q/E, E/E

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x za týden

Doba odezvy: 10 pracovních dnů

Autozánětlivá onemocnění (analýza celých genů, jejich kódujících oblastí a míst sestřihu: ACP5, ADA2, ADAM17, ADAR, CARD14, COPA, ELANE, HOIL1, IFIH1, IL1RN, IL10, IL10RA, IL10RB, IL36RN, LPIN2, MEFV, MVK, NLRC4, NLRP1, NLRP3, NLRP12, NOD2, OTULIN, PLCG2, PSMB8, PSTPIP1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, SAMHD1, SH3BP2, SLC29A3, TMEM173, TNFAIP3, TNFRSF1A, TREX1)

Autozánětlivá neboli autoinflamatorní onemocnění (autoinflammatory diseases, AID) představují skupinu vzácných zánětlivých nemocí, způsobených dysregulací mechanismů vrozené (nespecifické) imunity. Jedná se o heterogenní skupinu převážně monogenních onemocnění, při nich dochází ke spontánním periodicky se vyskytujícím zánětlivým projevům bez zjevné vnější příčiny. Často lze sledovat familiární výskyt onemocnění. Typickými příznaky jsou horečka, únava, bolesti kloubů a kožní projevy. Nejdéle známou skupinou AID jsou syndromy periodické horečky, kam řadíme familiární středomořskou horečku (FMF), deficit mevalonátkinázy (MKD), periodický syndrom asociovaný s receptorem pro tumor nekrotizující faktor (TRAPS), periodické horečky asociované s kryopyrinem (CAPS) a periodickou horečku s afty, faryngitidou a krční adenitidou (PFAPA). Většina těchto onemocnění se projevuje již v dětském věku a dlouhodobě nedostatečně léčené onemocnění je spojeno s rizikem rozvoje sekundární amyloidózy.

Nejčastější autozánětlivá onemocnění, které jsou v rámci této analýzy vyšetřovány:

Familiární středomořská horečka (FMF) - OMIM: 249100 (AR), gen *MEFV*

Deficit mevalonátkinázy

Mevalonová acidurie (MKD) - OMIM: 610377 (AR), gen *MVK*

Syndrom hyper-IgD (HIDS) - OMIM: 260920 (AR), gen *MVK*

Periodický syndrom asociovaný s receptorem pro tumor-nekrotizující faktor (TRAPS) - OMIM: 142680 (AD), gen *TNFRSF1A*

Periodické syndromy asociované s kryopyrinem (CAPS)

Familiární chladová kopřivka (FCAS) - OMIM: 120100 (AD), gen *NLRP3 (CIAS1)*

Muckle-Wellsův syndrom (MWS) - OMIM: 191900 (AD), gen *NLRP3 (CIAS1)*

Chronický infantilní neurologický kutánní artikulární syndrom (NOMID/CINCA) - OMIM: 607115 (AD), gen *NLRP3 (CIAS1)*

Autoinflamatorní onemocnění s artritidou a dyskeratózou (AIADK) - OMIM: 617388 (AD, AR), gen *NLRP1*

Syndrom NLRP12-vázané hereditární periodické horečky (FCAS2) - OMIM: 611762 (AD), gen *NLRP12*

Autozánětlivý syndrom s periodickými horečkami a infantilní enterokolitidou (AIFEC) - OMIM: 616050 (AD), gen *NLRC4*

Syndrom pyogenní artritidy, pyoderma gangrenosum a akné (PAPA) - OMIM: 604416 (AD), gen *PSTPIP1 (CD2BP1)*

Sarkoidóza (Blauův syndrom) - OMIM: 186580 (AD), gen *NOD2 (CARD15)*

STING-asociovaná vaskulopatie s nástupem v dětství (SAVI) - OMIM: 615934 (AD), gen *STING1 (TMEM173)*

Vaskulopatie typu nodózní polyarteritidy, deficit adenoindeaminázy 2 (DADA2) - OMIM: 615688 (AR), gen *ADA2 (CECR1)*

Spondyloenchondrodysplázie (SPENCD) - OMIM: 607944 (AR), gen *ACP5*

Aicardi-Goutières syndrom

AGS1 - OMIM: 225750 (AD, AR), gen *TREX1*

AGS2 - OMIM: 610181 (AR), gen *RNASEH2B*

AGS3 - OMIM: 610329 (AR), gen *RNASEH2C*

AGS4 - OMIM: 610333 (AR), gen *RNASEH2A*

AGS5 - OMIM: 612952 (AR), gen *SAMHD1*

AGS6 - OMIM: 615010 (AR), gen *ADAR*

AGS7 - OMIM: 615846 (AD), gen *IFIH1*

Deficit antagonistu interleukinu 1 (DIRA) - OMIM: 612852 (AR), gen *IL1RN*

Deficit IL-36 receptor antagonistu (DITRA) - OMIM: 614204 (AR), gen *IL36RN*

Autozomálně recesivní zánětlivá střevní nemoc s časným nástupem (VEO-IBD)

IBD25 - OMIM: 612567 (AR), gen *IL10RB*

IBD28 - OMIM: 613148 (AR), gen *IL10RA*

IBD23 - OMIM: 612381, gen *IL10*

Syndrom zahrnující periodické horečky, panniculitidu a dermatózu s nástupem v kojeneckém věku (AIPDS) - OMIM: 617099 (AR), gen *OTULIN*

Autoinflamace, PLCG2-asociovaný deficit protilátek a imunitní dysregulace (APLAID) - OMIM: 614878 (AD), gen *PLCG2*

Familiární chladová kopřivka s běžnou variabilní imunodeficiencí (PLAID) - OMIM: 614468 (AD), gen *PLCG2*

Chronická atypická neutrofilní dermatóza s lipodystrofií a zvýšenou teplotou (CANDLE) - OMIM: 256040 (AR), gen *PSMB8*

Autoinflamatorní syndrom s pyogenní bakteriální infekcí a amylopektinózou - OMIM: 615895 (AR), gen *HOIL1 (RBCK1)*

Majeedův syndrom (MJDS) - OMIM: 609628 (AR), gen *LPIN2*

Familiární Behcet-like autoinflamatorní syndrom 1 (AIFBL1) - OMIM: 616744 (AD), gen *TNFAIP3*

H syndrom - OMIM: 602782 (AR), gen **SLC29A3**

Cherubismus - OMIM: 118400 (AD), gen **SH3BP2**

Syndrom zahrnující autoimunitní intersticiální plicní chorobu a artritidu - OMIM: 616414 (AD), gen **COPA**

Psoriáza 2 (PSORS2) - OMIM: 602723 (AD), gen **CARD14**

Neonatální zánětlivé onemocnění kůže a střev - OMIM: 614328 (AR), gen **ADAM17**

Cyklické neutropenie - OMIM: 162800 (AD), gen **ELANE**

Při tvorbě knihovny je používáno amplifikační obohacení. Pokud by se zjistila jakákoliv odchylka, např. nedostatečné množství osekvenovaných readů, jejich horší kvalita, nedostatečné pokrytí jednotlivých úseků apod., sekvenační běh se opakuje.

V případě nalezení patologické či suspektně patologické varianty analýzou NGS dat, se její přítomnost potvrzuje Sangerovým sekvenováním.

V rámci hodnocení NGS dat jsou filtry nastaveny tak, aby byly analyzovány pouze výše uvedené geny vyžádané lékařem. Nedochozí tedy k sekundárním/nevyžádaným nálezům.

Referenční hodnoty:

Nalezené varianty řadíme dle účinku do kategorií: patologická, suspektně patologická, varianta nejasného významu, suspektně benigní a varianta benigní. Nalezené varianty jsou detailněji popsány v závěrečné zprávě.

Varianty suspektně benigní nebo benigní vydáváme ke zprávě na vyžádání.

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1 x 45 dnů

Doba odezvy: 45 pracovních dnů

Bechtěrevova nemoc – ankylozující spondylitida (přítomnost alely HLA-B*27)

U řady chorob existuje přímý vztah k určitým HLA-znakům (povrchovým buněčným antigenům). Například antigen HLA-B27 je asociován s revmatickými chorobami, jako jsou ankylozující spondylitida – Bechtěrevova nemoc, uretro-okulo-artikulární syndrom – Reiterova nemoc, artritida u yersiniové infekce apod.

Bechtěrevova nemoc je systémové chronické zánětlivé onemocnění osového skeletu, kloubů a někdy i vnitřních orgánů. Patří do skupiny asociovaných artritid s HLA B27.

Antigen HLA B27 se vyskytuje u 90–95 % pacientů a je tedy jasné, že tento povrchový antigen hraje rozhodující roli v dispozici k tomuto onemocnění.

Bechtěrevova nemoc postihuje ve větší míře muže než ženy. Nejčastěji se onemocnění projeví mezi 15. a 30. rokem života. Onemocnění je neléčitelné, avšak časná diagnostika pomáhá snižovat následky a zlepšovat průběh choroby.

Příčina rozvoje onemocnění není dosud zcela známá. Spouštěcím mechanismem pro to, aby imunitní systém začal ničit vlastní buňky je pravděpodobně napadení organismu bakteriemi, které nesou na svém povrchu antigen podobný HLA-B27. Rizikovými faktory pro nemoc je tedy dědičnost ve spojení s vnějšími faktory (nejspíš infekcí).

Referenční hodnoty:

Negat. - negativní = HLA-B27 neprokázán

Pozit.- pozitivní = HLA-B27 prokázán

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x týdně

Doba odezvy: 7 pracovních dnů

Beta-talasémie - detekce 22 patogenních variant v genu *HBB*

Beta-talasémie jsou skupinou dědičných poruch krvetvorby, které jsou způsobené sníženou nebo chybějící syntézou β řetězců hemoglobinu. To vede k různým klinickým projevům nemoci od těžké anémie po klinicky asymptomatické jedince. Beta-talasémie je výsledkem varianty v genu *HBB* pro β -globinový řetězec, přičemž bylo popsáno více než 250 variant tohoto genu, ale pouze 20 z nich se vyskytuje častěji. Druh varianty určuje stupeň poklesu produkce beta řetězců (pak mluvíme o β^+ talasémii) nebo úplné chybění tvorby beta řetězců (β^0 talasémie) a tím i závažnost anémie.

Lze rozlišit dvě hlavní skupiny variant:

- Nedeletované formy: Tyto defekty obecně zahrnují substituci jedné báze nebo malé inserce v blízkosti genu a v regulačních oblastech před genem pro β -globin. K těmto variantám dochází nejčastěji. Méně často k nemoci přispívají abnormální sestřihové varianty.
- Deleční formy: Delece různých velikostí zahrnující gen pro β -globin mají za následek různé klinické příznaky onemocnění, jako je β^0 nebo dědičné přetrvávání fetálních hemoglobinových syndromů.

Byly popsány tři hlavní formy: beta-talasémie major, beta-talasémie intermedia a beta-talasémie minor.

Název	Popis	Genotyp
Beta-talasémie minor	Jedna kopie (alela) genu <i>HBB</i> je mutovaná. Jedná se o nejčastější formu, která vede jen k mírnému poklesu tvorby beta řetězců. Může být zcela bezpříznaková (talasémie minima), kdy je přítomna pouze mikrocytóza. Případně se může projevit lehká anémie, která nereaguje na substituční terapii železem. Genetické vyšetření je důležité, protože se mutovaný gen může nepozorovaně přenést do další generace.	β^+/β nebo β^0/β
Beta-talasémie intermedia	Postižená osoba má obě alely genu <i>HBB</i> abnormální, ale stále produkuje určité množství beta řetězců. Tíže anémie a zdravotních obtíží závisí na druhu varianty. Na rozdíl od talasémie major se příznaky objevují později a jsou mírnější. Rozdíl mezi talasémií intermedia je dán stupněm anémie, počtem a frekvencí podávaných transfúzí krve. Pacienti s talasémií intermedia potřebují krevní transfuze spíše příležitostně.	β^+/β^+ nebo β^0/β^+

Beta-talasémie major	Také známa jako Cooleyova anémie. Jedná se o nejtěžší formu beta-talasémie. Tito pacienti mají obě alely genu HBB abnormální, což má za následek buď těžký pokles nebo úplné zastavení produkce β -globinových řetězců. Výsledkem je výrazné omezení až úplné znemožnění tvorby HbA. Onemocnění se obvykle projeví u dětí již po 3. měsíci věku, kdy je fyziologicky nahrazována tvorba plodového HbF za HbA. Dochází k rozvoji až život ohrožující anémie, omezení růstu a k rozvoji abnormalit skeletu. Anémie vyžaduje doživotní pravidelné podávání krevních transfuzí a trvalou lékařskou péči. Časté krevní transfuze vedou k rozvoji přetížení organismu nadbytkem železa. Nadbytečné železo se pak ukládá do jater, srdce a jiných orgánů a může způsobit selhání jejich funkce a předčasnou smrt. Pacienti s opakovanými krevními transfuzemi proto mohou potřebovat chelatační léčbu, která omezí nadbytek železa.	β^0/β^0
-----------------------------	--	-------------------

Symptomy onemocnění:

- bolest břicha způsobená hypersplenismem
- infarkt sleziny
- bolest způsobená žlučovými kameny

Vedlejší příznaky onemocnění svědčící o závažnosti onemocnění: bledost, špatný růst, neadekvátní příjem potravy, splenomegalie, žloutenka, maxilární hyperplázie, malokluze zubů, cholelitiáza, systolická ejekční šelest v přítomnosti těžké anémie a patologické fraktury.

V diagnostice beta-talasémie se uplatňuje i genetické vyšetření. Genetické vyšetření také odhalí případné nositele postižených alel β -globinového genu, kteří na sobě nepozorují příznaky nebo jsou jejich příznaky mírné. Tato diagnostika má přitom význam především do budoucí generace s ohledem na možnost narození dítěte postiženého touto nemocí závažněji.

Referenční hodnoty:

Viz tabulka výše.

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x 2 týdny

Doba odezvy: 20 pracovních dnů

Calreticulin – myeloproliferativní neoplasie (nejčastější varianty v exonu 9 genu CALR - del52bp, ins5bp)

Chronické myeloproliferativní poruchy (CMPDs) představují velmi heterogenní skupinu onemocnění myeloidní řady krvetvorných buněk. Při diferenciální diagnostice se uplatní především detekce tří molekulárních změn. Jsou to vyšetření fúzního genu BCR-ABL, genu JAK2 (V617F a varianty v exonu 12) a detekce variant W515K a W515L v genu MPL. BCR-ABL/Ph1 charakterizuje především chronickou myeloidní leukémií (CML) a JAK2 varianta se naopak vyskytuje u BCR-ABL/Ph1 negativních myeloproliferativních chorob, především u Polycytemia vera (PV), esenciální trombocytémie (ET) či idiopatické myelofibrózy (CIMF). Základním rysem MPN je deregulace dráhy JAK/STAT. Kromě variant v genu JAK2 byly objeveny varianty v dalších genech, které se nacházejí u pacientů s JAK2 negativní MPN a ovlivňují epigenetickou kontrolu genové exprese a rovněž sestřih RNA. Mezi ně patří varianty v exonu 10 genu MPL a inzerce/delece v exonu 9 genu pro Calreticulin (CALR). CALR je hlavní chaperonový protein lumen endoplazmatického retikula, který se významně podílí na regulaci signální transdukce. Bylo popsáno mnoho indel variant v exonu 9 tohoto genu, které bývají detekovány u 70 % pacientů s JAK2 – negativní esenciální trombocytémií (ET) a u 60-80 % nemocných s JAK2-negativní primární myelofibrózou (MF). Nejčastěji se vyskytují u pacientů dvě specifické varianty: delece (52bp deletion; c.1092_1143del, p. Leu367Thrf^s*46) a inzerce (5bp insertion; c.1154_1155insTTGTC, p. Lys385Asnf^s*47), které jsme schopni detekovat naší metodikou.

Molekulární testování specifických variant v genech *JAK2*, *CALR* a *MPL* jsou součástí diagnostických kritérií WHO (2017) pro primární myelofibrózu a esenciální trombocytémii.

Referenční hodnoty:

Negativní – v genu *CALR* nebyla detekována žádná z testovaných variant.

Pozitivní – v genu *CALR* byla detekována patogenní varianta; popis nalezené varianty

Analytická senzitivita použitého testu je 1 % mutovaných alel.

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x 20 dnů

Doba odezvy: 20 pracovních dnů

Celiakie – predispozice k abnormální imunitní odpovědi na lepek (DQA1, DQB1, serologické ekvivalenty DQ2 a DQ8)

Celiakální sprue (CS) neboli celiakie je velmi časté chronické gastrointestinální onemocnění s autoimunními rysy. Jeho frekvence se udává zhruba 1 postižený na 200–300 jedinců s tím, že střevní symptomatologie se objevuje jen u 10–20 % postižených. Odhaduje se, že na jednoho diagnostikovaného pacienta připadá 5–7 nediodagnostikovaných. Onemocnění je charakteristické intolerancí organismu ke gliadinovým frakcím pšenice, případně k obdobným proteinům jiných obilnin. Příjem glutenu s potravou má prokazatelné účinky na buněčné struktury sliznice tenkého střeva. Dochází k poškození gastrointestinální mukózní membrány, které posléze vede k reverzibilní atrofii klků tenkého střeva. Expresce tohoto onemocnění je velmi heterogenní, a především zánětlivé změny sliznice tenkého střeva a jejich tíže jsou velmi variabilní. CS je asociována s HLA geny třídy II, které jsou lokalizovány na šestém chromozomu, v oblasti 6p21.3. Za rizikové genotypy jsou považovány DQA1*05:01 spolu s DQB1*02:01, nebo DQA1*05:05 spolu s DQB1*02:02 (95 % postižených) a DQA1*03:01, DQB1*03:02. Podle doby manifestace a klinických projevů rozeznáváme formu klasickou, oligosymptomatickou, tichou a potenciální. Oligosymptomatická forma CS se manifestuje až v pozdějším věku a je charakteristická jak gastrointestinálními, tak extraintestinálními symptomy. Oproti tomu je tichá forma CS bez klinických příznaků. Sérologie a histologie je však pozitivní. K odhalení onemocnění dochází až při komplikacích. V závažnějších případech to mohou být lymfom nebo karcinom trávicího ústrojí (až 15 % pacientů). Výjimkou nejsou také nádory mimo trávicí trakt, například v plicích, močovém ústrojí, pohlavních orgánech či mléčné žláze. O potenciálně formě mluvíme v případě, kdy má pacient pozitivní sérologii, avšak normální histologický nález na sliznici při normální stravě s lepem.

Referenční hodnoty:

Vysoká predispozice k celiakii:

- 1) Přítomnost genotypu DQA1*05/DQB1*02 (sérologický ekvivalent DQ2.5 pozitivní)**

Genotyp pacienta(ky): DQA1*05/DQB1*02 (sérologický ekvivalent DQ2.5 pozitivní).

U PACIENTA(KY) BYLY NALEZENY ALELY DQA1 A DQB1 LOKUSŮ ASOCIOVANÉ S CELIAKIÍ.

Vzhledem ke genetickému riziku predispozice k celiakii doporučujeme vyšetřit i příbuzné prvního stupně (rodiče, děti, sourozence).

Upozornění: Tento výsledek nelze interpretovat jako potvrzení celiakie. Diagnózu je potřeba potvrdit dalšími diagnostickými postupy.

- 2) Přítomnost genotypu DQA1*03/DQB1*03:02 (sérologický ekvivalent DQ8 pozitivní)**

Genotyp pacienta(ky): DQA1*03/DQB1*03:02 (sérologický ekvivalent DQ8 pozitivní).

U PACIENTA(KY) BYLY NALEZENY ALELY DQA1 A DQB1 LOKUSŮ ASOCIOVANÉ S CELIAKIÍ.

Vzhledem ke genetickému riziku predispozice k celiakii doporučujeme vyšetřit i příbuzné prvního stupně (rodiče, děti, sourozence).

Upozornění: Tento výsledek nelze interpretovat jako potvrzení celiakie. Diagnózu je potřeba potvrdit dalšími diagnostickými postupy.

3) Přítomnost genotypu DQA1*02/DQB1*02 (sérologický ekvivalent DQ2.2 pozitivní)

Genotyp pacienta(ky): DQA1*02/DQB1*02 (sérologický ekvivalent DQ2.2 pozitivní).

U PACIENTA(KY) BYLY NALEZENY ALELY DQA1 A DQB1 LOKUSŮ ASOCIOVANÉ S CELIAKIÍ.

Vzhledem ke genetickému riziku predispozice k celiakii doporučujeme vyšetřit i příbuzné prvního stupně (rodiče, děti, sourozence).

Upozornění: Tento výsledek nelze interpretovat jako potvrzení celiakie. Diagnózu je potřeba potvrdit dalšími diagnostickými postupy.

Celiakie vysoce nepravděpodobná (bez predispozice):

HLA GENOTYP NALEZENÝ U PACIENTA(KY) NENÍ ASOCIOVANÝ S RIZIKEM CELIAKIE.

Výsledek s vysokou pravděpodobností diagnózu celiakie vylučuje.

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1-2x týdně

Doba odezvy: 7 pracovních dnů

Crohnova choroba – varianty R702W, G908R, 3020insC v genu NOD2/CARD15

Crohnova choroba se spolu s **ulcerózní kolitidou (UC)** řadí mezi nespecifické střevní záněty (IBD-Inflammatory Bowel Disease). Obě tyto klinické jednotky se vzájemně liší anatomickou lokalizací, intenzitou a rozsahem postižení. Projevy CD mohou být nalezeny v jakékoliv části trávicího traktu, nejčastěji však v oblasti spojení tenkého a tlustého střeva. Pro toto onemocnění je typické, že zánět postihuje střevní stěnu v celé šířce a následně se mohou tvořit stenózy střeva, abscesy a píštěle.

Hlavními symptomy onemocnění jsou bolesti v podbřišku, hubnutí, únava, zvýšená teplota a průjmy, většinou bez krve. CD může mít projevy i mimo trávicí ústrojí, např. kožní vyrážky, kloubní záněty, oční záněty či výskyt aftózní stomatitidy. Přestože příčina CD není přesně známa, všeobecně se usuzuje, že se jedná o nemoc autoimunního charakteru. Náchylnost k onemocnění je dána geneticky. Spouštěcím faktorem u citlivých osob mohou být různé environmentální vlivy. Při rozvoji CD se také uplatňují faktory infekční a následně imunologické. Mnozí pacienti mají příznaky řadu let před stanovením diagnózy.

Nemocí, která vykazuje velmi podobné příznaky jako CD, je UC. Stanovit, o kterou z těchto klinických jednotek se jedná, je poměrně složité, ale velmi důležité vzhledem k odlišnému způsobu léčby každé z nich.

S citlivostí k CD je spojováno několik kandidátních genů. Ty jsou umístěny na různých chromozómech (např. na chromozómu 5p13.1, 6p21). Statisticky nejvýznamnějším z genů se v současnosti jeví *NOD2/CARD15*, nacházející se na chromozómu 16q12.

Tři varianty, které mohou být v uvedeném genu nalezeny (R702W, G908R, 3020insC) představují až 82% variant nalezených u pacientů s CD.

Uvádí se, že relativní riziko rozvoje CD je 2-4x vyšší u přenašečů jedné varianty (heterozygoti) a až 4-35x vyšší u přenašečů dvou variant (homozygoti, složení heterozygoti). V naší laboratoři vyšetřujeme všechny tři uvedené varianty v *NOD2/CARD15* genu.

Referenční hodnoty:

Negat. - negativní = nemutovaný homozygot = *wild type* = *wt / wt*;

Heteroz. – heterozygot = *wt / mut*;

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x týdně

Doba odezvy: 7 pracovních dnů

Cystická fibróza - 68 nejčastějších patogenních variant vč. polyT a polyTG v genu *CFTR*

Cystická fibróza (CF) je jedno z nejčastějších metabolických onemocnění s autozomálně recesivním typem dědičnosti. Jedná se o velmi vážné onemocnění s výskytem 1 postižený na 2500-3000 živě narozených dětí. Přibližně každý třicátý jedinec je nepostiženým přenašečem varianty pro tuto chorobu.

V genomu pacientů postižených CF bylo zaznamenáno více než 2000 variant v genu *CFTR* (cystic fibrosis transmembrane conductance regulátor). Převážná většina z nich se však vyskytuje velmi zřídka. Nejčastější variantou je varianta F508del, která se nachází přibližně u 70% pacientů v evropských populacích a Severní Americe.

CFTR je transmembránový protein, který řídí tok chloridových iontů přes membránu buňky v závislosti na ATP a cAMP. Varianty v *CFTR* genu způsobují, že se membránový kanál stává nepropustným pro chloridové ionty. V důsledku toho se mění složení a fyzikálně – chemické vlastnosti hlenu na povrchu sliznic. Hlenový sekret na povrchu epitelu se zahušťuje, což narušuje normální funkci orgánů a je příčinou většiny klinických příznaků CF.

CF se projevuje opakovanými kombinovanými infekcemi dýchacích cest, chronickým onemocněním plic, pankreatickou exokrinní insuficiencí a zvýšeným obsahem solí v potu.

Před exonem 9 v intronu 8 genu *CFTR* se nalézají dvě polymorfní repetice nukleotidových bází v přímé souslednosti (ve směru 5'-3' transkripce DNA): T(n) a TG(n). Se vzrůstajícím počtem repetice TG(n) a naopak se snižujícím se počtem repetice T(n) se snižuje i podíl správně sestřižených exonů 8 a 9 v průběhu sestřihu mRNA. Transkripty mRNA bez exonu 9 nejsou dále zpracovány v endoplazmatickém retikulu a transportovány dále z jádra k povrchu buňky. Z tohoto důvodu je na povrchu epiteliálních buněk menší množství funkčních proteinů *CFTR*. V případě alely 5T počet TG repetice v pozici *cis* určuje výsledné množství plně funkčních proteinů – chloridových kanálů *CFTR*, které zajišťují normální transport iontů na povrchu epiteliálních buněk. Pokud jejich množství klesne pod kritickou hranici 5-10% normy, dojde k rozvoji patogenetické kaskády vedoucí k rozvoji atypických či dokonce vzácně i typických forem CF. Asociace 5T-12TG nebo 5T-13TG (obojí v pozici *cis*) v homozygotním stavu nebo ve složené heterozygotní podobě s další patogenní variantou v genu *CFTR* v pozici *trans* obvykle vede k rozvoji onemocnění příbuzného CF, jako je např. kongenitální bilaterální absence vas deferens (CBAVD) nebo chronická idiopatická pankreatitida. Kombinace 5T-11TG je velmi nepravděpodobně spojena s rozvojem CF. V případě CBAVD je většina variant 5T asociována v pozici *cis* s TG12/TG13 (v 90% všech případů). Včasná postnatální diagnostika a soustavná racionální léčba velmi zlepšily prognózu CF. Dnes přežívá polovina nemocných 30 let.

Referenční hodnoty:

Negat. - negativní = nemutovaný homozygot = *wild type* = wt / wt; 7T/7T; 9T/9T; 5T (9TG)/5T (9TG); 5T (10TG)/5T (10TG); 5T (11TG)/5T (11TG)

Heteroz. – heterozygot = *wt / mut*; 7T/9T; 5T (9TG)/7T; 5T (10TG)/7T; 5T (11TG)/7T; 5T (12TG)/7T; 5T (13TG)/7T; 5T (9TG)/9T; 5T (10TG)/9T; 5T (11TG)/9T; 5T (12TG)/9T; 5T (13TG)/9T

Homozyg. - mutovaný homozygot = *mut / mut*; 5T (12TG)/5T (12TG), 5T (13TG)/5T (13TG)

Záchytnost použitého kitu je 91,91% variant v *CFTR* genu.

Seznam vyšetřovaných sekvenčních variant v genu *CFTR*:

Název cDNA varianty	Tradiční název	Název cDNA varianty	Tradiční název
c.948delT	1078delT	c.1624G>T	G542X
c.1021_1022dupTC	1154insTC	c.1652G>A	G551D
c.1029delC	1161delC	c.254G>A	G85E
c.1393-1G>A	1525-1G->A	c.1007T>A	I336K
c.1477_1478delCA	1609delCA	c.1519_1521delATC	I507del
c.1545_1546delTA	1677delTA	c.2128A>T	K710X
c.1585-1G>A	1717-1G->A	c.617T>G	L206W
c.1680-886A>G	1811+1.6kbA->G	c.653T>A	L218X
c.1680-1G>A	1812-1G->A	c.3302T>A	M1101K
c.1766+1G>A	1898+1G->A	c.3909C>G	N1303K
c.1766+5G>T	1898+5G->T	c.200C>T	P67L
c.1911delG	2043delG	c.1477C>T	Q493X
c.2012delT	2143delT	c.2668C>T	Q890X
c.2051_2052delAAinsG	2183AA->G	c.3196C>T	R1066C
c.2052delA	2184delA	c.3472C>T	R1158X
c.2052dupA	2184insA	c.3484C>T	R1162X
c.2657+5G>A	2789+5G->A	c.349C>T	R117C
c.2737_2738insG	2869insG	c.350G>A	R117H
c.2988+1G>A	3120+1G->A	c.3848G>A	R1283M

Název cDNA varianty	Tradiční název	Název cDNA varianty	Tradiční název
c.3140-26A>G	3272-26A->G	c.1000C>T	R334W
c.3528delC	3659delC	c.1040G>A	R347H
c.3718-2477C>T	3849+10kbC->T	c.1040G>C	R347P
c.3773dupT	3905insT	c.1657C>T	R553X
c.262_263delTT	394delTT	c.1679G>C	R560T
c.489+1G>T	621+1G->T	c.3752G>A	S1251N
c.489+2T>C	621+2T->C	c.1646G>A	S549N
c.579+1G>T	711+1G->T	c.695T>A	V232D
c.580-1G>T	712-1G->T	c.1558G>T	V520F
c.1364C>A	A455E	c.3846G>A	W1282X
c.1682C>A	A561E	c.3276C>A	Y1092X (C>A)
c.54-5940_273+10250del 21kb	CFTRdele2,3	c.366T>A	Y122X
c.3454G>C	D1152H	c.1705T>G	Y569D
c.178G>T	E60X	c.[1210-12[5];1210- 34TG[9-13]]	5T (TG9-13)
c.274G>A	E92K	c.1210-12[7]	7T
c.274G>T	E92X	c.1210-12[9]	9T
c.1521_1523delCTT	F508del		

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x týdně

Doba odezvy: 10 pracovních dnů

Delece v AZF genu na Y chromozómu (AZFa,b,c)

V populaci je postiženo přibližně 15-20% párů v reprodukčním věku neplodností. Muži i ženy se na ní podílejí přibližně stejnou měrou. Příčinou mužské neplodnosti může být mimo jiné také přítomnost mikroleceí v tzv. AZF oblasti (lokalizace: Yq11.3). Frekvence výskytu postižených mužů se odhaduje na 1/10 000 jedinců. Geny, které se nacházejí ve třech podoblastech, označovaných jako AZFa, AZFb, AZFc, ovlivňují proces spermatogeneze a tím i mužskou reprodukci. Předpokládá se, že každá podoblast je aktivní v jiné fázi spermatogeneze.

Na stejném principu je založena i identifikace Y specifických sekvencí u žen s gonadální dysgenezí a u žen s Turnerovým syndromem.

Referenční hodnoty:

+ sledovaný úsek přítomen

- del sledovaný úsek nepřítomen ⇒ mikrolece

Pro oblast AZFa analyzujeme STS markery sY84, sY86, pro oblast AZFb STS markery sY127, sY134 a pro oblast AZFc STS markery sY254, sY255 (kit Devyser AZF v2). Pomocí kitu Devyser AZF Extension dále zpřesňujeme analýzu při nálezů delece markeru kitem Devyser AZF v2 pomocí STS markerů sY160, sY1191, sY1291, sY88, sY1065, sY82, sY83, sY153, sY121, sY1192 a sY105.

Pro interní kontrolu PCR amplifikace analyzujeme geny ZFX/ZFY (Yp11.3), které amplifikují specifický úsek na obou pohlavních chromozomech X a Y (ZFX a ZFY).

Pro kontrolu přítomnosti TDF (testis determining factor) je analyzován úsek SRY genu (sY14), který se nachází na horním raménku Y chromozomu (Yp11.2) a tím v případě nepřítomnosti ZFY oblasti umožňuje kontrolu přítomnosti Y specifických sekvencí.

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x týdně

Doba odezvy: 10 pracovních dnů

Fragilní X – stanovení počtu CGG repetice v promotoru genu *FMRI*

Syndrom fragilního X chromozomu (FXS, FRAXA, syndrom Martin-Bell) je dědičné X vázané onemocnění, které způsobují varianty v genu *FMRI* (fragile X mental retardation 1 gene). Jedná se o dynamické varianty - expanze trinukleotidů CGG v 5' nepřekládané části tohoto genu, který se nachází v oblasti Xq27.3.

Rozsáhlé expanze vedou k metylaci CpG ostrovů a transkripčnímu umlčení FMR 1 genu. Inaktivace genu má za následek nulovou expresi FMR1 proteinu, který se dominantně vyskytuje v neuronech. FMRP má významnou roli v synaptické plasticitě a dendritickém rozvoji. Umlčení FMRP má za následek manifestaci FXS, což je (hned po Downově syndromu) jedna z nejčastějších příčin dědičné mentální retardace u mužů.

Je ale zřejmé, že protein FMRP ovlivňuje expresi i mnoha desítek dalších genů, čímž ovlivňuje hladinu řady proteinů v buňkách a tím i velké množství různých regulačních signálních drah. Změny v regulaci se neodehrávají pouze v mozkové tkáni, ale i ve tkáni pohlavních žláz (gonád) – například vaječníků. Ostatně souvislost syndromu fragilního X chromozomu s abnormálně velkými varlaty (u mužů) a předčasným ovariálním selháním (u žen) je známa již delší dobu. Ukazuje se tak, že v případě syndromu Fragilního X chromozomu je ovlivňována celá řada genů, tudíž dopad na vývoj organismu je komplexní, ale zároveň také poměrně variabilní.

V důsledku mitotické nestability expanze trinukleotidů CGG je možné nalézt u některých pacientů somatický mozaicismus (koexistence premutace a plné mutace), což vysvětluje velkou variabilitu klinické manifestace.

Na základě rozsahu varianty – trinukleotidové expanze dělíme pacienty do následujících alelických tříd: normální forma (NL), intermediální forma, šedá zóna (IM), premutace (PM) a plná mutace (FM).

U **normální formy** *FMRI* genu kolísá počet opakování (CGG)*n* mezi 6 a 44. V populaci jsou nejběžnější alely 29-30. Ty mohou obsahovat 1-3 přerušení AGG tripletu. U **intermediální formy (tzv. šedé zóny)** najdeme alely s rozsahem opakování 45-54. Nosiči těchto alel mívají zdravé děti, avšak existuje riziko vzniku alely s plnou mutací v dalších generacích. Alely s rozsahem 55-200 opakování bez abnormální metylace se označují jako **premutace**. Nosiči premutace nejsou postiženi mentální retardací, ale premutace s nízkou penetrancí způsobuje dvě zcela rozdílné choroby, presenilní tremor/ataxií (FXTAS) a předčasné ovariální selhání u 20 % žen – přenašeček. Premutace jsou v průběhu meiózy nebo rané embryogeneze nestabilní a jestliže jsou přenášeny ženou, hrozí expanze CGG-repetice do plné mutace. Oproti tomu premutace přenášené muži jen zcela výjimečně expandují do plné mutace. Riziko vzniku plné mutace se odvíjí od délky mateřské premutace, je více než 95% u alel s více než 100 opakováními. Nejkratší alela, u které byla popsána expanze v plnou mutaci v jedné generaci, má 59 opakování bez AGG přerušení. Frekvence premutovaných alel v populaci se uvádí 1:100-300 u žen a 1:250-800 u mužů.

Plná mutace, tedy alely s počtem repetice větším než 200 a s metylací, vede k FXS. Takto postižení jedinci mají mentální retardaci často spojenou s dysmorfickými rysy (protáhlý obličej s prominující bradou a velkýma odstávajícíma ušima), u mužů se vyskytuje makroorchidismus. U postižených bývají popisovány různě závažné poruchy chování, jako jsou poruchy učení, autismus, hyperaktivita (ADHD). Fenotypická manifestace u prepubertálních mužů je poměrně nespecifická a variabilní, což znesnadňuje klinickou diagnostiku. Postiženy mohou být také ženy, přibližně polovina nosiček plné mutace má mírnou až střední formu mentální retardace.

Referenční hodnoty:

Normální forma (NL) = přítomnost 6 až 44 repetice CGG

Intermediální forma (IM) = přítomnost 45 až 54 repetice CGG

Premutace (PM) = přítomnost 55 až 200 repetice CGG

Plná mutace (FM) = přítomnost > 200 repetice CGG

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x za 14 dnů

Doba odezvy: 20 pracovních dnů

Fruktózová intolerance – varianty A149P, A174D, N334K a delece del4E4 v genu *ALDOB*

Hereditární fruktózová intolerance je autozomálně recesivní onemocnění způsobené nedostatkem enzymu aldolasa B, který je nezbytný v metabolismu fruktózy. Frekvence výskytu fruktózové intolerance je přibližně 1 z 10 000 až 100 000 jedinců. Mezi nejčastější varianty, zodpovědné až za 87 % všech případů fruktózové intolerance, patří A149P, A174D, N334K a delece del4E4.

Klinickými příznaky fruktózové intolerance je zvracení, nevolnost, průjemy, pomalý růst a metabolické poruchy (hypoglykémie, hyperurikémie, hypomagnesémie a laktoacidóza). Fruktózová intolerance může vést až k selhání jater a ledvin. Dědičná fruktózová intolerance se objevuje již v dětském věku u dětí, které nejsou krmeny mateřským mlékem, ale potravou obsahující sacharózu a fruktózu. Pokud takové dítě přijímá velké množství fruktózy, mohou se u něj projevit letargie a křeče. Včasná diagnostika je důležitá z hlediska možného poškození orgánů a stanovení správné léčby.

Referenční hodnoty:

Negat. - negativní = nemutovaný homozygot = *wild type* = *wt / wt*;

Heteroz. – heterozygot = *wt / mut*;

Homozyg. - mutovaný homozygot = *mut / mut*;

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x týdně

Doba odezvy: 7 pracovních dnů

Gilbertův syndrom – chronická nekonjugovaná hyperbilirubémie (inzerce nukleotidů TA v promotoru genu UGT1A1; detekce alely UGT1A1*28)

Gilbertův syndrom (GS), někdy též Meulengrachtův syndrom, je dědičná porucha metabolismu žlučového barviva bilirubinu, která se projevuje mírnou chronickou nekonjugovanou hyperbilirubinémií (17–100 mol/l) bez přítomnosti jaterního onemocnění či zjevné hemolýzy. Jedná se o geneticky podložené onemocnění s autozomálně recesivní dědičností, které se objevuje u 3–15 % indoevropské populace (v ČR 15 % populace).

Genotypová frekvence onemocnění je u obou pohlaví stejná, avšak u mužů a žen se GS projevuje v poměru 4:1. To je způsobeno zřejmě vlivem mužských pohlavních hormonů (testosteronu) na snížení aktivity enzymu UDP-glucuronosyltransferasa.

Z genetického hlediska je onemocnění způsobeno inzercí dvou nukleotidů TA do promotorové oblasti UGT 1A1 genu, který je umístěn na druhém chromozomu, v oblasti 2q37. Normální alela obsahuje 6 TA sekvencí, u mutované alely se po inzerci zvýší počet TA sekvencí na 7. Postižení jedinci s GS mají na obou alelách 7 TA (genotyp 7TA/7TA). Přenašeči mají genotyp 6TA/7TA (heterozygoti). U GS pacientů se genotyp 7TA/7TA vyskytuje v 98%. Následkem výše zmíněné varianty dochází ke snížení aktivity (20-30% aktivita oproti normálu) enzymu UDP-glucuronosyltransferasa. V důsledku toho je v krevní plazmě přebytek nekonjugovaného bilirubinu (nerozpustný ve vodě), který je pomaleji konjugován s kyselinou glukuronovou než u zdravých jedinců.

Klinicky jde o benigní syndrom nevyžadující žádnou terapeutickou intervenci. Tím důležitější je ovšem jeho správná diagnostika a odlišení od závažných onemocnění jaterního parenchymu.

Onemocnění bývá nejčastěji diagnostikováno mezi 15. - 30. rokem života. GS se projevuje především zežloutnutím kůže a očního bělma v důsledku ukládání přebytečného bilirubinu do tkání.

Referenční hodnoty:

Negat. - negativní = nemutovaný homozygot = *wild type* = *wt / wt*; 6TA/6TA

Heteroz. – heterozygot = *wt / mut*; 6TA/7TA

Homozyg. - mutovaný homozygot = *mut / mut*; 7TA/7TA

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x za 7 dnů

Doba odezvy: 7 pracovních dnů

Glykoprotein GPIa (C807T) – zvýšené riziko infarktu myokardu a ischemické mozkové příhody

Destičkový glykoproteinový komplex GP Ia/IIa zprostředkovává v organismu adhezi trombocytů na kolagen typu I. Variabilitu exprese komplexu GPIa/IIa na povrchu destiček významně ovlivňuje polymorfismus (C807T) v genu pro podjednotku GpIa. Destičky homozygotů a heterozygotů alely GPIa (807T) se vyznačují 2× vyšší expresí GPIa/IIa na povrchu destiček, což zvyšuje jejich trombogenní potenciál. Přítomnost alely GPIa 807T je spojena s výskytem arteriálních trombóz, infarktu myokardu a ischemické cévní mozkové příhody zejména u mladších pacientů. Riziko významně narůstá v koincidenci s konvenčními riziky (v kombinaci s kouřením 25× vyšší riziko oproti běžné populaci).

Referenční hodnoty:

Negat. - negativní = nemutovaný homozygot = *wild type* = *wt / wt*;

Heteroz. – heterozygot = *wt / mut*;

Homozyg. - mutovaný homozygot = *mut / mut*;

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x týdně

Doba odezvy: 10 pracovních dnů

Glykoprotein GPIIIa (L33P) – trombocytopenie, rizikový faktor časného infarktu myokardu a mozkové příhody

Destičkový glykoproteinový komplex IIb/IIIa ($\alpha_2\beta_3$) je součástí integrinové rodiny adhezivních receptorů, které se podílejí na buněčných interakcích a které zahrnují vazebná místa pro fibrinogen, von Willebrandův faktor, fibronektin a vitronektin. Polymorfismus v genech kódující tyto glykoproteinové komplexy může ovlivňovat mnoho dějů v lidském těle (rezistence na aspirin, kardiovaskulární onemocnění, změna antigenních vlastností molekuly, což může vést ke vzniku posttransfuzní purpury, život ohrožující trombocytopenii a neonatální trombocytopenické purpury). Nejběžnější a klinicky nejdůležitější alely genu pro GPIIIa jsou P1^{A1} (HPA-1a) a P1^{A2} (HPA-1b). Jednonukleotidová substituce T za C v pozici 12548 (respektive T1565C; HPA-1b) způsobuje substituci leucinu za prolin v pozici 33 AMK řetězce (L33P). Alela HPA-1b může v některých případech zvyšovat agregabilitu trombocytů. Heterozygoti a homozygoti pro HPA-1b mají častěji tenkostěnné, vulnerabilní aterosklerotické plaky náchylné k rupturám s následnou masivní trombózou. Nosičství alely HPA-1b však představuje pouze mírné riziko rozvoje koronární nemoci, vzniku infarktu myokardu nebo restenózy po perkutánních zákrocích. Toto riziko se však významně zvyšuje při současném výskytu dalších polymorfizmů, např. v genech pro *eNOS* a *PAI-1*. Výskyt alespoň jedné alely HPA-1b je však v současné době považován za jeden z trombofilních faktorů vzniku preeklampsie u těhotných žen.

Referenční hodnoty:

Negat. - negativní = nemutovaný homozygot = *wild type* = *wt / wt*;

Heteroz. – heterozygot = *wt / mut*;

Homozyg. - mutovaný homozygot = *mut / mut*;

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x týdně

Doba odezvy: 10 pracovních dnů

Hemochromatóza - porucha metabolismu železa (varianty C282Y, H63D a S65C v genu HFE)

Hereditární hemochromatóza (HCH) je v kavkazské populaci velmi běžné dědičné onemocnění s autozomálně recesivním typem dědičnosti s prevalencí 1 z 200 až 1 z 500. Je charakterizována zvýšenou absorpcí železa z dvanácterníku s následným zvýšeným ukládáním železa v nejrůznějších parenchymatických tkáních, jako jsou játra, srdce, slinivka břišní, hypofýza, klouby a pokožka. Nadměrné ukládání železa v těchto orgánech vede k poškození jejich struktury a funkce. Klasickými příznaky je kožní hyperpigmentace, diabetes mellitus a hepatomegalie. Další klinické příznaky zahrnují bolesti břicha, abnormální jaterní testy, hepatocelulární karcinom, kardiomyopatie, poruchy převodního systému srdečního, hypogonadismus, hypotyroidismus, impotence a artropatie.

Objev kandidátní genu *HFE* v roce 1996 znamenal průlom v pochopení podstaty tohoto onemocnění. Gen *HFE* se nachází na 6. chromozómu (6p21.3) v blízkosti HLA komplexu. Gen *HFE* kóduje bílkovinu o velikosti 343 AMK. Protein HFE se exprimuje v kryptických buňkách dvanácterníku ve spojení s β 2-mikroglobulinem a transferinovým receptorem TfR, se kterým protein HFE tvoří komplex. Protein HFE usnadňuje absorpci železa a v komplexu s TfR působí jako senzor zásob železa v těle. Zvýšené zásoby železa a následující nárůst železa ve formě transferinu vede ke zvýšené absorpci železa. Následně enterocyty migrující do vrcholů střevních klků regulují produkci transportéru železa DMT1 tak, že se snižuje jeho množství. Tím se snižuje absorpce železa ze stravy. Tento proces je obrácený při nedostatku železa, kdy se naopak zvyšuje syntéza DMT1, a tím dochází také ke zvýšené absorpci železa z potravy.

Varianta v genu *HFE* může významně poškodit TfR zprostředkovanou absorpci železa vázaného na transferin do buněk, čímž vzniká falešný signál o údajných nízkých zásobách železa. Zdánlivý nedostatek železa v buňkách střeva má tak za následek zvýšenou expresi transportéru iontů železa DMT-1, čímž se absorpce železa ve střevě významně zvyšuje.

V genu *HFE* bylo několik jednobodových variant, přičemž s hemochromatózou jsou nejčastěji spojovány dvě tyto varianty. Jednou z nich je záměna cysteinu na místě 282 za tyrosin (C282Y) a druhou záměna histidinu v pozici 63 za kys. asparagovou (H63D). Alelová frekvence C282Y se v kavkazské populaci pohybuje kolem 6,3 %, přičemž přibližně u 10 % lidí z bělošské evropské populace se vyskytuje jako heterozygot. Více než 80 % pacientů s typickými příznaky dědičné hemochromatózy jsou homozygoti pro C282Y. Alelová frekvence H63D je v kavkazské populaci přibližně 16 %. S výskytem této varianty je však spojována spíše mírnější forma hemochromatózy. Asi u 25% evropské populace se vyskytuje v heterozygotním stavu, avšak vážnější fenotypový projev hemochromatózy je spojován s formou smíšeného heterozygota C282Y/H63D. Jako možné příčiny spíše mírnějších forem hemochromatózy byly nedávno identifikovány další varianty v genu pro *HFE*, jako jsou S65C (Ser65Cys), G93R (Gly93Arg), I105T (Ile105Thr), T281K (Thr281Lys).

Referenční hodnoty:

Negat. - negativní = nemutovaný homozygot = *wild type* = wt / wt;

Heteroz. – heterozygot = wt / mut;

Homozyg. - mutovaný homozygot = mut / mut;

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x týdně

Doba odezvy: 7 pracovních dnů

Histaminová intolerance – vyšetření 4 variant v genu pro DAO asociovaných s její sníženou produkcí a aktivitou

Histaminová intolerance (v současné době trápí 2-3% populace) je onemocnění, které vzniká při porušení rovnováhy mezi přísunem a odbouráváním histaminu v těle a jeho následným hromaděním. Tato nerovnováha může být způsobena jednak zvýšeným přísunem histaminu v potravě, vlastní nadprodukcí histaminu či sníženou schopností histamin odbourat v důsledku snížené hladiny či aktivity enzymů. Hlavními dvěma enzymy odbourávající histamin jsou diaminoxidasa – DAO (kódována genem *AOCI*) a N-methyltransferasa (kódována genem *HNMT*). Avšak pouze DAO se vyskytuje extracelulárně, a tudíž v odbourávání histaminu hraje hlavní roli.

Aby se předešlo zbytečné celoživotní dietě, je potřeba ověřit, zda je nedostatek DAO způsoben primárními (genetickými) nebo sekundárními vlivy. I proto je genetický test nepostradatelný u pacientů s potvrzenou nízkou aktivitou DAO v séru. Výsledek tohoto vyšetření totiž bude mít podstatný dopad na výslednou léčbu, protože odliší permanentní nedostatek DAO podmíněný geneticky od reversibilní léčitelné histaminové intolerance způsobené jinými vlivy (např. poškozením střevního epitelu při celiakii, laktóзовé intoleranci či Crohnově chorobě, sníženým vstřebáváním a příjmem mědi a zinku, příjmem alkoholu, drog a léků, které snižují aktivitu DAO).

Referenční hodnoty:

Negat. - negativní = nemutovaný homozygot = *wild type* = *wt / wt*;

Heteroz. – heterozygot = *wt / mut*;

Homozyg. - mutovaný homozygot = *mut / mut*;

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x týdně

Doba odezvy: 7 pracovních dnů

HLA typizace – typizace lokusů HLA-A, HLA-B a HLA-DR

Stanovení genotypu v lokusech HLA-A, HLA-B, HLA-DR je důležitou metodikou při určování histokompatibility pacienta s darovaným orgánem, tkání nebo buňkami od alogenního dárce. Stanovení genotypu je důležité také v případě stanovení přítomnosti predispozičních alel HLA, které jsou asociovány s nejrůznějšími genetickými predispozicemi.

Referenční hodnoty:

- určení genotypu pacienta v lokusech HLA-A, HLA-B, HLA-DR

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x za dva týdny

Doba odezvy: 20 pracovních dnů

Chronická pankreatitida - vyšetření nejčastějších patogenních variant v genech *PRSSI* a *SPINK1*

Asi u 20 % všech případů chronické pankreatitidy není známa příčina onemocnění. V těchto případech hovoříme o idiopatické chronické pankreatitidě, u které se předpokládá genetický podklad, často v kombinaci s exogenními faktory. Dědičná chronická pankreatitida je vzácná autozomálně dominantní porucha s variabilní expresivitou a neúplnou penetrancí. Pacienti trpící tímto onemocněním přitom mají 50 až 60x zvýšené riziko karcinomu pankreatu. Pacienti trpí opakující se akutní pankreatitidou obvykle před dosažením 10 let věku, která má tendenci k chronifikaci. Při zobrazovacích technikách může být kalcifikace a tvorba pseudocyst v pankreatu zjištěna relativně pozdě. Vyskytují se u nich exokrinní a/nebo endokrinní insuficience pankreatu s diabetem mellitus se může v rámci rodiny lišit.

Etiologie dědičné pankreatitidy souvisí s patogenními variantami v genu *PRSSI* (OMIM 276000) u asi 70 % případů. Tento gen je umístěn na chromozomu 7q35 a kóduje kationtový trypsinogen. Tento kationtový trypsinogen je serinová proteáza, která patří k nejvíce syntetizovaným sekrečním proteinům pankreatu. Nejčastější predisponující varianty v genu *PRSSI* jsou p.R122H, p. R122C, p.R116S, p.L104P v exonu 3 a p.N29 v exonu 2. Tyto varianty mají za následek předčasnou a zejména zvýšenou autokatalytickou aktivaci („zisk funkce způsobený variantou“) z trypsinogenu do aktivního trypsinu. Varianta p.R122H navíc zvyšuje stabilitu trypsinu v pankreatu. Mnohem méně časté varianty, které se nacházejí v ojedinělých případech u dědičné pankreatitidy, a pravděpodobně také souvisí s aktivací trypsinogenu, jsou p.K23R, p.D22G nebo p.A16V (všechny v exonu 2).

U pacientů s dědičnou chronickou pankreatitidou (přibližně 20 %) bývají nalézány také varianty v genu *SPINK1* (OMIM 167790), který je umístěn na chromozomu 5q32 a kóduje kazální inhibitor serinové proteázy typu 1. Nejčastější je varianta p.N34S v exonu 3 s frekvencí od 80-90 % nebo p.E35*. Varianta p.N34S, kterou nese 1-2% populace, se často vyskytuje u pacientů bez rodinné anamnézy, předpokládá se možnost smíšené heterozygoty, v kombinaci s jinými patogenními variantami (např. v genu *CFTR*). Důležitý vliv mají i rizikové faktory životního prostředí (alkohol, nikotin, životní styl). Varianta genu *SPINK1* brání autolytické nebo inhibiční inaktivaci trypsinu.

V přítomnosti variant v genu *PRSSI* nebo *SPINK1* dochází k nerovnováze mezi intrapancreatickými proteázami a jejich inhibitory, které vedou k autodigesti orgánu.

Kromě *PRSSI* a *SPINK1* byly identifikovány varianty v genu *CFTR* (OMIM 602421), které mají pravděpodobně souvislost s onemocněním chronickou pankreatitidou. Varianty v genu *CFTR* mění viskozitu sekrece pankreatu, což podporuje aktivaci trypsinogenu.

Indikace pro molekulární genetickou analýzu:

- povinně:
 - nosič varianty v rodině
 - chronická pankreatitida před dosažením věku 30 let

- karcinom pankreatu před dosažením věku 45 let
- volitelně:
 - recidivující a nejasné břišní příhody v dětství, případně zvýšené koncentrace sérové amylázy a lipázy

Referenční hodnoty:

wt / wt= wild type= nebyla nalezena žádná testovaná patogenní varianta;

wt / mut =heterozygot = byla nalezena testovaná patogenní varianta v heterozygotním stavu;
popis nalezené varianty

mut / mut =mutovaný homozygot = byla nalezena testovaná patogenní varianta
v homozygotním stavu nebo složený heterozygot; popis nalezené(ých) variant(y);

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x za dva týdny

Doba odezvy: 20 pracovních dnů

Chronická pankreatitida - 68 nejčastějších patogenních variant vč. polyT a polyTG v genu CFTR

CFTR je transmembránový protein, který řídí tok chloridových iontů přes membránu buňky v závislosti na ATP a cAMP. Patogenní varianty v *CFTR* genu způsobují, že se membránový kanál stává nepropustným pro chloridové ionty. V důsledku toho se mění složení a fyzikálně – chemické vlastnosti hlenu na povrchu sliznic. Hlenový sekret na povrchu epitelu se zahušťuje, což narušuje normální funkci orgánů.

Genetické testování patogenních variant v genu *CFTR* může napomoci u rizikových pacientů s klinickými příznaky idiopatické pankreatitidy. Varianty v genu *CFTR* mění viskozitu sekrece pankreatu, což podporuje aktivaci trypsinogenu. Pankreatitida se objevuje u 1 až 2% pacientů s cystickou fibrózou. Neobjasněná pankreatitida může být způsobena patogenními variantami v genu *CFTR*, převážně u starších pacientů. *CFTR* varianty mohou zvýšit riziko pankreatitidy po vystavení alkoholu nebo určitým lékům a vyčleňuje tak podskupinu pacientů s idiopatickou pankreatitidou, kteří mají varianty na obou alelách genu *CFTR*.

Referenční hodnoty:

Negat. - negativní = nemutovaný homozygot = *wild type* = wt / wt; 7T/7T; 9T/9T; 5T (9TG)/5T (9TG); 5T (10TG)/5T (10TG); 5T (11TG)/5T (11TG)

Heteroz. – heterozygot = *wt / mut*; 7T/9T; 5T (9TG)/7T; 5T (10TG)/7T; 5T (11TG)/7T; 5T (12TG)/7T; 5T (13TG)/7T; 5T (9TG)/9T; 5T (10TG)/9T; 5T (11TG)/9T; 5T (12TG)/9T; 5T (13TG)/9T

Homozyg. - mutovaný homozygot = *mut / mut*; 5T (12TG)/5T (12TG), 5T (13TG)/5T (13TG)

Záchytnost použitého kitu je 91,91% variant v *CFTR* genu.

Seznam vyšetřovaných sekvenčních variant v genu *CFTR*:

Název cDNA varianty	Tradiční název	Název cDNA varianty	Tradiční název
c.948delT	1078delT	c.1624G>T	G542X
c.1021_1022dupTC	1154insTC	c.1652G>A	G551D
c.1029delC	1161delC	c.254G>A	G85E
c.1393-1G>A	1525-1G->A	c.1007T>A	I336K
c.1477_1478delCA	1609delCA	c.1519_1521delATC	I507del
c.1545_1546delTA	1677delTA	c.2128A>T	K710X
c.1585-1G>A	1717-1G->A	c.617T>G	L206W

Název cDNA varianty	Tradiční název	Název cDNA varianty	Tradiční název
c.1680-886A>G	1811+1.6kbA->G	c.653T>A	L218X
c.1680-1G>A	1812-1G->A	c.3302T>A	M1101K
c.1766+1G>A	1898+1G->A	c.3909C>G	N1303K
c.1766+5G>T	1898+5G->T	c.200C>T	P67L
c.1911delG	2043delG	c.1477C>T	Q493X
c.2012delT	2143delT	c.2668C>T	Q890X
c.2051_2052delAAinsG	2183AA->G	c.3196C>T	R1066C
c.2052delA	2184delA	c.3472C>T	R1158X
c.2052dupA	2184insA	c.3484C>T	R1162X
c.2657+5G>A	2789+5G->A	c.349C>T	R117C
c.2737_2738insG	2869insG	c.350G>A	R117H
c.2988+1G>A	3120+1G->A	c.3848G>A	R1283M
c.3140-26A>G	3272-26A->G	c.1000C>T	R334W
c.3528delC	3659delC	c.1040G>A	R347H
c.3718-2477C>T	3849+10kbC->T	c.1040G>C	R347P
c.3773dupT	3905insT	c.1657C>T	R553X
c.262_263delTT	394delTT	c.1679G>C	R560T
c.489+1G>T	621+1G->T	c.3752G>A	S1251N
c.489+2T>C	621+2T->C	c.1646G>A	S549N
c.579+1G>T	711+1G->T	c.695T>A	V232D
c.580-1G>T	712-1G->T	c.1558G>T	V520F
c.1364C>A	A455E	c.3846G>A	W1282X
c.1682C>A	A561E	c.3276C>A	Y1092X (C>A)
c.54-5940_273+10250del 21kb	CFTRdele2,3	c.366T>A	Y122X
c.3454G>C	D1152H	c.1705T>G	Y569D
c.178G>T	E60X	c.[1210-12[5];1210- 34TG[9-13]]	5T (TG9-13)
c.274G>A	E92K	c.1210-12[7]	7T
c.274G>T	E92X	c.1210-12[9]	9T

c.1521_1523delCTT	F508del		
-------------------	---------	--	--

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x týdně

Doba odezvy: 10 pracovních dnů

Chronická pankreatitida - detekce delecí/duplikací v genech *PRSSI*, *SPINK1* a *CTRC*

Hereditární pankreatitida je vzácné genetické onemocnění, které je charakterizováno opakujícími se pankreatickými atakami, které se mohou vyvinout v chronickou pankreatitidu. Genetická etiologie onemocnění chronická pankreatitida je asociována s autosomálně dominantní variantou genu *PRSSI* a *CTRC* a autosomálně recesivních variant genů *CFTR*, *SPINK1* a *PRSSI*. Chronická pankreatitida, i když je ve většině případů způsobena bodovými patogenními variantami (*SPINK1* - N34S a E35*, *PRSSI* - N29I, L104P, R116S a R122H), může být i výsledkem velkých přestaveb genů *PRSSI*, *SPINK1* a *CTRC*. Detekce delecí a duplikací v genech *PRSSI*, *SPINK1* a *CTRC* pomocí MLPA technologie dokáže tyto velké přestavby identifikovat.

Indikace pro molekulární genetickou analýzu:

- povinně:
 - nosič varianty v rodině
 - chronická pankreatitida před dosažením věku 30 let
 - karcinom pankreatu před dosažením věku 45 let
- volitelně:
 - recidivující a nejasné břišní příhody v dětství, případně zvýšené koncentrace sérové amylázy a lipázy

Referenční hodnoty:

bez dup/del: v genu či jeho části nebyla nalezena duplikace ani delece.

del: v genu či jeho části byla nalezena delece, která je popsána v rámci Závěru výsledkového listu.

dup: v genu či jeho části byla nalezena duplikace, která je popsána v rámci Závěru výsledkového listu.

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x za dva týdny

Doba odezvy: 20 pracovních dnů

Ichtyóza (nejčastější varianty v genu FLG)

Filaggrin (FLG) je klíčový protein epidermis, který hraje zásadní roli v procesu terminální diferenciaci keratinocytů a v udržování integrity kožní bariéry. Je prekurzorem profilaggrinu, který se štěpí na funkční filaggrinové monomery, jež zajišťují agregaci keratinových filament, a tím přispívají k tvorbě kompaktní rohové vrstvy (stratum corneum). Současně degradační produkty filaggrinu vytvářejí složky přirozeného hydratačního faktoru, který udržuje hydrataci a správnou funkci kůže. Genetické varianty ve FLG, zejména nonsense varianty jako R501X a 2282del4, vedou ke ztrátě funkčního proteinu, která se projeví kožním onemocněním. Mezi nejznámější z nich patří ichtyóza vulgaris. Tato forma ichtyózy je autozomálně dominantní porucha, která se projevuje sníženou nebo úplnou absencí filaggrinu, což způsobuje výraznou poruchu kožní bariéry. Klinické projevy zahrnují suchou, hrubou kůži se šupinatými lézemi, zejména na extenzorových plochách končetin, jako jsou holeně. V závažnějších případech se šupiny objevují i na trupu a jsou často doprovázeny jemnými, bílými až šedými šupinami. Defekt v produkci filaggrinu snižuje schopnost kůže udržovat vlhkost, což vede k zvýšené transepidermální ztrátě vody a ke zvýšené propustnosti pro alergeny, dráždivé látky a mikroorganismy. U pacientů s FLG variantami je proto také významně zvýšené riziko rozvoje atopické dermatitidy (AD), což je chronické zánětlivé onemocnění kůže spojené s intenzivním svěděním a zvýšenou citlivostí na environmentální faktory. Varianty v FLG mohou rovněž přispívat k rozvoji dalších atopických onemocnění, jako je astma nebo alergická rýma, což ukazuje na důležitou roli filaggrinu nejen v kožní, ale i v systémové imunitní odpovědi. Do současnosti je známo asi 185 kauzálních patogenních variant napříč celou kódující sekvencí genu filaggrin, které vedou ke ztrátě funkce proteinu (říjen 2024, dle Franklin by Genoox). Většinou se jedná o delece či nonsense patogenní varianty. Mezi nejčastěji se vyskytující varianty v evropské populaci patří c.1501C>T (R501*) a c.2282_2285del (S761fs), dále pak c.3702del (S1235fs), c.4420C>T (R1474*), c.5360del (G1787fs), c.7264G>T (E2422*), c.7267_7268del (Q2423fs), c.7339C>T (R2447*), c.9740C>A (S3247*). V asijské populaci se nejčastěji vyskytují variant c.7661C>G (S2554*) a c.3321del (G1109fs).

Referenční hodnoty:

Negat. - negativní = nemutovaný homozygot = *wild type* = wt / wt;

Heteroz. – heterozygot = wt / mut;

Homozyg. - mutovaný homozygot = mut / mut;

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1 x 45 dnů

Doba odezvy: 45 pracovních dnů

Ichtyózy (analýza celých genů, jejich kódujících oblastí a míst sestřihu: ABCA12, ALOX12, ALOX12B, ALOXE3, CERS3, CYP4F22, KRT1, KRT2, KRT10, NIPAL4, PNPLA1, SPINK5, STS, TGM1)

Ichtyóza je skupina dědičných kožních poruch, u kterých dochází k nadměrnému růstu a zrohovatění kůže. Mezi běžné příznaky patří suchá, šupinatá pleť, svědění, zarudnutí a u některých typů ichtyózy může být zvýšené riziko infekcí. Příčinou vzniku ichtyózy jsou patogenní varianty v genech řídících proces keratinizace, které mají za následek abnormální tvorbu keratinu a narušení normální stavby pokožky.

Ichtyózy, které jsou v rámci této analýzy vyšetřovány:

Anulární epidermolytická ichtyóza (AEI1) - OMIM: 607602 (AD), gen *KRT10*

Anulární epidermolytická ichtyóza (AEI2) - OMIM: 620148 (AD), gen *KRT1*

Superficiální epidermolytická ichtyóza (IBS) - OMIM: 146800 (AD), gen *KRT2*

Autosomálně recesivní kongenitální ichtyózy (ARCI)

ARCI4B - OMIM: 242500 (AR), gen *ABCA12*

ARCI2 - OMIM: 242100 (AR), gen *ALOX12B*

ARCI3 - OMIM: 606545 (AR), gen *ALOXE3*

ARCI6 - OMIM: 612281 (AR), gen *NIPAL4*

ARCI9 - OMIM: 615023 (AR), gen *CERS3*

ARCI10 - OMIM: 615024 (AR), gen *PNPLA1*

ARCI11 - OMIM: 242300 (AR), gen *TGM1*

ARCI4A - OMIM: 601277 (AR), gen *ABCA12*

ARCI5 - OMIM: 604777 (AR), gen *CYP4F22*

ARCI - AR, gen *ALOX12*

X-vázaná recesivní ichtyóza (XLI) - OMIM: 308100 (XLR), gen *STS (ARSC)*

Nethertonův syndrom - OMIM: 256500 (AR), gen *SPINK5*

Při tvorbě knihovny je používáno amplifikační obohacení. Pokud by se zjistila jakákoliv odchylka, např. nedostatečné množství osekvenovaných readů, jejich horší kvalita, nedostatečné pokrytí jednotlivých úseků apod., sekvenční běh se opakuje.

V případě nalezení patologické či suspektně patologické varianty analýzou NGS dat, se její přítomnost potvrzuje Sangerovým sekvenováním.

V rámci hodnocení NGS dat jsou filtry nastaveny tak, aby byly analyzovány pouze výše uvedené geny vyžádané lékařem. Nedochozí tedy k sekundárním/nevyžádaným nálezům.

Referenční hodnoty:

Nalezené varianty řadíme dle účinku do kategorií: patologická, suspektně patologická, varianta nejasného významu, suspektně benigní a varianta benigní. Nalezené varianty jsou detailněji popsány v závěrečné zprávě.

Varianty suspektně benigní nebo benigní vydáváme ke zprávě na vyžádání.

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1 x 45 dnů

Doba odezvy: 45 pracovních dnů

JAK2 – polycytemia vera (somatická varianta V617F v genu JAK2)

Chronické myeloproliferativní poruchy (CMPDs) představují velmi heterogenní skupinu onemocnění myeloidní řady krvetvorných buněk. Při diferenciální diagnostice se uplatní především detekce dvou molekulárních změn. Jsou to vyšetření fúzního genu BCR-ABL a varianty V617F v genu *JAK2*. BCR-ABL/Ph1 charakterizuje především chronickou myeloidní leukémií (CML) a *JAK2* varianta se naopak vyskytuje u všech tzv. BCR-ABL/Ph1 negativních myeloproliferativních chorob, především u Polycytemia vera (PV), esenciální trombocytémie (ET) či idiopatické myelofibrozy (CIMF).

Přítomnost varianty *JAK2* V617F se proto považuje za „velké diagnostické kritérium pravé polycytemie“ PV je charakterizována abnormální proliferací nebo dysfunkcí jednoho nebo více myeloidních kmenů buněk. Zmnožení erytrocytů a krevních destiček je spolu s věkem největším rizikovým faktorem tromboembolických komplikací. Varianta V617F v genu *JAK2* je získaná změna, která se vyskytuje v různě velké frakci granulocytů periferní krve a u pacientů s PV je jí přisuzován zásadní význam v patogenezi tohoto onemocnění.

Literární prameny uvádějí, že varianta *JAK2* V617F se vyskytuje u 65-97 % pacientů s PV. S nižší, avšak stále významnou frekvencí se vyskytuje i u pacientů s CIMF (35-95 %) a pacientů s ET (30-57 %).

U jiných onemocnění jako je chronická myeloidní leukémie, chronická myelomonocytická leukémie, myelodysplazie, akutní lymfoblastická leukémie a chronické lymfocytické leukémie se tato varianta běžně nevyskytuje.

Referenční hodnoty:

Negativní – varianta V617F genu *JAK2* nebyla nalezena

Pozitivní – varianta V617F genu *JAK2* byla nalezena.

Limit detekce použitého testu je 0,26% buněk nesoucích testovanou variantu.

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x za 7 dnů

Doba odezvy: 10 pracovních dnů

JAK2 exon 12 – polycytemia vera (nejčastější varianty v exonu 12 genu JAK2)

Chronické myeloproliferativní poruchy (CMPDs) představují velmi heterogenní skupinu onemocnění myeloidní řady krvetvorných buněk. Při diferenciální diagnostice se uplatní především detekce tří molekulárních změn. Jsou to vyšetření fúzního genu *BCR-ABL*, genu *JAK2* (V617F a varianty v exonu 12) a detekce variant W515K a W515L v genu *MPL*. *BCR-ABL/Ph1* charakterizuje především chronickou myeloidní leukémií (CML) a *JAK2* varianta se naopak vyskytuje u *BCR-ABL/Ph1* negativních myeloproliferativních chorob, především u Polycytemia vera (PV), esenciální trombocytémie (ET) či idiopatické myelofibrózy (CIMF). Základním rysem MPN je deregulace dráhy JAK/STAT. Kromě variant v genu *JAK2* byly objeveny varianty v dalších genech, které se nacházejí u pacientů s *JAK2* negativní MPN a ovlivňují epigenetickou kontrolu genové exprese a rovněž sestřih RNA. Mezi ně patří varianty v exonu 10 genu *MPL* a inserce/delece v exonu 9 genu pro Calreticulin (*CALR*).

Somatické varianty v exonu 12 genu *JAK2* byly nalezeny u pacientů buď s polycytemia vera nebo idiopatickou erytrocytózou, kteří nenesou specifickou variantu V617F a mají klinický fenotyp charakterizovaný především izolovanou erytrocytózou. Ve studiích byly tyto somatické varianty detekovány u části pacientů s nízkými hladinami erytropoetinu v séru. Tito pacienti tedy mají myeloproliferativní poruchu charakterizovanou především autonomní nadprodukcí červených krvinek spojenou se sekundární supresí syntézy erytropoetinu. Dosud bylo popsáno deset variant exonu 12 *JAK2*, z nichž nejčastější jsou delece, které vedou ke ztrátě fragmentu o velikosti 6 bp. Nenarušují čtecí rámec genu, ale spíše mění konečné složení aminokyselin odstraněním dvou zbytků. Varianty p.N542-E543 a p.E543-D544del jsou nejčastější z těchto delecí. Výskyt těchto variant v exonu 12 genu *JAK2* u polycytemia vera a idiopatické erytrocytózy naznačuje, že tyto stavy jsou odlišnými stádii stejného erytrocytózniho myeloproliferativního onemocnění. Metodou real-time PCR byly amplifikovány nejčastější specifické varianty v genu *JAK2* exon 12 (N542-E543del, E543-D544del, K539L, H538-K539delinsL, I540-E543delinsMK, H538QK539L, R541-E543delinsK, F537-K539delinsL, V536-I546dup11, F537-I540delinsLV).

Referenční hodnoty:

Negativní – nebyla nalezena žádná testovaná patogenní somatická varianta.

Pozitivní – byla detekována jedna z 10 testovaných patogenních somatických variant, přičemž metoda neumožňuje jejich přesné rozlišení z důvodu repetitivní povahy sekvence exonu 12.

Mez detekce (LOD) kitu byla stanovena výrobcem jako 0,5 %.

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x za 14 dnů

Doba odezvy: 20 pracovních dnů

Klasifikace: Veřejné

Stránka 66 z 113

Karcinom prsu, vaječníků a prostaty (NGS) - geny *BRCA1* a *BRCA2* - analýza celých genů, jejich kódujících oblastí a míst sestřihu

Karcinom prsu je v ČR nejčastějším zhoubným nádorem u žen (incidence přibližně 100 žen ze 100 tis. ročně), avšak vzácně onemocní i muži, kteří tvoří necelé 1 % nemocných. Existuje řada faktorů, které jsou spojeny se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu prsu u žen. Patří sem faktory genetické, hormonální, nutriční a faktory zevního prostředí. Nejdůležitějším rizikovým faktorem je však věk. Jejich incidence totiž začíná výrazně stoupat v období kolem 30. roku a nádory objevující se ve věku nad 45 let představují valnou většinu.

Z genetických faktorů jsou nejvýznamnější především patogenní varianty v genech *BRCA1* a *BRCA2*, které jsou autosomálně dominantní a inaktivace jedné kopie genu má patogenní efekt. Proteiny *BRCA1* a *BRCA2* jsou spojeny s aktivací reparace dvouřetězcových zlomů a homologní rekombinace a jsou důležité v udržování stability genomu. Poškození genu *BRCA1* se zvýšeně objevuje právě u karcinomu prsu, vaječníků (HBOC; hereditary breast and ovarian cancer) a v menší míře též u mužů s karcinomem prostaty. Přenašečky mají celoživotní riziko, že onemocní karcinomem prsu (55-85 %) nebo karcinomem vaječníků (15-45 %). Porucha genu *BRCA2* je spojená obvykle s horší prognózou.

Nádory vaječníků a vejcovodů představují asi 15 % všech zhoubných novotvarů u žen. Příčina vzniku nádorů vaječníků není známa. Významná role se však připisuje ženským pohlavním hormonům a jejich vlivu na ovulaci. Proto užívání hormonální antikoncepce, které blokuje ovulaci, vede ke snížení rizika nádorového bujení. Zda toto snížení rizika trvá i po ukončení užívání hormonální antikoncepce, není známo.

Jsou známy i dědičné formy nádorů vaječníků. Tím jsou ohroženy nejvíce ženy s patogenní variantou genů *BRCA1* a *BRCA2*. Tyto nádory postihují mladší ženy do 40 let věku. Obecně postihují zhoubné nádory vaječníků nejčastěji ženy ve věku mezi 50 a 75 lety.

U mužů patogenní varianty v genu *BRCA2* zvyšují riziko rakoviny prostaty až sedmkrát. Poškozený gen *BRCA1* zdvojnásobuje riziko vzniku tohoto onemocnění u mužů mladších 65 let. Zárodečné varianty *BRCA1* a *BRCA2* spojeny s onemocněním vyšší agresivity, což se projevuje nižším stupněm diferenciaci a vyšším stadiem v době diagnózy. Kromě toho jsou varianty *BRCA1* a *BRCA2* významně spojeny se zvýšeným rizikem recidivy, progresu do metastatického onemocnění a úmrtí na karcinom prostaty.

Je také pozorováno zvýšené riziko vzniku karcinomu pankreatu u nositelů variant genu *BRCA1* i *BRCA2*. Karcinom prsní žlázy se může vyskytovat i u mužů, ale jeho incidence je stokrát nižší než u žen. Rizikové faktory jsou shodné s těmi u žen a zahrnují vyšší věk, nádorové onemocnění prsu v rodině, vystavení se vyššímu množství estrogenů nebo ionizačnímu záření, neplodnost nebo obezitu.

BRCA (BReast CAncer) jsou tumor supresorové geny. Produkty těchto genů se účastní kontroly buněčného cyklu a oprav poškozené DNA. Proteiny p*BRCA1* a p*BRCA2* se nachází v jádře. Obsahují vazebné domény, které jim umožňují interagovat s dalšími proteiny. Prokázanou Klasifikace: Veřejné

interakcí je vazba s produktem genu RAD51. Na poškození DNA zareaguje produkt genu ATM. Proteinkinasa ATM spustí fosforylační kaskádu, během níž se fosforyluje protein pBRCA1. Ten následně interaguje s proteinem pRAD51, který se účastní oprav dvouřetězcových zlomů DNA procesem homologní rekombinace. Protein pBRCA2 také interaguje s tímto komplexem. Jeho úlohou je transportovat pRAD51 do místa poškození.

Při tvorbě knihovny je používáno amplifikační obohacení. Pokud by se zjistila jakákoliv odchylka, např. nedostatečné množství osekvenovaných readů, jejich horší kvalita, nedostatečné pokrytí jednotlivých úseků apod., sekvenační běh se opakuje.

V případě nalezení patologické či suspektně patologické varianty analýzou NGS dat, se její přítomnost potvrzuje Sangerovým sekvenováním.

V rámci hodnocení NGS dat jsou filtry nastaveny tak, aby byly analyzovány pouze výše uvedené geny vyžádané lékařem. Nedochází tedy k sekundárním/nevyžádaným nálezům.

Referenční hodnoty:

Nalezené varianty řadíme dle účinku do kategorií: patologická, suspektně patologická, varianta nejasného významu, suspektně benigní a varianta benigní. Nalezené varianty jsou detailněji popsány v závěrečné zprávě.

Varianty suspektně benigní nebo benigní vydáváme ke zprávě na vyžádání.

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1 x 45 dnů

Doba odezvy: 45 pracovních dnů

Karcinom prsu, vaječníků a prostaty (MLPA) - *BRCA1* a *BRCA2* – vyšetření velkých genových přestaveb

BRCA1 (lokalizována na chromozomu 17) a *BRCA2* (na chromozomu 13) jsou dva tumor supresorové geny kódující proteiny, které se přímo účastní oprav poškozené DNA a tím kontrolují růst a dělení buněk. Varianty v těchto genech, resp. v jejich exonech, jsou korelovány se zvýšeným rizikem vzniku hereditárních karcinomů prsů a vaječníků. V obou genech byla popsána celá řada variant jak patogenních, tak nepatogenních (změny bez vlivu na funkci genu). Tyto varianty se přitom nachází v rámci celé délky obou genů, nestačí se tudíž zaměřit jen na konkrétní varianty v několika pozicích. Správný diagnostický postup však zahrnuje sekvenování všech 23 exonů (*BRCA1*), resp. 27 exonů (*BRCA2*). V obou genech se také vyskytují delece velkého rozsahu, které jsou jednoznačně patologické. Proto je sekvenční vyšetření doplněno také o vyšetření velkých přestaveb obou genů. Tato diagnostika je doplněna o vyšetření delecí exonů 1 a 9 genu *CHEK2* a vyšetření 2 indel variant. V genu *BRCA2* je to varianta c.156_157insAlu a v genu *CHEK2* varianta c.1100delC.

Referenční hodnoty:

bez dup/del: v genu či jeho části nebyla nalezena duplikace ani delece.

del: v genu či jeho části byla nalezena delece, která je popsána v rámci Závěru výsledkového listu.

dup: v genu či jeho části byla nalezena duplikace, která je popsána v rámci Závěru výsledkového listu.

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x 45 dnů

Doba odezvy: 45 pracovních dnů

Karcinom prsu a vaječníků - rozšířený NGS panel 21 genů (analýza celých genů, jejich kódujících oblastí a míst sestřihu: ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CDK12, FAM175A, FANCD2, CHEK2, MRE11, MSH6, NBN, PALB2, PMS2, RAD51B, RAD54L, TP53, RAD50, RAD51C, RAD51D)

Karcinom prsu je v ČR nejčastějším zhoubným nádorem u žen (incidence přibližně 100 žen ze 100 tis. ročně), avšak vzácně onemocní i muži, kteří tvoří necelé 1 % nemocných. Existuje řada faktorů, které jsou spojeny se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu prsu u žen. Patří sem faktory genetické, hormonální, nutriční a faktory zevního prostředí. Nejdůležitějším rizikovým faktorem je však věk. Jejich incidence totiž začíná výrazně stoupat v období kolem 30. roku a nádory objevující se ve věku nad 45 let představují valnou většinu.

Z genetických faktorů jsou nejvýznamnější především varianty v genech *BRCA1* a *BRCA2*, které jsou autosomálně dominantní a inaktivace jedné kopie genu má patogenní efekt. Proteiny *BRCA1* a *BRCA2* jsou spojeny s aktivací reparace dvouřetězcových zlomů a homologní rekombinace a jsou důležité v udržování stability genomu. Poškození genu *BRCA1* se zvýšeně objevuje právě u karcinomu prsu, vaječníků (HBOC; hereditary breast and ovarian cancer) a v menší míře též u mužů s karcinomem prostaty. Přenašečky mají celoživotní riziko, že onemocní karcinomem prsu (55-85 %) nebo karcinomem vaječníků (15-45 %). Porucha genu *BRCA2* je spojená obvykle s horší prognózou.

Nádory vaječníků a vejcovodů představují asi 15 % všech zhoubných novotvarů u žen. Příčina vzniku nádorů vaječníků není známa. Významná role se však připisuje ženským pohlavním hormonům a jejich vlivu na ovulaci. Proto užívání hormonální antikoncepce, které blokuje ovulaci, vede ke snížení rizika nádorového bujení. Zda toto snížení rizika trvá i po ukončení užívání hormonální antikoncepce, není známo.

Jsou známy i dědičné formy nádorů vaječníků. Tím jsou ohroženy nejvíce ženy s patogenní variantou genů *BRCA1* a *BRCA2*. Tyto nádory postihují mladší ženy do 40 let věku. Obecně postihují zhoubné nádory vaječníků nejčastěji ženy ve věku mezi 50 a 75 lety.

U mužů varianty v genu *BRCA2* zvyšují riziko rakoviny prostaty až sedmkrát. Poškozený gen *BRCA1* zdvojnásobuje riziko vzniku tohoto onemocnění u mužů mladších 65 let. Zárodečné varianty *BRCA1* a *BRCA2* spojeny s onemocněním vyšší agresivity, což se projevuje nižším stupněm diferenciací a vyšším stadiem v době diagnózy. Kromě toho jsou patogenní varianty *BRCA1* a *BRCA2* významně spojeny se zvýšeným rizikem recidivy, progresu do metastatického onemocnění a úmrtí na karcinom prostaty.

Je také pozorováno zvýšené riziko vzniku karcinomu pankreatu u nositelů patogenní variant genů *BRCA1* i *BRCA2*.

Karcinom prsní žlázy se může vyskytovat i u mužů, ale jeho incidence je stokrát nižší než u žen. Rizikové faktory jsou shodné s těmi u žen a zahrnují vyšší věk, nádorové onemocnění prsu

v rodině, vystavení se vyššímu množství estrogenů nebo ionizačnímu záření, neplodnost nebo obezitu.

BRCA (BRCA1 a BRCA2) jsou tumor supresorové geny. Produkty těchto genů se účastní kontroly buněčného cyklu a oprav poškozené DNA. Proteiny pBRCA1 a pBRCA2 se nachází v jádře. Obsahují vazebné domény, které jim umožňují interagovat s dalšími proteiny. Prokázanou interakcí je vazba s produktem genu *RAD51*. Na poškození DNA zareaguje produkt genu *ATM*. Proteinkinasa ATM spustí fosforylační kaskádu, během níž se fosforyluje protein pBRCA1. Ten následně interaguje s proteinem pRAD51, který se účastní oprav dvouřetězcových zlomů DNA procesem homologní rekombinace. Protein pBRCA2 také interaguje s tímto komplexem. Jeho úlohou je transportovat pRAD51 do místa poškození.

Bylo prokázáno, že BRCA1 interaguje s MSH proteiny. Tyto MSH proteiny se podílejí na opravách lézí DNA vzniklých v důsledku spontánních chyb během replikace DNA, na opravách poškozené DNA a opravě dvouřetězcových zlomů DNA. BRCA1 hraje roli při řízení transkripce genů a nejnověji bylo popsáno, že se podílí i na ubikvitinaci (BRCA1-BARD1 komplex). Zárodečné varianty genu pro E-cadherin (*CDH1*, membrány epiteliálních buněk) jsou spojeny s karcinomem žaludku ale i s dědičnou predispozicí ke karcinomu prsu. Podle nových studií jsou i varianty v genu *PMS2* spojeny se zvýšeným rizikem rakoviny prsu. *TP53* je nádorový supresorový gen, který je často mutován u různých druhů rakoviny včetně rakoviny prsu. Změny v tomto genu vedou ke změně exprese různých genů, které jsou přímo nebo nepřímo pod transkripční kontrolou p53.

Při tvorbě knihovny je používáno amplifikační obohacení. Pokud by se zjistila jakákoliv odchylka, např. nedostatečné množství osekvenovaných readů, jejich horší kvalita, nedostatečné pokrytí jednotlivých úseků apod., sekvenační běh se opakuje.

V případě nalezení patologické či suspektně patologické varianty analýzou NGS dat, se její přítomnost potvrzuje Sangerovým sekvenováním.

V rámci hodnocení NGS dat jsou filtry nastaveny tak, aby byly analyzovány pouze výše uvedené geny vyžádané lékařem. Nedochází tedy k sekundárním/nevyžádaným nálezům.

Referenční hodnoty:

Nalezené varianty řadíme dle účinku do kategorií: patologická, suspektně patologická, varianta nejasného významu, suspektně benigní a varianta benigní. Nalezené varianty jsou detailněji popsány v závěrečné zprávě.

Varianty suspektně benigní nebo benigní vydáváme ke zprávě na vyžádání.

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1 x 45 dnů

Doba odezvy: 45 pracovních dnů

Karcinom prostaty - rozšířený NGS panel 26 genů (analýza celých genů, jejich kódujících oblastí a míst sestřihu: AKT1, APC, AR, ATM, BRAF, BRCA1, BRCA2, CDH1, CDK12, CTNNB1, HOXB13, CHEK2, IDH1, KRAS, MED12, MLH1, MSH2, MSH6, MYC, PIK3CA, PIK3R1, PMS2, PTEN, RB1, SPOP, TP53)

Karcinom prostaty je třetí nejčastější zhoubné nádorové onemocnění mužů v ČR (po karcinomu plic a tlustého střeva). Tvoří asi 4 % všech nádorů. Existují výrazné geografické a rasové rozdíly. V ČR je incidence přibližně 100:100 tis. a stoupá s věkem. Mezi rizikové faktory, pro rozvoj onemocnění patří věk (ze sekce vyplývá, že 70 % mužů starších než 90 let má alespoň jedno ložisko karcinomu prostaty), genetické faktory (předpokládá se, že až u 9 % je to AD dědičnost, vyšší riziko mají přímí příbuzní prvního stupně postiženého), faktory hormonální – působení DHA (dihydroandrosteron), testosteron nemá přímý vztah ke kancerogenezi, ale může se podílet na manifestaci, dieta (vysoký příjem živočišných tuků, červené maso), sexuální aktivita (promiskuita a pohlavně přenosné choroby) a faktory profesionální (expozice RTG záření, pesticidy, některé těžké kovy).

Většina případů rakoviny prostaty je pomalu rostoucí. Rakovinné buňky se mohou šířit do jiných částí těla, zejména do kostí a lymfatických uzlin. Zpočátku nemusí vyvolávat žádné příznaky. Když se objeví, jsou často podobné příznakům nezhoubného zbytnění prostaty. Patří k nim časté močení, nokturie (zvýšené močení v noci), potíže se zahájením a udržením stálého proudu moči. V pozdějších stádiích patří mezi příznaky bolest nebo potíže s močením, krev v moči nebo bolest v pánvi či zádech. K dalším pozdním příznakům patří únava způsobená nízkou hladinou červených krvinek. Přibližně 99 % případů se objevuje po 50. roce věku. Diagnostika se provádí pomocí biopsie. K posouzení, zda jsou přítomny metastázy, lze provést lékařské zobrazovací vyšetření.

Epidemiologické studie prokázaly, že rodinná anamnéza rakoviny prostaty významně zvyšuje její riziko. Příbuzný prvního stupně s tímto onemocněním zvyšuje riziko dvakrát až třikrát. Studie dvojčat ukázaly, že rakovina prostaty patří mezi nejvíce dědičná nádorová onemocnění; studie GWAS (Genome-wide association studies) identifikovaly mnoho lokusů asociovaných s rakovinou prostaty. Genomické studie identifikovaly rodinné varianty v genu *HOXB13* a v genech pro opravu DNA, jako je *BRCA2*, *ATM*, *CHEK2*, *BRCA1*, *RAD51D* a *PALB2*. Kromě toho byly pozorovány rozdíly ve výskytu rakoviny prostaty u mužů z různých rasových/etnických skupin, což lze částečně přičíst genetickým faktorům. Genetické změny v signálních drahách AR, PI3K-PTEN, WNT, změny v opravě DNA a mnohé další byly popsány u všech metastazujících karcinomů prostaty, ale i u velké části primárních karcinomů.

Další geny, které jsou zapojeny do mutageneze rakoviny prostaty:

APC – antagonist signalizační dráhy WNT, zapojen také do dalších buněčných procesů jako je migrace, adheze, transkripční aktivace a apoptóza.

AR – steroidním hormonem aktivovaný transkripční faktor, který je velmi důležitý pro vývoj; amplifikace a varianty genu přispívají k rozvoji rakoviny prostaty a selhání ADT (androgen deprivation therapy) tím, že je neustále aktivována AR signální dráha.

ATM – jeden z hlavních kontrolorů buněčného cyklu, nutný pro odpověď organismu na poškození DNA a udržení stability genomu.

BRCA1, BRCA2 – hrají klíčovou roli při transkripci, opravě dvouřetězcových zlomů a rekombinaci DNA.

PTEN – role v supresi PI3K–AKT–mTOR signální dráhy, kterou je regulováno buněčné přežití, proliferace a hospodaření s energií.

RBI – negativní regulátor buněčného cyklu, stabilizuje konstitutivní heterochromatin pro udržení jeho celkové struktury.

SPOP – součást BTB-CUL3-RBX1 E3 ubikvitin-protein ligázového komplexu; varianty SPOP způsobují stabilizaci onkogenních substrátů, jako jsou JNK, NCOA3, DEK a BET proteiny.

TP53 – reguluje odpověď na buněčný stres, expresi genů, zahrnutých v zastavení buněčného cyklu, apoptóze a opravě DNA.

Při tvorbě knihovny je používáno amplifikační obohacení. Pokud by se zjistila jakákoliv odchylka, např. nedostatečné množství osekvenovaných readů, jejich horší kvalita, nedostatečné pokrytí jednotlivých úseků apod., sekvenační běh se opakuje.

V případě nalezení patologické či suspektně patologické varianty analýzou NGS dat, se její přítomnost potvrzuje Sangerovým sekvenováním.

V rámci hodnocení NGS dat jsou filtry nastaveny tak, aby byly analyzovány pouze výše uvedené geny vyžádané lékařem. Nedochází tedy k sekundárním/nevyžádaným nálezům.

Referenční hodnoty:

Nalezené varianty řadíme dle účinku do kategorií: patologická, suspektně patologická, varianta nejasného významu, suspektně benigní a varianta benigní. Nalezené varianty jsou detailněji popsány v závěrečné zprávě.

Varianty suspektně benigní nebo benigní vydáváme ke zprávě na vyžádání.

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1 x 45 dnů

Doba odezvy: 45 pracovních dnů

Kolorektální karcinom a karcinom pankreatu - NGS panel 16 genů (analýza celých genů, jejich kódujících oblastí a míst sestřihu: *APC, BRAF, BRCA1, BRCA2, CTNNB1, KRAS, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, MYC, PIK3CA, PMS2, PTEN, STK11, TP53*)

Kolorektální karcinom (CRC) je nádorové onemocnění trávicího systému postihující tlusté střevo a konečník. Riziko rozvoje onemocnění CRC je asi 4–5 % a toto riziko je spojeno s věkem, chronickými onemocněními a životním stylem. CRC je také způsobeno patogenními variantami v onkogenech, tumor supresorových genech a genech souvisejících s mechanismy opravy DNA. Podle původu varianty lze kolorektální karcinomy klasifikovat jako sporadické (70 %); vrozené (5 %) a familiární (25 %).

Molekulární patogeneze sporadického karcinomu je heterogenní, protože varianty mohou cílit na různé geny, zejména geny jako *c-MYC, KRAS, BRAF, PIK3CA, PTEN* mohou být použity jako prediktivní markery pro výsledek pacienta. Přibližně 70 % případů CRC však následuje po specifické posloupnosti variant, které jsou poté převedeny do specifické morfologické sekvence, počínaje tvorbou adenomu a konče karcinomem. První patogenní změna se vyskytuje v *APC*, tumor supresorovém genu, spouštějícím tvorbu nemaligních adenomů, nazývaných také polypy. Přibližně 15 % těchto adenomů se během 10 let změni v karcinom. Po této *APC* patogenní změně následují patogenní změny v *KRAS* a *TP53*.

Vrozené typy rakoviny jsou způsobeny zděděnými patogenními variantami, které ovlivňují jednu z alel mutovaného genu, což znamená, že bodová varianta v druhé alele spustí vznik nádorové buňky a následně karcinomu. Aby bylo možné vytvořit přesnější klasifikaci vrozených nádorů, byly stanoveny dvě skupiny, polypózní a nepolypózní formy. Polypózní varianta zahrnuje především familiární adenomatózní polypózu (FAP), která je charakterizována tvorbou mnohočetných potenciálně maligních polypů v tlustém střevě. Naproti tomu dědičný nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC) souvisí s patogenními variantami v genech zapojených v mechanismech opravy DNA. Hlavní příčinou HNPCC je Lynchův syndrom, který je způsoben dědičnými patogenními variantami v jedné z alel kódujících proteiny opravy DNA, jako jsou *MSH2, MLH1, MLH6* a *PMS2*. Lynchův syndrom lze nalézt u 2–3 % všech případů kolorektálního karcinomu, a je proto nejčastějším syndromem ve skupině HNPCC. Familiární kolorektální karcinom představuje přibližně 25 % všech případů a je také způsoben dědičnými patogenními variantami, ačkoli sám o sobě není klasifikován jako dědičný karcinom, protože nemůže být zahrnut do žádné dědičné varianty karcinomu.

Špatná včasná diagnóza u karcinomu slinivky břišní byla dříve připisována pozdním příznakům. V průběhu let se zlepšila diagnostika rakoviny slinivky břišní, což může být spojeno s pokrokem v zobrazovacích technikách a také s rostoucími znalostmi o genetice. Ke zvýšenému riziku rakoviny slinivky břišní přispívají rizikové faktory: kouření, nadváha, obezita, expozice chemikáliím (benzen, petrochemie, barviva a pesticidy), věk, pohlaví, rasa,

rodinná anamnéza, dědičné genetické syndromy, cukrovka, chronická pankreatitida, cirhóza jater, žaludeční problémy, diety, káva a alkohol.

APC – antagonist signalizační dráhy WNT, zapojen také do dalších buněčných procesů jako je migrace, adheze, transkripční aktivace a apoptóza.

BRAF – kóduje kinasu umístěnou v EGFR signální dráze za KRAS. Nejčastěji variantou BRAF je missense varianta (V600E), která vede k aberantní aktivaci MEK-ERK dráhy a CRC karcinogenezi. Předpokládá se, že v případě nádorů bez varianty (wt) genu KRAS může mít varianta BRAF prediktivní/prognostickou roli v odpovědi na anti-EGFR léčiva.

BRCA1, *BRCA2* – hrají klíčovou roli při transkripci, opravě dvouřetězcových zlomů a rekombinaci DNA.

CTNGB1 – β -Catenin hraje klíčovou roli v signalizaci Wnt kaskáda. β -Catenin je mutován až u 10 % všech sporadický kolorektální karcinom. Bylo zjištěno, že buňky obsahující mutantní APC mají zvýšené hladiny β -kateninu a 80 % případů rakoviny tlustého střeva mají APC varianty.

KRAS – patří do rodiny RAS (retrovirus associated DNA sequences) původně izolovaných z myších sarcoma virů. Sekvence všech RAS genů jsou vysoce konzervovány a mají podobnou exon intronovou strukturu. Proteinovým produktem je p21 protein s vnitřní GTPázovou aktivitou. Je součástí signálních buněčných kaskád, které zprostředkovávají přenos signálů z aktivovaných receptorů do buněčného jádra, a tak stimulují buněčnou proliferaci a diferenciaci.

MLH1, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* – Lynchův syndrom je autozomálně dominantně dědičný syndrom, který je způsoben zárodečnými patogenními variantami genů pro reparaci DNA, jako jsou *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* a *PMS2*. 90% variant CRC je v genech *MLH1* a *MLH2*. Gen *PMS2* poskytuje instrukce pro tvorbu proteinu, který hraje zásadní roli při opravě DNA (při replikaci DNA).

MUTYH – patogenní varianty v genu *MUTYH* jsou asociovány se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu tlustého střeva a žaludku (*MUTYH*-asociovaná polypóza). Jedná se o autosomálně recesivní onemocnění a příčinou mohou být jak velké genové přestavby, tak bodové patogenní varianty. Až 70 % pacientů s MAP je nositelem alespoň jedné z variant p.Tyr179Cys nebo p.Gly396Asp.

MYC – indukuje tumor genezi tím, že obchází kontrolní body buněčné proliferace, apoptózy a/nebo stárnutí. Při supresi MYC jsou tyto bariéry obnoveny, což umožňuje trvalou regresi nádoru.

PIK3CA – katalytická podjednotka PI3K, je mutována v mnoha různých nádorech, včetně CRC. Varianta PIK3CA nalézáme u 10–20 % CRC, asi 80 % variant nalezených ve dvou hot spotech v exonu 9 a exonu 20. U CRC divokého typu *RAS* byly varianty *PIK3CA* spojeny s horším

klinickým výsledkem a negativní predikcí odpovědi na cílenou terapii anti-EGFR monoklonálními protilátkami. Varianty PIK3CA se jeví jako slibný prediktivní biomarker.

PTEN – role v supresi PI3K–AKT–mTOR signální dráhy, kterou je regulováno buněčné přežití, proliferace a hospodaření s energií.

STK11 (také nazývaný LKB1) - poskytuje instrukce pro tvorbu enzymu serin/threonin kináza 11. Tento enzym má roli nádorového supresoru.

TP53 – reguluje odpověď na buněčný stres, expresi genů, zahrnutých v zastavení buněčného cyklu, apoptóze a opravě DNA.

Při tvorbě knihovny je používáno amplifikační obohacení. Pokud by se zjistila jakákoliv odchylka, např. nedostatečné množství osekvenovaných readů, jejich horší kvalita, nedostatečné pokrytí jednotlivých úseků apod., sekvenační běh se opakuje.

V případě nalezení patologické či suspektně patologické varianty analýzou NGS dat, se její přítomnost potvrzuje Sangerovým sekvenováním.

V rámci hodnocení NGS dat jsou filtry nastaveny tak, aby byly analyzovány pouze výše uvedené geny vyžádané lékařem. Nedochozí tedy k sekundárním/nevyžádaným nálezům.

Referenční hodnoty:

Nalezené varianty řadíme dle účinku do kategorií: patologická, suspektně patologická, varianta nejasného významu, suspektně benigní a varianta benigní. Nalezené varianty jsou detailněji popsány v závěrečné zprávě.

Varianty suspektně benigní nebo benigní vydáváme ke zprávě na vyžádání.

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1 x 45 dnů

Doba odezvy: 45 pracovních dnů

Kolorektální karcinom – Lynchův syndrom (MLPA) – geny *MLH1*, *MSH2*, *PMS2*, *EPCAM*, *MSH6* a *MUTYH* – vyšetření velkých genových přestaveb

Nádory tlustého střeva a konečníku patří k nejčastějším nádorovým onemocněním, z nichž dědičný podklad má Lynchův syndrom (dědičný nepolypózní kolorektální karcinom; HNPCC) a familiární adenomatózní polypóza (FAP). Tyto dva syndromy se podílejí na vzniku karcinomu tlustého střeva pouze u 5 % případů, přesto 90-95 % pacientů s dědičnou formou karcinomu tlustého střeva má genetický podklad.

Příčinou jsou varianty v některém z genů kódujících proteiny účastníci se oprav chybného párování bazí v DNA („mismatch repair“ geny, MMR), nejčastěji se jedná o geny *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *MUTYH*, *EPCAM* a *PMS2*. Karcinomy tlustého střeva spadající pod Lynchův syndrom se vyznačují časným nástupem u pacienta (věk 40-45 let) a častějším vícečetným výskytem v době diagnózy (10 % pacientů). Celoživotní riziko onemocnění karcinomem tlustého střeva je ~ 80 %. Odhadovaný podíl různých genů na Lynchově syndromu je 15-40 % *MLH1*, 20-40 % pro *MSH2*, 12-35 % pro *MSH6*, 5-25 % pro *PMS2* a <10 % pro *EPCAM*.

Referenční hodnoty:

bez dup/del: v genu či jeho části nebyla nalezena duplikace ani delece.

del: v genu či jeho části byla nalezena delece, která je popsána v rámci Závěru výsledkového listu.

dup: v genu či jeho části byla nalezena duplikace, která je popsána v rámci Závěru výsledkového listu.

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x 45 dnů

Doba odezvy: 45 pracovních dnů

Kolorektální karcinom - polypózní (MLPA) - gen APC - vyšetření velkých genových přestaveb

Nádory tlustého střeva a konečníku patří k nejčastějším nádorovým onemocněním, z nichž dědičný podklad má Lynchův syndrom (dědičný nepolypózní kolorektální karcinom; HNPCC) a familiární adenomatózní polypóza (FAP). Tyto dva syndromy se podílejí na vzniku karcinomu tlustého střeva pouze u 5 % případů, přesto 90-95 % pacientů s dědičnou formou karcinomu tlustého střeva má genetický podklad.

Familiární adenomatózní polypóza (FAP) je dědičný syndrom predisponující pacienta ke karcinomu tlustého střeva. Jedná se o autosomálně dominantní onemocnění způsobené germinálními patogenními variantami v genu APC. Předpokládá se, že 8-12 % všech patogenních variant genu APC tvoří velké přestavby, které nelze standardní sekvenční analýzou odhalit.

Dalším syndromem se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu tlustého střeva a žaludku je MUTYH-asociovaná polypóza (MAP). Jedná se o autosomálně recesivní onemocnění a příčinou mohou být jak velké genové přestavby, tak bodové patogenní varianty. Až 70 % pacientů s MAP je nositelem alespoň jedné z variant p.Tyr179Cys nebo p.Gly396Asp.

Duplikace v upstreamové oblasti genu GREM1 vede ke vzniku onemocnění HMPS1 (Dědičný syndrom smíšené polypózy 1), které je též predispoziční pro vznik kolorektálního karcinomu.

Referenční hodnoty:

bez dup/del: v genu či jeho části nebyla nalezena duplikace ani delece.

del: v genu či jeho části byla nalezena delece, která je popsána v rámci Závěru výsledkového listu.

dup: v genu či jeho části byla nalezena duplikace, která je popsána v rámci Závěru výsledkového listu.

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x 45 dnů

Doba odezvy: 45 pracovních dnů

KREC/TREC - vyšetření primárních imunodeficiencí - SCID a XLA

Mezi primární imunodeficeince patří více než 200 různých nemocí, jejichž klinické příznaky mohou být velmi variabilní (lehké problémy až život ohrožující). I proto je velmi důležité mít spolehlivou metodu detekce těchto onemocnění již v raném dětství dříve, než dítě ztratí protilátkovou ochranu od své matky. Metodika detekce TREC (T-cell receptor excision circles) postavená na základě PCR (polymerázová řetězová reakce) se v současné době ukazuje jako ideální metoda pro identifikaci pacientů trpících těžkou kombinovanou imunodeficiencí (SCID). Stejně tak detekce KREC (Kappa-deleting excision circles) dokáže spolehlivě identifikovat pacienty s agamaglobulinemiemi. Oba přístupy jsou přitom založeny na základě identifikace správného vývoje T- i B-lymfocytů daného pacienta. Jelikož jsou obě tyto onemocnění život ohrožující stavy, vzhledem k častým a těžko léčitelným infekcím, je včasná identifikace obou skupin pacientů velmi důležitá s ohledem na možnosti jejich léčby a kvality jejich následného života.

Toto vyšetření by mělo být provedeno také u dětí, u nichž bude probíhat očkování živou, tzv. atenuovanou, vakcínou (TBC a rotaviry), abychom si byli jisti, že je jejich imunitní systém v pořádku.

Referenční hodnoty:

Detekovány (zdravý jedinec) / Nedetekovány (suspektní imunodeficeince)

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x týdně

Doba odezvy: 7 pracovních dnů

Laktózová intolerance – varianty -13910C>T a -22018G>A v genu *LCT*

Jako laktózovou intoleranci označujeme částečnou nebo úplnou neschopnost trávicího traktu zpracovávat laktózu. Jedná se o enzymatickou poruchu (absence enzymu laktáza), kterou nelze zaměňovat s alergií na kravské mléko, tedy autoimunitním onemocněním, kdy se v organismu tvoří specifické protilátky vůči mléčné bílkovině kasein. Příznaky u obou těchto onemocnění jsou však velmi podobné. Enzym laktáza – phlorizin hydroláza je kódována genem *LCT*, který je lokalizován na druhém chromozomu, v oblasti 2q21. Kontrolní mechanismy exprese genu jsou asociovány s jednonukleotidovými záměnami – polymorfismy (-13910C>T, -22018G>A).

Složený mléčný cukr laktóza je pro lidský organismus vstřebatelný až po enzymatické hydrolýze na jednotlivé složky, tedy glukózu a galaktózu. Nerozštěpený a nevstřebaný cukr je ve střevě nadbytečný, dostává se do dalších částí zažívacího traktu, kde dochází k jeho kvašení.

V současné době se předpokládá, že je postižen přibližně každý šestý jedinec v populaci. U jižních národů a černé rasy je četnost postižení mnohonásobně vyšší. Absence laktázy v organismu může mít různé příčiny. Primární příčinou je geneticky podmíněné snižování produkce tohoto enzymu. Nazývá se adultní, tedy dospělý typ laktózové intolerance. Syntéza enzymu přirozeně klesá zhruba od dvou let věku. Vzácný je vrozený deficit laktázy, který se projeví ihned po narození. Sekundární příčinou vzniku intolerance k laktóze je poškození sliznic střeva jinými vlivy, především infekčními průjmovými onemocněními, užíváním některých léků (antibiotik), a také některými chronickými onemocněními střeva, jako je Crohnova nemoc nebo celiakie.

Referenční hodnoty:

Určení genotypů v lokusech -13910C>T a -22018G>A:

- genotypy C/C a G/G = laktózová intolerance – hypolaktázie
- genotypy C/T nebo T/T a G/A nebo A/A = tolerance laktózy

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x týdně

Doba odezvy: 7 pracovních dnů

LTA (C804A) – silně prozánětlivý faktor spojen s koronárními onemocněními

Lymfotoxin – alfa, jako člen tumor nekrotické rodiny cytokinů, byl původně izolován na základě své protinádorové aktivity. Později bylo prokázáno, že tento cytokin vykazuje zánětlivé a imunologické aktivity. Gen *LTA* je lokalizován v rámci třetí třídy hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) na chromozómu 6p21.3. Zánětlivý proces hraje přední roli při vzniku aterosklerózy, což je nejrizikovějším faktorem pro cévní příhody. Zdá se, že *LTA* jako zánětlivý cytokin se exprimuje v aterosklerotických lézích. V této souvislosti byla nalezena spojitost mezi polymorfizmem C804A (T26N) v genu pro *LTA* a koronárními a cerebrovaskulárními příhodami.

Referenční hodnoty:

Negat. - negativní = nemutovaný homozygot = *wild type* = *wt / wt*;

Heteroz. – heterozygot = *wt / mut*;

Homozyg. - mutovaný homozygot = *mut / mut*;

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x týdně

Doba odezvy: 10 pracovních dnů

Metabolismus antikoagulancií, antidepresiv, antiepileptik, inhibitorů protonové pumpy, antikonvulziv, hypnotik, sedativ, antimalarik, antiretrovirik, antimykotik aj. (gen *CYP2C19* alely *1, *2, *3, *17)

CYP2C19 je klinicky významný enzym, který se podílí na biotransformaci řady léčiv ze skupiny antidepresiv (fluxetin, citalopram), antikoagulancií (klopidogrel, warfarin), antiepileptik (fenytoin, karbamazepin), antihistaminik (cetirizin, loratadin), antimykotik (flukonazol a itraconazol) a inhibitorů protonové pumpy (omeprazol a lansoprazol). Pomalí metabolizátoři jsou v kavkazské populaci nejčastěji nositeli alely *2 a *3 a ultrarychlá metabolizace je spojována s alelou *17.

Závažné následky mají vedlejší účinky související s léčbou klopidogrelem. Klopidogrel je velmi účinné antiagregans, jehož účinek je založen na nevratné inhibici P2RY12 receptoru destiček. Jde o proléčivo, které je aktivováno komplexem cytochromu P450, převážně formou CYP2C19. Rozdíly v odpovědi k působení klopidogrelu vyplývající z farmakogenetiky, tj. z genotypu pacienta, spolu s lékovými interakcemi výsledně ovlivňují terapeutickou odpověď.

CYP2C19 je *1 normální alela neboli alela "divokého typu" s frekvencí výskytu v populaci západní Evropy 0,63. Alely CYP2C19 *2 a *3 jsou nejčastější alely se ztrátou funkce (LoFA) a nositelé jedné z nich (tj. *1/*2 nebo *1/*3) jsou označováni jako "intermediární" metabolizátoři a produkují tak méně aktivního metabolitu. Zatímco každý jedinec, který je nositelem dvou LoFA, je pomalý metabolizátor. Naopak CYP2C19 *17 je nejčastější alela se zvýšenou funkcí a je spojena se zvýšenou přeměnou na aktivní metabolit.

Často je vyšetřován společně s *CYP2D6*.

Referenční hodnoty:

Negat. - negativní = nemutovaný homozygot = *wild type* = wt / wt; normální metabolizátor (CYP2C19*1/*1)

Heteroz. – heterozygot = wt / mut; intermediární metabolizátor (CYP2C19*1/*2; CYP2C19*1/*3), ultrarychlý metabolizér (CYP2C19*1/*17)

Homozyg. - mutovaný homozygot = mut / mut; pomalý metabolizátor (CYP2C19*2/*2; CYP2C19*3/*3), ultrarychlý metabolizér (CYP2C19*17/*17)

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1 x týdně

Doba odezvy: 7 pracovních dnů

Metabolismus léčiv, např. kodeinu, tramadolu, antidepresiv, analgetik, antipsychotik aj. (stanovení rychlosti metabolismu léčiv a vhodnosti jejich užívání s ohledem na genotyp genu CYP2D6)

CYP2D6 je jedním z farmakogenů (kódující enzym z rodiny cytochromů P450), který hraje klíčovou roli v metabolismu léků v těle. Je vysoce polymorfní a podílí se na metabolismu až 25 % běžně používaných léčiv (vč. velké části antidepresiv, antipsychotik, anxiolytik, antiarytmik, opiátů apod.).

V současnosti je popsáno více jak 130 haplotypů, které řadíme do fenotypových skupin na základě funkce kódovaného enzymu (normální funkce, nulová funkce, snížená nebo zvýšená funkce). Vliv na funkci enzymu mají jak genové varianty typu SNV a indelů, tak i delece či duplikace celého genu.

Rozlišujeme čtyři typy metabolizátorů a to pomalé, střední, normální a ultrarychlé metabolizátory. Rozdíly v sérových hladinách léků mohou být u jednotlivých osob s různým diplotypem až desetinásobné. To vede k rozdílné účinnosti léčiv v závislosti na genetické predispozici. Léky proto mohou způsobovat u predisponovaných osob vážné nežádoucí účinky, nebo mohou být naopak zcela neúčinné.

Často je vyšetřován společně s *CYP2C19* (ovlivňují metabolismus až 1/3 léčiv).

Referenční hodnoty:

Negativní – dvě alely se standardní aktivitou enzymu; normální metabolizátor

Pozitivní – patologická (snížená až nulová nebo zvýšená) aktivita enzymu; pomalý, střední nebo ultrarychlý metabolizátor

CYP2D6 enzym	CYP2D6 haplotyp	Activity Score
normální funkce	*1, *2, *35, *39	1
snížená funkce	*9, *14, *17, *29, *41	0,5
	*10	0,25
nulová funkce	*3, *4, *5, *6, *7, *8, *11, *12, *15, *40, *58, *114	0
zvýšená funkce	více než dvě funkční alely (př. *1x2, *2x2)	2

Fenotyp	celkové Activity Score pacienta
Ultrarychlý metabolizátor	> 2,25
Normální metabolizátor	1,25 - 2,25
Střední metabolizátor	0,25 - 1
Pomalý metabolizátor	0

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x za 14 dnů

Doba odezvy: 20 pracovních dnů

Metabolismus mědi – vyšetření nejčastějších patogenních variant v genu *ATP7B*

Porucha metabolismu mědi nazývaná také jako Wilsonova choroba (OMIM#277900) je autozomálně recesivní dědičné onemocnění způsobené patogenními variantami v genu *ATP7B* v lokusu 13q14. Patogenní varianty jsou příčinou dysfunkce proteinu měď transportující ATPázy, způsobující poruchu vylučování mědi z hepatocytů do žluče a její hromadění v mozku, játrech, CNS a v řadě dalších orgánů. Patogenní varianty se mohou vyskytovat ve kterémkoliv z 21 exonů tohoto genu nebo v přilehlých nekódujících regulačních oblastech. Nejčastější patogenní varianta způsobuje záměnu histidinu za glutamin v pozici 1069 (c.3207C>A, p.His1069Gln), kterou nese ve střední Evropě asi 50 až 60 % nemocných. Spolu s dalšími 7 nejčastějšími patogenními variantami: c.3402del (p.Ala1135Glnfs*13), c.2336G>A (p.Trp779*), c.2332C>G (p.Arg778Gly), c.1340_1343del (p.Gln447Leufs*50), c.2304dup (p.Met769Hisfs*26), c.3649_3654del (p.Val1217_Leu1218del) a c.3190G>A (p.Glu1064Lys) je odpovědná za 70 % případů Wilsonovy choroby v ČR (Vrabelova et al, 2005).

Referenční hodnoty:

Negat. - negativní = nemutovaný homozygot = *wild type* = *wt / wt*;

Heteroz. – heterozygot = *wt / mut*;

Homozyg. - mutovaný homozygot = *mut / mut*;

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x za 14 dnů

Doba odezvy: 20 pracovních dnů

Metabolismus myorelaxans, např. suxamethonia, mivacuria (gen *BCHE* alely *A*, *K*, *F1*, *F2*, *S1*)

Butyrylcholinesterasa (*BCHE*), také známá jako pseudocholinesterasa, je enzym podílející se na metabolismu svalových relaxantů využívajících se při chirurgické anestezii jako jsou suxamethonium (sukcinylcholin) a mivacurium. Snížená aktivita tohoto enzymu má za následek vyšší plazmatickou koncentraci léčiva, což může vést k delší paralýze svalstva, postanestetické apnoe a dechové depresi s nutností plicní ventilace. Nositeli alel se sníženou katalytickou aktivitou jsou až 4 % kavkazské populace.

Nejběžnější varianta, která ovlivňuje množství enzymu je *BCHE K* (Kalow). Tato varianta *K* je spojena s mírnějším, asi 30% snížením aktivity enzymu ve srovnání s wild type variantou. Mezi další genetické varianty vedoucí k pseudocholinesterázové deficienci patří varianty *BCHE A* (atypická), *BCHE F1* a *BCHE F2*. Tyto missence varianty jsou spojeny s vážným, 60-70% snížením aktivity enzymu v důsledku zhoršení katalytické vlastnosti enzymu. Varianta *A* se většinou vyskytuje ve vazbě s variantou *K* (cis forma) a má vážnější klinický význam než samostatná varianta *K*. Varianta *BCHE S1* se nazývá tichá (silent-1) a jedná se o frameshift variantu, z takové alely poté nevzniká aktivní enzym.

Referenční hodnoty:

Negat. - negativní = nemutovaný homozygot = *wild type* (WT) = wt / wt;

Heteroz. – heterozygot (HET) = wt / mut;

Homozyg. - mutovaný homozygot (MUT) = mut / mut;

Výsledek (Fenotyp)	Kritéria (detekované varianty)
normální aktivita enzymu	WT ve všech sledovaných variantách
mírná <i>BCHE</i> deficience	HET pro variantu <i>K</i> , ostatní varianty WT
středně těžká <i>BCHE</i> deficience	HET pro jednu z variant <i>A</i> , <i>F1</i> , <i>F2</i> nebo <i>S1</i>
středně těžká <i>BCHE</i> deficience	MUT pro variantu <i>K</i> , ostatní varianty WT
těžká <i>BCHE</i> deficience	MUT pro jednu z variant <i>A</i> , <i>F1</i> , <i>F2</i> nebo <i>S1</i>
těžká <i>BCHE</i> deficience	HET pro dvě a více z variant <i>A</i> , <i>F1</i> , <i>F2</i> nebo <i>S1</i>

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1 x týdně

Doba odezvy: 7 pracovních dnů

Metabolismus Thiopurinů – stanovení genotypu ovlivňujícího metabolismus thiopurinů (gen TPMT alely *1, *2, *3A, *3B, *3C)

Thiopurinové deriváty jsou široce používány pro léčbu akutní leukémie, pro imunosupresivní léčbu pacientů po orgánové transplantaci a pro léčbu chronických zánětlivých onemocnění (např. Crohnova choroba, revmatoidní artritida). Aromatické a heterocyklické sulfhydrylové komponenty thiopurinových léčiv, včetně 6-thioguaninu, 6-merkaptopurinu a azathioprinu, jsou metabolizovány v organizmu přes S-metylace, katalyzovanou enzymem přítomným v cytosolu – thiopurin S-metyltransferázou (TPMT). Dostatečná aktivita TPMT hraje klíčovou roli při biodegradaci thiopurinů, které určují efekt léčiv a vznik vedlejších nežádoucích účinků při jejich odbourávání, jako je neurotoxicita, hepatotoxicita, myelosuprese a záněty sliznic.

Snížená metabolická aktivita enzymu TPMT je důsledkem přítomnosti funkčních polymorfizmů v kódující oblasti genu *TPMT*, z nichž mezi nejčastější deficitní alely v evropské populaci patří TPMT*2 (varianty G238C), TPMT*3A (varianty G460A a A719G), TPMT*3B (varianty G460A) a TPMT*3C (A719G).

Klinické projevy deficitu TPMT mohou být závažné pro pacienty, kteří jsou heterozygoty nebo homozygoty pro funkčně variantní alely.

Referenční hodnoty:

Negat. - negativní = nemutovaný homozygot = *wild type* = wt / wt; *1/*1

Heteroz. – heterozygot = wt / mut; *1/*2; *1/*3A; *1/*3B; *1/*3C; *2/*3A; *2/*3B; *2/*3C; *3A/*3B; *3A/*3C; *3B/*3C

Homozyg. - mutovaný homozygot = mut / mut; *2/*2; *3A/*3A; *3B/*3B; *3C/*3C

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x týdně

Doba odezvy: 7 pracovních dnů

Metabolismus Warfarinu - stanovení genotypu ovlivňujícího dávkování warfarinu (polymorfismy v cytochromu *CYP2C9**1, *2, *3, a genu *VKORC1*)

Warfarin patří mezi antikoagulační léky s vysokou interindividuální variabilitou v dávkování. S-warfarin je převážně metabolizován polymorfním cytochromem P450 CYP2C9. Enzym cytochrom P450 CYP2C9 (rodina 2, podrodina C, polypeptid 9), kódovaný genem na chromozómu 10 (10q24), je členem superrodiny enzymů P450. Proteiny P450 jsou monooxygenázy, které katalyzují mnoho reakcí zahrnující metabolismus drog a syntézu cholesterolu, steroidů a dalších lipidů. Cytochrom P450 CYP2C9 je produkován v játrech a je zodpovědný za 50 % epoxygenázové aktivity v lidských játrech. V buňkách se tento protein nachází v endoplazmatickém retikulu.

Dosud bylo identifikováno dvacet čtyři alel, z nichž klinicky nejvýznamnější jsou alely CYP2C9*2 a CYP2C9*3. Tyto alelické varianty jsou známy tím, že zvyšují antikoagulační efekt warfarinu a snižují denní dávky potřebné pro zachování INR v terapeutickém rozsahu. V alele CYP2C9*2 dochází k nukleotidové substituci (tranzice C za T v pozici 430 ve 3. exonu) tak, že se ve výsledném polypeptidovém řetězci na místě 144 nachází místo argininu cystein [R144C], a v polypeptidovém řetězci kódovaném alelou CYP2C9*3 se na místě 359 nachází místo izoleucinu leucin [I359L] (tranzice A za C v pozici 1075 v 7. exonu nukleotidového řetězce), na rozdíl od běžné alely CYP2C9*1. Mezi populacemi však existují rozdíly v distribucích jednotlivých alel. V „bílé“ populaci se frekvence alely CYP2C9*2 pohybuje v rozmezí 8–12,5 % a frekvence alely CYP2C9*3 v rozmezí 3–8,5 %.

Nižší dávkování warfarinu se uplatňuje u nositelů jedné nebo dvou polymorfních alel (*2, *3) než u nositelů dvou běžných alel (*1).

Gen *VKORC1*, který je lokalizován na chromozomu 16p12-q21, kóduje hlavní podjednotku transmembránového proteinu – vitamin K epoxid reduktázu (VKOR) o velikosti 163 aminokyselin. Komplex VKOR recykluje vitamin K 2,3-epoxid na vitamin K hydrochinon, který je esenciálním kofaktorem posttranslační γ -karboxylace koagulačních faktorů FII, FVII, FIX, FX a proteinů C, S a Z. V genu *VKORC1* byly zjištěny dva nejčastější polymorfizmy: 1173 C>T lokalizovaný v intronu 1 a -1639 G>A nacházející se v promotorové oblasti. U těchto dvou polymorfismů byla prokázána těsná vazba, a proto je zcela dostačující detekce jedné varianty, v tomto případě varianty -1639 G>A.

Efekt polymorfismů CYP2C9 a *VKORC1* na velikost denní dávky warfarinu potřebné k udržení terapeutického rozmezí se navzájem potencuje. Cca 20% populace patří k vysoce rizikové skupině lidí s genotypem wt / mut. -1639 G•A nebo mut. -1639 G•A / mut. -1639 G•A v genu pro *VKORC1*, kteří současně nesou alespoň jednu polymorfní alelu (*2, *3) v genu pro CYP2C9. Tito pacienti jsou ve vysokém riziku předávkování warfarinem, zejména v úvodu léčby.

Referenční hodnoty:

Negat. - negativní = nemutovaný homozygot = *wild type* = wt / wt; *1/*1

Heteroz. – heterozygot = wt / mut; *1/*2; *1/*3; *2/*3

Homozyg. - mutovaný homozygot = mut / mut; *2/*2; *3/*3

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x týdně

Doba odezvy: 7 pracovních dnů

Metabolismus xenobiotik – schopnost detoxikačních enzymů odbourávat karcinogeny, volné radikály, toxiny a léčiva (varianty genu *GST*: *GST-T1*, *GST-M1*, *GST-P1*)

Glutathion S-transferázy (GST), dříve známé jako ligandiny, jsou rodinou eukaryotických a prokaryotických metabolických izoenzymů fáze II, které jsou známé svou schopností katalyzovat konjugaci redukované formy glutathionu (GSH) na xenobiotické substráty za účelem detoxikace. Jsou aktivní v játrech, mozku, ledvinách, slinivce aj. Geny kódující tyto enzymy jsou vysoce polymorfní. Genetické varianty mohou změnit individuální vnímavost vůči karcinogenům a toxinům, a také ovlivnit toxicitu a účinnost určitých léků. Jedinci s homozygotní delecí *GST-M1*0* nebo *GST-T1*0* (tzv. nulový genotyp) postrádají jakýkoliv funkční protein *GST-M1* nebo *GST-T1*. Frekvence těchto nulových genotypů je u bělošské populace okolo 50 % pro *GST-M1* a okolo 20 % pro *GST-T1*. Pro *GST-P1* jsou důležité 2 genetické polymorfismy: záměna c.313A>G, rs1695, která vede k p.Ile105Val a ke snížení aktivity enzymu (Moyer et al., 2008). Frekvence mutantních homozygotů v bělošské populaci je přibližně 10 %, heterozygotů 43 % (Sharma et al., 2014). Záměna c.341C>T, rs1138272, která vede k p.Ala114Val je méně častá a vede k méně stabilnímu enzymu. Frekvence mutantních homozygotů je přibližně 0,8 %, heterozygotů 13 %. Kombinace obou SNP vede k alelám (haplotypům) mající různou enzymovou aktivitu (od vysoce omezené po normální). Genotypování má smysl při: *Personalizaci léčby* (určení genetické predispozice k vyšší/toxické expozici aktivní látky či jejím metabolitům, úprava dávky nebo výběr alternativního léku, u pacientů s polymorbiditou a polyfarmacií, u jedinců s anamnézou špatné snášenlivosti léků). *Onkologická terapie* (předvídaní rizika vedlejších účinků cytostatik, či chemoterapie např. oxaliplatinu, cisplatinu, doxorubicin, busulfan). *Ochrana zdraví u rizikových profesí* (screening pracovníků v chemickém průmyslu nebo zdravotnictví, možná ochranná opatření u jedinců s nulovým genotypem). Pacienti s defektními nebo méně účinnými variantami genů *GST-T1*, *GST-M1* a *GST-P1* mají sníženou schopnost detoxikace léčiv, což může vést k hromadění toxických metabolitů, vyšší toxicitě léčby, zvýšenému oxidačnímu stresu, případně nižší účinnosti léčby, pokud je detoxikace nezbytná pro aktivaci nebo odstranění léčiva.

Referenční hodnoty:

Negativní = bez nálezu predisponujícího genotypu ve všech testovaných polymorfismech *GST-T1*, *GST-M1* a *GST-P1*.

Pozitivní = predisponující genotyp, *GST-T1*0* nulový genotyp a/nebo *GST-M1*0* nulový genotyp či snížená enzymová aktivita *GST-P1*

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x za 14 dnů

Doba odezvy: 20 pracovních dnů

MPL – myeloproliferativní neplasie (nejčastější varianty v exonu 10 genu MPL - W515L, W515K, W515A, S505N)

Chronické myeloproliferativní poruchy (CMPDs) představují velmi heterogenní skupinu onemocnění myeloidní řady krvetvorných buněk. Při diferenciální diagnostice se uplatní především detekce tří molekulárních změn. Jsou to vyšetření fúzního genu *BCR-ABL*, genu *JAK2* (V617F a varianty v exonu 12) a detekce variant W515K a W515L v genu *MPL*. *BCR-ABL/Ph1* charakterizuje především chronickou myeloidní leukémií (CML) a *JAK2* varianta se naopak vyskytuje u *BCR-ABL/Ph1* negativních myeloproliferativních chorob, především u Polycytemia vera (PV), esenciální trombocytémie (ET) či idiopatické myelofibrózy (CIMF). Základním rysem MPN je deregulace dráhy JAK/STAT. Kromě variant v genu *JAK2* byly objeveny varianty v dalších genech, které se nacházejí u pacientů s *JAK2* negativní MPN a ovlivňují epigenetickou kontrolu genové exprese a rovněž sestřih RNA. Mezi ně patří inzerce/delece v exonu 9 genu pro Calreticulin (*CALR*) a varianty v exonu 10 genu *MPL*. *MPL* kóduje receptor pro trombopoetin, klíčový růstový faktor a faktor přežití pro megakaryocyty. *MPL* varianta W515L je nejčastější variantou u *JAK2* V617F-negativních PMF pacientů, k dalším substitucím patří W515K, W515A a S505N. Naší metodikou jsme schopni detekovat všechny tyto čtyři specifické nejčastější varianty v genu *MPL*.

Molekulární testování specifických variant v genech *JAK2*, *CALR* a *MPL* jsou součástí diagnostických kritérií WHO (2017) pro primární myelofibrózu a esenciální trombocytémii.

Referenční hodnoty:

Negativní – v genu *MPL* nebyla detekována žádná z testovaných variant.

Pozitivní – v genu *MPL* byla detekována patogenní varianta; popis nalezené varianty

Analytická senzitivita použitého testu je 1 % mutovaných alel, resp. 5 % u varianty S505N.

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x 20 dnů

Doba odezvy: 20 pracovních dnů

Myeloidní panel - DNA (vyšetření nejčastějších somatických variant v DNA u pacientů s AML, MDS, MPN, CML, aj.)

Myeloidní malignity jsou heterogenní skupina onemocnění, která je charakterizovaná nadměrnou tvorbou buněk myeloidní krevní řady (zahrnuje tvorbu bílých krvinek granulocytů, červených krvinek a krevních destiček). Nadměrná tvorba jednoho typu krvinek vede k vytlačování ostatních z kostní dřeně, ke snižování jejich tvorby a tím i poklesu jejich počtu v periferní krvi. Příznaky onemocnění jsou tedy dány jak nadbytkem, tak i nedostatkem krvinek, ale i poruchou jejich funkce.

Mezi myeloidní onemocnění se řadí akutní myeloidní leukémie (AML), myelodysplastický syndrom (MDS), myeloproliferativní onemocnění (MPN), chronická myeloidní leukémie (CML), chronická myelomonocytická leukémie (CMML) a juvenilní myelomonocytická leukémie (JMML).

Akutní myeloidní leukémie (AML) patří do skupiny zhoubných onemocnění krvetvorné tkáně charakterizované hromaděním abnormálních nezralých buněk (blastů) a útlakem krvetvorby v kostní dřeni rychle se množícími nádorovými buňkami. V krvi je snížený počet normálních červených krvinek (vzniká anémie – chudokrevnost), krevních destiček (zvýšené riziko krvácení) a také je zde méně funkčních bílých krvinek, což vede ke snížení obranyschopnosti nemocných, kteří jsou více náchylní k infekcím. AML tvoří až 80 % akutních leukémií u dospělých a 15-20 % u dětí. Jejich výskyt narůstá s věkem a nejčastěji postihuje jedince nad 60 let.

Chronická myeloidní leukémie (CML) – obvykle postihuje dospělé nad 65 let a představuje asi 15-20 % nově zjištěných leukémií. Pacienti s CML často nemají žádné příznaky a bývají diagnostikováni náhodně při běžném screeningovém vyšetření. Neléčená CML vede k anémii, snížení imunity, krvácení, tvorbě modřin a značnému zvětšení sleziny.

Tato získaná onemocnění krvetvorné tkáně jsou charakteristická monoklonální proliferací a jejich příčinou bývají somatické varianty v klíčových genech signálních drah. Úkolem laboratoře je analyzovat klíčové geny těchto drah a detekovat sekvenční varianty či fúzní geny tak, aby pacient mohl být diagnostikován a mohla mu být nabídnuta cílená léčebná strategie či sledována minimální reziduální choroba (relaps, remise, progresse).

Naší metodikou analyzujeme biologický materiál pacienta na úrovni DNA a jsme schopni genetickou nálož i kvantifikovat.

Pomocí našeho testu můžeme vyšetřovat varianty ve 45 cílových genech na úrovni DNA. Vyšetření je použitelné pro studium hlavních myeloidních onemocnění včetně AML, MDS, MPN, CML, CMML a JMML. V jediném testu se zaměřujeme na analýzu hlavních onkologických markerů, mezi něž patří např. FLT3-ITD, CEBPA, JAK2, CALR, TP53, NPM1 a IDH1/2.

Mutační analýzu provádíme u těchto genů: *ANKRD26, ABL1, BRAF, CBL, CSF3R, DDX4, DNMT3A, FLT3-ITD-TKD, GATA2, HRAS, IDH1, IDH2, JAK2, KIT, KRAS, MPL, MYD88, NPM1, NRAS, PPM1D, PTPN11, SMC1A, SMC3, SETBP1, SF3B1, SRSF2, U2AF1, WT1, ASXL1, BCOR, CALR, CEBPA, ETV6, EZH2, IKZF1, NF1, PHF6, PRPF8, RB1, RUNX1, SH2B3, STAG2, TET2, TP53 a ZRSR2.*

Referenční hodnoty:

Negativní – patogenní/pravděpodobně patogenní varianta/přestavba nebyla nalezena

Pozitivní – patogenní/pravděpodobně patogenní/přestavba byla nalezena

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x za 45 dnů

Doba odezvy: 45 pracovních dnů

Myeloidní panel - RNA (vyšetření nejčastějších somatických genových fúzí a abnormální exprese u pacientů s AML, MDS, MPN, CML, aj.)

Myeloidní malignity jsou heterogenní skupina onemocnění, která je charakterizovaná nadměrnou tvorbou buněk myeloidní krevní řady (zahrnuje tvorbu bílých krvinek granulocytů, červených krvinek a krevních destiček). Nadměrná tvorba jednoho typu krvinek vede k vytlačování ostatních z kostní dřeně, ke snižování jejich tvorby a tím i poklesu jejich počtu v periferní krvi. Příznaky onemocnění jsou tedy dány jak nadbytkem, tak i nedostatkem krvinek, ale i poruchou jejich funkce.

Mezi myeloidní onemocnění se řadí akutní myeloidní leukémie (AML), myelodysplastický syndrom (MDS), myeloproliferativní onemocnění (MPN), chronická myeloidní leukémie (CML), chronická myelomonocytická leukémie (CMML) a juvenilní myelomonocytická leukémie (JMML).

Akutní myeloidní leukémie (AML) patří do skupiny zhoubných onemocnění krvetvorné tkáně charakterizované hromaděním abnormálních nezralých buněk (blastů) a útlakem krvetvorby v kostní dřeni rychle se množícími nádorovými buňkami. V krvi je snížený počet normálních červených krvinek (vzniká anémie – chudokrevnost), krevních destiček (zvýšené riziko krvácení) a také je zde méně funkčních bílých krvinek, což vede ke snížení obranyschopnosti nemocných, kteří jsou více náchylní k infekcím. AML tvoří až 80 % akutních leukémií u dospělých a 15-20 % u dětí. Jejich výskyt narůstá s věkem a nejčastěji postihuje jedince nad 60 let.

Chronická myeloidní leukémie (CML) – obvykle postihuje dospělé nad 65 let a představuje asi 15-20 % nově zjištěných leukémií. Pacienti s CML často nemají žádné příznaky a bývají diagnostikováni náhodně při běžném screeningovém vyšetření. Neléčená CML vede k anémii, snížení imunity, krvácení, tvorbě modřin a značnému zvětšení sleziny.

Tato získaná onemocnění krvetvorné tkáně jsou charakteristická monoklonální proliferací a jejich příčinou bývají somatické varianty v klíčových genech signálních drah. Úkolem laboratoře je analyzovat klíčové geny těchto drah a detekovat sekvenční varianty či fúzní geny tak, aby pacient mohl být diagnostikován a mohla mu být nabídnuta cílená léčebná strategie či sledována minimální reziduální choroba (relaps, remise, progresse).

Naší metodikou analyzujeme biologický materiál pacienta na úrovni RNA a jsme schopni genetickou nálož i kvantifikovat.

Pomocí našeho testu můžeme vyšetřovat fúze 35 řídicích genů na úrovni RNA (>700 unikátních fúzí). Vyšetření je použitelné pro studium hlavních myeloidních onemocnění včetně AML, MDS, MPN, CML, CMML a JMML.

Fúze analyzujeme u genů *ABL1*, *ABL2*, *BCL2*, *BRAF*, *CCND1*, *CREBBP*, *EGFR*, *ETV6*, *FGFR1*, *FGFR2*, *FUS*, *HMGA2*, *JAK2*, *KAT6A-MOZ*, *KAT6B*, *KMT2A*, *KMT2A-PTDs*

MECOM, MET, MLLT10, MRTFA-MKL1, MYBL1, MYH11, NTRK2, NTRK3, NUP214, NUP98, PAX5, PDGFRA, PDGFRB, RARA, RUNX1, TCF3, TFE3 a ZNF384.

Referenční hodnoty:

Negativní – patogenní/pravděpodobně patogenní varianta/přestavba nebyla nalezena

Pozitivní – patogenní/pravděpodobně patogenní/přestavba byla nalezena

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x za 45 dnů

Doba odezvy: 45 pracovních dnů

Nádorové syndromy - NGS panel 50 genů (analýza celých genů, jejich kódujících oblastí a míst sestřihu: AKT1, APC, AR, ATM, ATR, BARD1, BLM, BRAF, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CDK12, CTNNB1, EPCAM, FAM175A, FANCD2, GATA3, GEN1, HOXB13, CHEK2, IDH1, KRAS, MED12, MLH1, MRE11, MSH2, MSH6, MUTYH, MYC, NBN, NF1, PALB2, PIK3CA, PIK3R1, PMS2, PTEN, RAD50, RAD51B, RAD51C, RAD51D, RAD54L, RB1, RET, SPOP, STK11, TP53, VHL, WT1, XRCC2)

Hereditární nádorové syndromy představují skupinu nádorových onemocnění, u kterých lze pozorovat silný vliv dědičnosti na jejich rozvoj. Některé diagnózy nádorových onemocnění opravdu mají tendenci vyskytovat se v určitých rodinách opakovaně. Typicky se jedná například o nádory prsu či tlustého střeva.

Důležité je ovšem upozornit, že naprostá většina nádorů není dědičných, ale vznikají tzv. **sporadicky**, tedy bez rozhodující dědičné příčiny. Samotný proces onkogeneze je zdlouhavý a mnohostupňový; genetická predispozice může tento proces podstatně urychlit; jako jiné predispozice se ale rovněž uplatnit nemusí. V případě hereditárních nádorových syndromů je ovšem genetická predispozice často natolik silná, že vede k rozvoji příslušného onemocnění ve velké většině případů.

Pro hereditární nádorové syndromy jsou charakteristické následující projevy:

- Opakovaný výskyt příslušného nádorového onemocnění v rodině.
- Nízký věk při diagnóze nádorového onemocnění (často 35 let i méně!).
- Vícenásobný či opakovaný výskyt nádorového onemocnění u postižené osoby.

Z hlediska genetické patogeneze jsou hereditární nádorové syndromy spojeny s:

- Patogenními variantami tumor-supresorových genů
- Patogenními variantami mutátorových genů
- Některými geneticky podmíněnými chorobami a komplexními syndromy

Typicky jde zejména o varianty tumor-supresorových genů. Tyto varianty mají recesivní charakter, tedy ke kompletnímu vyřazení tumor-supresorového genu je zapotřebí vyřazení (patogenní změna) obou alel tohoto genu (tzv. Knudsonova teorie dvou zásahů). Z hlediska klinické genetiky se tyto hereditární nádorové syndromy ovšem dědí **autozomálně dominantně** (byť s neúplnou penetrancí). Důvodem je skutečnost, že vrozená (zárodečná) varianta příslušného tumor-supresorového genu je výrazným rizikem pro rozvoj příslušného onemocnění, které se tak rozvíjí u naprosté většiny osob s příslušnou zárodečnou variantou.

Nejčastější hereditární nádorové syndromy, které jsou v rámci této analýzy vyšetřovány:

Syndrom Li-Fraumeni (OMIM: 151623), varianty tumor-supresorového genu **TP53** (17p13.1) a genu **CHEK2** (22q12.1)

Hereditární karcinom prsu a ovarii (OMIM: 114480), nejčastěji varianty genů *BRCA1* (17q21), *BRCA2* (13q12.3), *BARD1* (2q35), *BRIP1* (17q23.2), *PALB2* (16p12.2), *RAD50* (5q31.1), *RAD51C* (17q22), *RAD51D* (17q12), *ATM* (11q22-q23), *CDK12* (17q12), *FAM175A* (4q21.23), *FANCD2* (3p25.3), *CHEK2* (22q12.1), *MRE11* (11q21), *NBN* (8q21), *RAD51B* (14q24.1), *RAD54L* (1p34.1), *TP53* (17p13.1), *CDHI* (16q22.1), *MSH6* (2p16), *PMS2* (7p22.2), *ABRAXAS1* (4q21.23), *GATA3* (10p14), *MRE11* (11q21), *PIK3CA* (3q26.32)

Faconiho anemie, varianty genů *BRIP1* (17q23.2), *PALB2* (16p12.2), *RAD51C* (17q22), *FANCD2* (3p25.3) a *XRCC2* (7q36.1)

Familiární adenomatózní polypóza (OMIM: 175100), varianty genů *APC* (5q21-q22) a *MUTYH* (1p34.1)

Kolorektální karcinom, varianty v genech *APC* (5q21-q22), *BRAF* (7q34), *CTNNB1* (3p22.1), *KRAS* (12p12.1), *MLH1* (3p21.3), *MSH2* (2p22-p21), *MSH6* (2p16), *MYC* (8q24.21), *PIK3CA* (3q26.32), *PMS2* (7p22.2), *PTEN* (10q23.3), *STK11* (19p13.3), *EPCAM* (2p21), *TP53* (17p13.1), *KRAS* (12p12.1) a *BRAF* (7q34)

Cowdenův syndrom (OMIM: 58350), varianty genu *PTEN* (10q23.31) nebo *BMPRIA* (10q22.3)

Peutz–Jeghersův syndrom (OMIM: 175200), varianty genu *STK11* (19p13.3)

Familiární karcinom žaludku (OMIM: 192090), varianty genu *CDHI* (16q22)

Ataxia teleangiectasia (OMIM: 208900), varianty genu *ATM* (11q22.3)

Nijmegen breakage syndrom (OMIM: 251260), varianty genů *NBN* (8q21.3), *RAD50* (5q31.1)

Neurofibromatóza typu 1 (OMIM:162200), varianty genu *NFI* (17q11.2)

Bloomův syndrom (OMIM: 210900), varianty genu *BLM* (RECQL3, 15q26.1)

Hereditární karcinom prostaty (OMIM: 176807), varianty genů *AKT1* (14q32.33), *APC* (5q21-q22), *AR* (Xq12), *ATM* (11q22-q23), *BRAF* (7q34), *BRCA1* (17q21), *BRCA2* (13q12.3), *CDHI* (16q22.1), *CDK12* (17q12), *CTNNB1* (3p22.1), *HOXB13* (17q21.32), *CHEK2* (22q12.1), *IDH1* (2q34), *KRAS* (12p12.1), *MED12* (Xq13.1), *MLH1* (3p21.3), *MSH2* (2p22-p21), *MSH6* (2p16), *MYC* (8q24.21), *PIK3CA* (3q26.32), *PIK3R1* (5q13.1), *PMS2* (7p22.2), *PTEN* (10q23.3), *RBI* (13q14.2), *SPOP* (17q21.33), *TP53* (17p13.1)

Burkitův lymfom (OMIM 113970), varianty genů *PIK3R1* (5q13.1) a *RET* (10q11.21)

Retinoblastom (OMIM: 180200), varianty genu *RBI* (13q14.2)

Karcinom ledviny (OMIM: 144700), varianty genu *VHL* (3p25.3)

Wilmsův tumor (OMIM: 194070), varianty genu *WT1* (11p13)

Při tvorbě knihovny je používáno amplifikační obohacení. Pokud by se zjistila jakákoliv odchylka, např. nedostatečné množství osekvenovaných readů, jejich horší kvalita, nedostatečné pokrytí jednotlivých úseků apod., sekvenační běh se opakuje.

V případě nalezení patologické či suspektně patologické varianty analýzou NGS dat, se její přítomnost potvrzuje Sangerovým sekvenováním.

V rámci hodnocení NGS dat jsou filtry nastaveny tak, aby byly analyzovány pouze výše uvedené geny vyžádané lékařem. Nedochozí tedy k sekundárním/nevyžádaným nálezům.

Referenční hodnoty:

Nalezené varianty řadíme dle účinku do kategorií: patologická, suspektně patologická, varianta nejasného významu, suspektně benigní a varianta benigní. Nalezené varianty jsou detailněji popsány v závěrečné zprávě.

Varianty suspektně benigní nebo benigní vydáváme ke zprávě na vyžádání.

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1 x 45 dnů

Doba odezvy: 45 pracovních dnů

Narkolepsie – průkaz predispozičního haplotypu DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602

Narkolepsie je chronická neurologická porucha, kdy mozek není schopen správně regulovat cyklus spánku a bdění. Postižený člověk upadá náhle během dne do spánku nebo trpí extrémní ospalostí, bez ohledu na spánek předchozí noci. Ospalost se nedá vůlí potlačit. Postižení mohou také trpět kataplexií, hypnagogickými halucinacemi či spánkovou obrnou. Průměrně je přitom touto chorobou postiženo přibližně 0,02 až 0,18 % běžné populace.

Narkolepsie je způsobena selektivní ztrátou neuronů produkující hypokretin v hypothalamu. Již dlouho je známa asociace tohoto onemocnění s HLA systémem. 85-95 % všech pacientů s narkolepsií je nositeli specifického haplotypu HLA DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602 oproti 30 % nositelů v běžné populaci. Největší asociace byla přitom dokázána u nositelů alely DQB1*0602, která se vyskytuje až u 98 % všech narkoleptických pacientů. Narkolepsie tedy může být s vysokou pravděpodobností vyloučena u pacientů, u kterých alela DQB1*0602 nebyla nalezena. Nicméně v případě nalezení této alely se diagnóza narkolepsie musí potvrdit ještě dalšími diagnostickými postupy.

Referenční hodnoty:

Vysoká predispozice k narkolepsii:

Přítomnost alely DQB1*06:02, příp. kompletního predispozičního genotypu DRB1*15:01-DQA1*01:02-DQB1*06:02

U PACIENTA(KY) BYLA NALEZENA ALELA DQB1*06:02 ASOCIOVANÁ S NARKOLEPSIÍ.

Doporučujeme vyšetřit i příbuzné prvního stupně (rodiče, děti, sourozence) vzhledem ke genetickému riziku predispozice k narkolepsii.

Upozornění: Tento výsledek nelze interpretovat jako potvrzení narkolepsie. Diagnózu je potřeba potvrdit dalšími diagnostickými postupy.

Narkolepsie vysoce nepravděpodobná (bez predispozice):

U PACIENTA(KY) NEBYLA NALEZENA ALELA DQB1*06:02.

Výsledek s vysokou pravděpodobností diagnózu narkolepsie vylučuje.

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x týdně

Doba odezvy: 10 pracovních dnů

Osteoporóza – přítomnost predispozičních alel v genech *VDR* a *COL1A1*

Osteoporóza je generalizované onemocnění kostí, charakteristické redukcí denzity kostí a porušenou strukturou tkáně skeletu. To především u starších pacientů a postmenopauzálních žen zvyšuje riziko zlomenin. Osteoporóza má složitou etiologii. Na onemocnění se podílí celá řada faktorů, jako je způsob výživy, celkový životní styl a hormonální vlivy. Silně se však uplatňuje i uplatňuje genetická složka. Testy provedené na dvojčatech ukázaly, že genetické faktory jsou odpovědné za 80% variability v hustotě kostí.

V současnosti je popsáno několik polymorfismů, které jsou spojeny s úbytkem kostní tkáně, a tudíž se zvýšeným rizikem osteoporózy. Mezi hlavní přítom patří polymorfismus popsaný Morrisonem a kol., který je umístěn v přirozeně se vyskytujícím restriktivním místě restriktivního enzymu *BsmI* v intronu mezi exonem 8 a 9 genu receptoru vitamínu D (*VDR*) a polymorfismus nacházející se v regulačním regionu genu pro kolagen typu 1 (*COL1A1*), ve vazebném místě transkripčního faktoru Sp1.

***VDR* – gen receptoru vitamínu D:** Alela b je spojena s vyšší denzitou kostí, na rozdíl od alely B. Genotyp BB je spojen s významným zvýšením rizika zlomenin u starších lidí a také s výraznou ztrátou denzity kostí u ženských pacientek trpících časnou formou revmatoidní artritidy. Pacienti s genotypem BB ztrácejí přibližně 4,9 % denzity kostí v oblasti bederní páteře během období 36 měsíců, zatímco pacienti s genotypem bb ztrácejí pouze 0,1 %.

***COL1A1* – gen pro kolagen typu 1:** Alela s je spojena s nízkou denzitou kostí a se zvýšeným rizikem fraktur. U postmenopauzálních žen měly ženy s genotypem SS nebo Ss přibližně o 2% nižší denzitu kostí v krčku a bederní páteři. Ženy s genotypem ss měly denzitu krčku sniženou o 4 % a o 6 % sniženou denzitu v bederní páteři.

Referenční hodnoty:

Homozygot – b/b, S/S (bez zvýšeného rizika osteoporózy)

Heterozygot – B/b, s/S (s mírně zvýšeným rizikem osteoporózy)

Homozygot – B/B, s/s (se zvýšeným rizikem osteoporózy)

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x týdně

Doba odezvy: 20 pracovních dnů

Ověření konkrétní varianty

Ověření konkrétní varianty se u pokrevních příbuzných, nejčastěji prvního stupně (rodiče, sourozenci, děti) provádí s ohledem na potvrzení či vyvrácení nosičství dané sekvenční varianty po nálezů této varianty u probanda.

Pro správnou identifikaci sekvenční varianty uveďte referenční sekvenci dle hg19, symbol genu a přesný zápis varianty dle HGVS (např. NM_007294.4(BRCA1):c.3748G>T).

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x 45 dnů

Doba odezvy: 45 pracovních dnů

Predispozice k žilním trombózám

Faktor II Protrombin (G20210A)

Jednonukleotidová substituce G za A na místě 20210 v 3'-nepřekládané oblasti v genu pro protrombin (faktor II), která u postižených jedinců vyvolá zvýšení produkce protrombinu (jeho koncentrace v plazmě je pak • 130% normy), a tím i větší dispozici ke srážení krve.

Faktor V Leiden (G1691A)

Nejběžnější genetická predispozice k trombózám. Bodová varianta v podobě substituce nukleotidu G za A na místě 1691 v molekule DNA genu pro faktor V. Tato nukleotidová substituce má za následek substituci argininu za glutamin v peptidickém řetězci na místě 506. To má za následek rezistenci faktoru V k antikoagulační aktivitě APC (aktivovaný protein C).

Faktor V R2 (H1299R)

K dalším genetickým variantám faktoru V patří též tzv. haplotyp HR₂. Je vyvolán polymorfizmem A4070G v exonu 13 genu pro faktor V, který způsobí záměnu histidinu (R₁ alela) za arginin (R₂ alela) v místě 1299 B domény. Tato záměna je odpovědná za snížení hladiny faktoru V, kdy pokles k 20 % normálu způsobí mimo jiné i rezistenci na aktivovaný protein C. Defektní je zejména kofaktorová účast faktoru V pro inhibici aktivovaného faktoru VIII s aktivovaným proteinem C.

Faktor XIII (V34L)

Faktor XIII neboli fibrin stabilizující faktor je transglutamináza, skládající se z tetrametru dvou jednotek A a dvou jednotek B. Nukleotidová záměna C za T v exonu 2 genu F13A1 má za následek záměnu valinu za leucin v pozici 34 peptidického řetězce. Homozygoti pro tuto variantu vykazují významně vyšší aktivitu tohoto enzymu než jedinci bez varianty, zatímco heterozygoti vykazují střední aktivitu enzymu. Bylo prokázáno, že varianta Leu 34 má významný protektivní efekt proti žilnímu tromboembolizmu.

PAI-1 (4G/5G)

Inhibitor aktivátoru plazminogenu je základním inhibitorem tkáňového plazminogenového aktivátoru (tPA) a urokinázy (uPA), aktivátorů plazminogenu a tedy fibrinolýzy. V promotoru genu PLANH1, jež kóduje *PAI-1*, se vyskytuje polymorfizmus známý jako 4G/5G s tím, že alela 5G je méně transkripčně aktivní než alela 4G. Primární zvýšení hladiny PAI-1 je nalézáno u jedinců s polymorfizmem 4G/4G. Předpokládá se však, že tento polymorfizmus je spjat jen s vyšší incidencí tepenných trombóz.

MTHFR (C677T, A1298C)

Enzym 5,10-metylentetrahydrofolátreduktáza (*MTHFR*) je klíčovým enzymem v metabolismu homocysteinu. Vlivem bodových variant v genu pro *MTHFR* vzniká enzym se zvýšenou termolabilitou a sníženou aktivitou, což významně koreluje s vyšší hladinou homocysteinu v plazmě. Homocystein tak může přispět ke vzniku aterosklerózy a trombózy díky změně

v proliferaci cévních buněk a podporováním protrombotických aktivit v cévní stěně. Nejčastější a nejnámější variantou v genu pro *MTHFR* je substituce C za T v pozici 677, což má za následek substituci alaninu za valin na místě 223 v peptidickém řetězci. Homozygoti pro tuto variantu mají cca 30% a heterozygoti cca 65% aktivitu MTHFR oproti zdravým homozygotům. Druhou nejběžnější variantou je substituce A za C v pozici 1298, což má za následek substituci kys. glutamové za alanin na místě 429 v peptidickém řetězci. Tato varianta sama o sobě (ať už v homozygotní nebo heterozygotní formě) nemění plazmatickou hladinu ve zvýšené míře, ale u smíšeného heterozygota s C677T se stává rizikovým faktorem pro mírnější hyperhomocysteinémii.

Referenční hodnoty:

Negat. - negativní = nemutovaný homozygot = *wild type* = wt / wt; 1a / 1a

Heteroz. – heterozygot = wt / mut; 1a / 1b

Homozyg. - mutovaný homozygot = mut / mut; 1b / 1b

5G/ 5G – negativní = wild type = nemutovaný homozygot

4G / 5G – heterozygot

4G /4G – mutovaný homozygot

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1 – 2x týdně

Doba odezvy: 7 pracovních dnů

Prelinguální hluchota - vrozená nesyndromová ztráta sluchu (všechny varianty v kódující sekvenci a intronová varianta c.-23+1G>A genu GJB2)

Ztráta sluchu, případně částečná hluchota, je nejčastější lidskou smyslovou vadou. Může být vrozená nebo získaná. Vrozená nebo také prelinguální ztráta sluchu postihuje každého tisíciho novorozence a zhruba 60 % případů je geneticky determinováno. Většina genetických forem je podložena monogenně, s různým typem dědičnosti. Z toho 80 % geneticky podmíněných nesyndromových (izolovaných) ztrát sluchu se dědí autozomálně recesivně (AR). Asi u poloviny pacientů s AR typem dědičnosti jsou příčinou varianty v genu *GJB2* (gap junction beta-2 protein), který je umístěn na třináctém chromozomu, v oblasti 13q12. Je to gen pro transmembránový protein connexin 26 (Cx26), který je důležitou součástí transmembránových kanálů vnitřního ucha. V evropské populaci se vyskytuje jedna prevalentní varianta v tomto genu -35delG. Pro rómskou populaci je zase typická varianta W24X.

V naší laboratoři jsme schopni odhalit všechny varianty v kódující sekvenci genu *GJB2*. Zároveň vyšetřujeme sestřihovou variantu c.-23+1G>A v nekódující části genu, která je třetí nejčastější variantou u pacientů v ČR.

Referenční hodnoty:

Negat. - negativní = nemutovaný homozygot = *wild type* = *wt / wt*;

Heteroz. – heterozygot = *wt / mut*;

Homozyg. - mutovaný homozygot = *mut / mut*;

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x za 14 dnů

Doba odezvy: 20 pracovních dnů

Psoriáza – Lupénka – genetická predispozice HLA-C*06

Psoriáza (lupénka) je jedním z nejčastějších kožních neinfekčních onemocnění postihující kromě kůže i nehty a klouby (10-20 % pacientů). Vyskytuje se přibližně u 2-3% populace a postihuje téměř jakékoli místo na těle, včetně vlasové části hlavy a genitálií. Ne u všech pacientů jsou však její příznaky stejné. Nejčastější formou je psoriáza ložisková (psoriasis vulgaris). U pacientů jsou pozorována červená šupinatá ložiska na kůži, která se olupují především na loktech a kolenou. Na rozdíl od ekzému se psoriáza nejvíce projevuje na vnější (extenzorové) straně loktů a kolen. Při mírných formách choroby se na těle vyskytují nevelká ložiska červené kůže s bílými olupujícími se šupinami, v závažných případech však může olupující se pokožka pokrývat téměř celé tělo. V případě postižení kloubů (tzv. psoriatická artritida) se jedná o chronický zánět jednoho nebo více kloubů, který může vést až k deformaci kloubu a ztrátě jeho funkce.

Psoriáza je komplexní nemoc, jejíž vznik je ovlivněn genetickou predispozicí k nemoci, stavem imunitního systému (autoimunita) i faktory vnějšího prostředí (stres, infekce, hormonální vlivy atd.). Mezi nejdůležitější genetické rizikové faktory patří především přítomnost HLA-Cw6 alely v genomu pacienta. Nositelé HLA-Cw6 alely mají 10-krát zvýšené riziko propuknutí psoriázy oproti běžné populaci. U těchto pacientů byl také pozorován dřívější nástup nemoci, přičemž u žen se onemocnění projevilo dříve než u mužů. Častěji jsou u těchto pacientů pozorována také větší kožní ložiska postižená psoriázou, psoriáza se u nich léčí složitěji, mají větší incidenci tzv. Koebnerova fenoménu a psoriáza se u nich často zhoršuje během nebo po infekcích horních cest dýchacích. Tito pacienti však mají lepší odpověď na vystavení slunečnímu svitu. Naopak HLA-Cw6 negativní pacienti s psoriázou trpí častěji postižením nehtů a kloubů.

Referenční hodnoty:

Negat. - negativní = nepřítomnost alely HLA-C*06;

Pozit. - pozitivní = přítomnost alely HLA-C*06;

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x za týden

Doba odezvy: 10 pracovních dnů

Revmatoidní artritida - průkaz sdíleného epitopu u všech známých HLA-DRB1 alel a rozlišení homozygotů a heterozygotů

Revmatoidní artritida (RA), neboli chronická polyartritida, je systemické autoimunitní onemocnění, které postihuje přibližně 1% lidské populace. Etiologie tohoto onemocnění je neznámá, ale v mnoha studiích z posledních let se ukazuje, že existuje genetická predispozice pro RA způsobená alelami HLA-DRB1 regionu (HLA-DRB1*01, HLA-DRB1*04, HLA-DRB1*10 a HLA-DRB1*14).

Všechny s RA spojené alely HLA-DRB1 kódují ve svých třetích hypervariabilních regionech na pozici 70-74 aminokyseliny QKRAA, QRRAA nebo RRRAA. Tyto tzv. revmatoidní epitopy neboli **sdílené epitopy** jsou přítomné přibližně u 80-90 % pacientů s RA. Vedle vyššího rizika RA může být sdílený epitop také prognostickým markerem pro klinický průběh a závažnost tohoto onemocnění. Mnohé studie ukazují na tzv. dose-gene efekt. Pacienti homozygotní pro sdílený epitop mají závažnější průběh onemocnění než ti, kteří mají pouze jednu alelu sdíleného epitopu.

Navíc se ukazuje, že provedení genetického testování na přítomnost nebo absenci motivu sdíleného epitopu umožňuje lepší a vhodnější diagnostiku onemocnění, lepší volbu terapie a léčiva. Pacienti homozygotně pozitivní na sdílený epitop nevykazují dobré výsledky při podávání metotrexátu, oproti pacientům s heterozygotním genotypem nebo negativním na sdílený epitop. Pacienti homozygotní na sdílený epitop mají naopak lepší výsledky s jinými léčivy, jako je etanercept nebo při kombinované léčbě.

Referenční hodnoty:

Určení genotypu pacienta u alel HLA-DRB1: HLA-DRB1*01, HLA-DRB1*04, HLA-DRB1*10 a HLA-DRB1*14.

Určení přítomnosti a zygotnosti sdíleného epitopu (QKRAA / QRRAA / RRRAA) v genomu pacienta.

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x 14 dní

Doba odezvy: 20 pracovních dnů

Rezistence k viru HIV - varianta chemokinového receptoru CCR5

Chemokinové receptory hrají centrální roli v progresi infekčního onemocnění, jsou zahrnuty v aktivaci průchodu viru do buněk a usnadňují i jeho celkový vstup do buňky. Chemokinový receptor CCR5 hraje důležitou roli v imunitním systému, je ve velké míře exprimován na makrofázích a CD4 T-lymfocytech. Gen pro *CCR5* (NM_000579) leží na 3p21.3. Existuje 5 *CCR5* haplotypů, kdy *CCR5* – $\Delta 32$ alela je označována jako G*2 (rs333). Jedná se sekvenční variantu, kdy je v exonu 2 deletováno 32 bp. Homozygoti pro tuto sekvenční variantu jsou rezistentní k infekci virem HIV, u heterozygotů, kteří jsou HIV pozitivní, je propuknutí AIDS zpožděno o 2-3 roky. Homozygotů je v kavkazské populaci přibližně 1 %, heterozygotů je více jak 20 %. Funkčním základem rezistence k virové infekci je setrvání mutovaného proteinu v cytoplazmě a znemožnění jeho migrace k buněčnému povrchu. Během M-trofické fáze infekce virem HIV se totiž jeho transmembránový povrchový glykoprotein gp120 váže k *CCR5* na povrchu makrofágových buněk.

Referenční hodnoty:

Negat. - negativní = nemutovaný homozygot = *wild type* = +/+;

Heteroz. – heterozygot = +/-;

Homozyg. - mutovaný homozygot = -/-;

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x týdně

Doba odezvy: 10 pracovních dnů

Riziko myopatií při léčbě statiny – stanovení přítomnosti rizikové varianty v genu *SLCO1B1*

Statiny jsou nejčastěji předepisovanými hypolipidemiky pro snížení a kontrolu hladiny cholesterolu. Statiny patří k inhibitorům 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A (HMG-CoA) reduktázy. Inhibují klíčový enzym syntézy cholesterolu a tím je omezena intrahepatální syntéza cholesterolu. Obecně jsou považovány za bezpečné a dobře snášené. U některých pacientů se však objevují nežádoucí svalové problémy tzv. myopatie. Spektrum statinových myopatií se pohybuje od častých, klinicky benigních myalgii, zvýšení sérové kreatinkinázy, svalové slabosti až po nekrotizující myopatie, včetně autoimunitní nekrotizující myopatie indukované statiny a velmi vzácné rabdomyolýzy. V posledním desetiletí zaznamenáváme v České republice nárůst spotřeby statinů, hlavně atorvastatinu. Z těchto důvodů je vhodné zjištění diplo typu pacienta a podle něj následná úprava dávkování nebo výměna léčiva.

Testovaná riziková alela *5 genu *SLCO1B1*, vede k poruše funkce transportního proteinu, a tím ke sníženému jaternímu vychytávání a zvýšené plazmatické koncentraci statinů. Riziko myopatie např. u simvastatinu je 4x vyšší u heterozygotů a 17x vyšší u mutantních homozygotů. Mezi další rizikové faktory rozvoje statinové myopatie patří: vyšší věk, hypertenze, diabetes mellitus, onemocnění ledvin a jater, hypotyreóza, genetický polymorfismus CYP450 izoenzymů (*CYP2C19*, *CYP2D6* aj.), metabolické svalové choroby, alkohol, intenzivní cvičení, operace s velkou metabolickou zátěží a léky ovlivňující metabolismus statinů (možné nežádoucí lékové interakce).

Referenční hodnoty:

Negat. - negativní = nemutovaný homozygot = *wild type* = wt / wt; normální funkce OATP1B1 (*SLCO1B1**1/*1) – nízké riziko myopatie

Heteroz. – heterozygot = wt / mut; střední funkce OATP1B1 (*SLCO1B1**1/*5) – vysoké riziko myopatie

Homozyg. - mutovaný homozygot = mut / mut; špatná funkce OATP1B1 (*SLCO1B1**5/*5) – vysoké riziko myopatie

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1 x týdně

Doba odezvy: 7 pracovních dnů

Sklerodermie - varianta -945C>G genu *CTGF*

Sklerodermie (systémová skleróza, scleroderma) je autoimunitní onemocnění pojivové tkáně. Postiženy bývají obvykle ženy (4–8krát častěji než muži) ve věku 35–55 let. Její projevy jsou viditelné především na kůži, kde se v časně fázi projevuje tzv. prosáknutím. Zvýšená produkce kolagenu následně vede ke ztuhnutí kůže, které přechází do atrofických změn kůže i kožních adnex. Jsou známy dvě formy sklerodermie: lokalizovaná a systémová. U lokalizované formy je postižena kůže končetin a obličeje, zatímco u systémové sklerodermie jsou kromě kůže různých částí těla postiženy i vnitřní orgány (ledviny, srdce, plíce, gastrointestinální trakt). Kožní projevy jsou doprovázeny různým stupněm fibrózy; zánětlivé postižení orgánů pak cévními vazospastickými projevy a nálezy orgánově specifických autoprotilátek.

Na základě několika populačních studií byl identifikován polymorfismus -945C>G v promotoru genu *CTGF*, který je s tímto onemocněním významně asociován. Alela G totiž způsobuje zvýšenou produkci růstového faktoru pojivové tkáně (Connective tissue growth factor; CTGF). Homozygoti s genotypem GG tak mají větší riziko rozvoje sklerodermie.

Referenční hodnoty:

Negat. - negativní = nemutovaný homozygot = *wild type* = wt / wt;

Heteroz. – heterozygot = wt / mut;

Homozyg. - mutovaný homozygot = mut / mut;

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x za týden

Doba odezvy: 10 pracovních dnů

Spinální muskulární atrofie - delece/duplikace exonu 7 a 8 v genech *SMN1* a *SMN2*

Spinální muskulární (svalová) atrofie (SMA) patří mezi vrozené neuromuskulární choroby s progresivním průběhem. Po Duchennově svalové dystrofii (DMD) se jedná o druhé nejčastější nervosvalové onemocnění začínající v dětském věku. Je to také druhá nejčastější příčina úmrtnosti kojenců na autozomálně recesivní onemocnění.

Pro toto onemocnění je charakteristická apoptóza alfa – motoneuronů předních rohů míšních a často také degenerace motorických jader hlavových nervů, které se projevuje narůstající periferní kvadruparézou s následnými deformitami skeletu při svalové dysfunkci a mnohdy i ventilační insuficiencí, jež bývá příčinou úmrtí pacienta.

Patogeneze ani kauzální terapie SMA doposud není známa, diagnostika je založena na molekulárně-genetickém vyšetření. V 95 % klasických forem SMA již byla prokázána kauzální varianta v SMN (survival motor neuron gene) genu na chromozomu 5q.

Gen *SMN* má 9 exonů a v 5q13 oblasti se nachází ve dvou kopiích, telomerické a centromerické (*SMN1* a *SMN2*), přičemž ale pro tělo potřebný plnohodnotný úplný protein SMN produkuje především *SMN1* gen. Geny *SMN1* a *SMN2* se odlišují pouze dvěma jednonukleotidovými záměnami, jedna se nachází v exonu 7 a jedna v exonu 8. Klasické formy SMA jsou způsobeny z 95 % delecí v *SMN1* genu s tím, že se jedná o deleci v exonu 7, který má hlavní podíl na tvorbu funkčního proteinu SMN. Proto je-li v genu *SMN1* deletován pouze exon 8, je vysoce pravděpodobné, že daný jedinec není přenašečem.

Dědičnost u základních typů SMA je autosomálně recesivní (AR), kdy je nutné předání mutované formy *SMN* genu od obou rodičů k rozvinutí choroby u potomka.

Počet kopií genu *SMN2* je velmi variabilní s tím, že pouze 60-70% jedinců má dvě kopie. Za předpokladu, že jedinec má alespoň jednu funkční alelu genu *SMN1*, kompletní absence genu *SMN2* pravděpodobně nemá žádný klinický následek. Nicméně stanovení kopií genu *SMN2* je důležité pro pacienty postižené SMA: čím více má pacient kopií genu *SMN2*, tím méně závažné projevy SMA se u něj objeví.

Spinální svalová atrofie je relativně vzácná nemoc, nicméně se jedná o nejčastější fatální nervosvalové onemocnění kojeneckého věku a je třetím nejčastějším neuromuskulárním postižením diagnostikovaným u dětí do 18 let. Frekvence přenašečů této nemoci je totiž od 1:34 do 1:60. I proto je dnes detekce přenašečů (heterozygotů) klíčovou záležitostí v prenatální diagnostice (prevalence 1-2:100 000 jedinců, incidence 1:10 000 porodů).

Za tímto účelem naše laboratoř nabízí preventivní vyšetření nosičství SMA, které je spojeno s rizikem rozvinutí onemocnění SMA u potenciálního potomka. Jedná se o stanovení počtu kopií exonu 7 a 8 jak u genu *SMN1*, tak *SMN2* pomocí technologie MLPA.

Referenční hodnoty:

dvě kopie = sledovaný úsek není deletován, ani duplikován,

méně než dvě kopie = sledovaný úsek je deletován,

více než dvě kopie = sledovaný úsek je duplikován.

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x týdně

Doba odezvy: 10 pracovních dnů

Stanovení DNA profilu – identifikace osob, určování otcovství a příbuzenských vztahů pomocí STR analýzy

Označení na výsledkové zprávě: DNA profil (amelogenin X, amelogenin Y, D1S1656, D2S441, D2S1338, D3S1358, D8S1179, D10S1248, D12S391, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, D22S1045, FGA, SE33, TH01, vWA)

STR – (tandemově se opakující krátké repetice) vysoce variabilní úseky DNA, které nejsou asociovány s žádnými vlohami nebo nemocemi. Nevypovídají tudíž nic o zdravotních predispozicích nebo vlastnostech daného jedince. Díky vysoké variabilitě se používají pro identifikaci původce DNA. Stejně tak jsou velmi dobře využitelné při stanovování příbuzenských vazeb. Aby bylo dosaženo dostatečné vypovídací hodnoty testu, je nutno vyšetřit více STR polymorfismů. Jednotlivé vyšetřované STR polymorfismy musí být na sobě nezávislé. Zpravidla se vyšetřuje 15 STR polymorfismů a oblast pro amelogenin, která se využívá pro stanovení pohlaví. K vyšetření jsou využívány komerčně vyráběné identifikační kity.

Referenční hodnoty: Ladder – výrobcem dodávaný mix nejčastěji se vyskytujících a definovaných alel, ke kterému jsou vztaženy alely detekované ve zkoumaném vzorku

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: do lhůty dohodnuté se zadavatelem

Doba odezvy: dle požadavku zákazníka

Stanovení fúzního genu BCR-ABL – Ph1 chromozom (přestavby M-bcr, m-bcr a μ -bcr)

Chronické myeloproliferativní poruchy (CMPDs) představují velmi heterogenní skupinu onemocnění myeloidní řady krvetvorných buněk. Při diferenciální diagnostice se uplatní především detekce dvou molekulárních změn. Jsou to vyšetření fúzního genu *BCR-ABL* a varianty V617F v genu *JAK 2*. *BCR-ABL/Ph1* charakterizuje především chronickou myeloidní leukémií (CML) a *JAK 2* varianty se naopak vyskytuje u všech tzv. *BCR-ABL/Ph1* negativních myeloproliferativních chorob, především u Polycytemia vera (PV), esenciální trombocytémie (ET) či idiopatické myelofibrozy (CIMF).

Jako u prvního lidského nádorového onemocnění byl u CML odhalen vztah onemocnění ke konkrétní chromozomové aberaci – k Filadelfskému (Ph1) chromozomu. Ph1 je zkrácený chromozom 22, který vzniká reciprokou translokací t(9;22)(q34;q11). Nachází se u 95 % všech CML a také u 25 % akutních lymfoblastických leukemií (ALL) dospělého věku. Protoonkogen *c-ABL*, který kóduje tyrozin kinázu (TK), leží na chromozomu 9. V důsledku již zmíněné translokace dochází k fúzi se sekvencí genu *BCR*, která se nachází na chromozomu 22. Takto vzniká onkogen *BCR-ABL*, kódující konstitutivně vysoce aktivní *BCR-ABL* TK. *BCR-ABL* TK aktivuje množství signálních drah, následkem čehož dochází ke zvýšení proliferace, inhibici apoptózy a změně adheze hematopoetických buněk ke stromatu kostní dřeně. Na rozdíl od fyziologické formy proteinu *c-ABL*, která se nachází v jádře a jejíž aktivita je přísně regulována, fúzní varianta *BCR-ABL* má cytoplazmatickou lokalizaci.

Referenční hodnoty:

Negativní – přestavba *bcr/abl* nebyla nalezena

Pozitivní – přestavba *bcr/abl* byla nalezena, popis nalezené přestavby

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x za 14 dnů

Doba odezvy: 20 pracovních dnů

Toxicita Irinotecan (gen *UGT1A1*)

Lidé s TA₇ variantou *UGT1A1* genu (označovaná také jako UGT1A1*28) tvoří méně enzymu UDP-glucuronosyltransferasa a často trpí také tzv. Gilbertovým syndromem (chronická nekonjugovaná hyperbilirubinémie). Tento enzym je však důležitou součástí metabolismu irinotecanu, který se používá především v chemoterapii u kolorektálního karcinomu a malobuněčného karcinomu plic. Kvůli jeho nedostatku enzymu se irinotecan hromadí v těle takového pacienta, působí toxicky a způsobuje závažné neutropenie a nevolnosti. U těchto pacientů je nutné zvážit podávání irinotecanu, příp. snížené dávky.

Jelikož je irinotecan velmi rozšířené chemoterapeutikum, FDA od roku 2004 doporučuje testovat všechny pacienty na homozygotnost varianty UGT1A1*28 před podáním této léčby. V ČR je přitom dle dostupných pramenů až 15 % populace tvoří homozygoti UGT1A1*28 (genotyp 7TA/7TA).

Referenční hodnoty:

Negat. - negativní = nemutovaný homozygot = *wild type* = *wt / wt*; 6TA/6TA

Heteroz. – heterozygot = *wt / mut*; 6TA/7TA

Homozyg. - mutovaný homozygot = *mut / mut*; 7TA/7TA

Odběr a biologický materiál: viz kapitola [3.5 Odběry primárních vzorků](#).

Provádí se: 1x za 7 dnů

Doba odezvy: 7 pracovních dnů