

SQ-014 Laboratorní příručka

OBSAH

1. Úvod	4
1.1. Laboratoře GENNET.....	5
2. Zaměření laboratoře a spektrum nabízených služeb	9
3. Základní informace pro uživatele laboratorních služeb	10
3.1. Cytogenetické metody	10
3.1.1. Chromozomální vyšetření	10
3.2. Molekulárně-cytogenetické metody	12
3.2.1. FISH vyšetření	12
3.2.2. Array CGH a SNP array	12
3.2.3. Preimplantační genetická vyšetření – PGT („Preimplantation Genetic Testing“) metodou NGS	13
3.2.4. Preimplantační genetická vyšetření – PGT („Preimplantation Genetic Testing“) metodou karyomapping	13
3.3. Molekulárně genetické metody	13
3.3.1. QF-PCR vyšetření.....	14
3.3.2. Vyšetření mutací v genu pro cystickou fibrózu (<i>CFTR</i>).....	14
3.3.3. Vyšetření mikrodelecí AZF oblasti na Y chromozomu:	15
3.3.4. Vyšetření trombofilních mutací:	15
3.3.5. Vyšetření trombofilních markerů: Gen <i>PAI-1</i> (<i>4G/5G</i>).....	16
3.3.6. Vyšetření mutace 35delG v genu pro connexin 26:.....	16
3.3.7. DNA určování otcovství pomocí STR markerů:.....	16
3.3.8. Preimplantační genetické vyšetření monogenních chorob - PGT-M.....	17
3.3.9. Vyšetření nejčastějších mutací v genu <i>HFE</i>	17
3.3.10. Vyšetření dědičné dispozice k nádorovým chorobám metodou NGS onkopanelm CZECANCA	17
3.3.11. Vyšetření fragilního X chromozomu:	18
3.3.12. Vyšetření polymorfismu N680S genu <i>FSHR</i> metodou Real-Time PCR	19
3.3.13. Vyšetření HLA znaků asociovaných s celiakií	19
3.3.14. Vyšetření rizikové alely HLA-B27	19
3.3.15. Neinvazivní prenatalní test aneuploidií chromozomů 13, 18 a 21 z mateřské plazmy	20
3.3.16. CarrierTest	20
3.3.17. Klinický Exom GERDA	21
3.3.18. Samostatné vyšetření 3 nejčastějších mutací genu <i>DHCR7</i> pro Smith-Lemli- Opitz syndrom (SLOS).....	22
3.3.19. Samostatné vyšetření M2 haplotypu genu <i>ANXA5</i>	23

SQ-014 Laboratorní příručka

3.3.20.	Vyšetření alely HLA-DQA1*05 a genotypu rs2097432.....	23
3.3.21.	Vyšetření mutačního statusu genu TPMT alely *1, *2, *3A, B, C (mutace c.238G>C, c.460G>A a c.719A>G).....	24
3.3.22.	Vyšetření mutačního statusu genu NUDT15 alely *1, *2, *3, *4, *5 (mutace c. 415C>T, c. 416 G>A a c.52G>A).....	24
3.3.23.	Endometriální test receptivity metodou masivně paralelního sekvenování	25
3.4.	Centrum asistované reprodukce.....	26
3.4.1.	Vyšetření spermioqramu makro- a mikroskopicky.....	26
3.4.2.	Kryokonzervace spermií.....	26
3.4.3.	Odběr oocytů, in vitro fertilizace, kultivace embryí a embryotransfer.....	27
3.4.4.	Kryokonzervace embryí a oocytů.....	27
3.4.5.	Asistovaný hatching.....	28
3.4.6.	Biopsie embryí pro preimplantační genetické testování (PGT).....	28
3.4.7.	MACS.....	29
3.4.8.	MFSS.....	29
3.5.	Imunologická laboratoř.....	30
4.	Obecné informace o provedení objednávky vyšetření.....	30
4.1.	Základní identifikační znaky požadované a povinně uváděné na žádance.....	30
4.2.	Identifikační označení primárního vzorku.....	31
5.	Žádanka na laboratorní vyšetření.....	31
5.1.	Příjem interních požadavků.....	31
5.2.	Příjem externích požadavků.....	32
6.	Požadavky na urgentní vyšetření.....	32
7.	Ústní požadavky na vyšetření.....	33
8.	Důvody pro odmítnutí vzorků pro zpracování.....	33
8.1.	Odmítnutí požadavku.....	33
8.2.	Postupy při nesprávné nebo neúplné identifikaci vzorku nebo žádanky.....	33
9.	Prohlášení o souhlasu.....	34
10.	Informace pro odběr biologického materiálu včetně minimálního množství.....	34
10.1.	Odběrové nádoby.....	34
10.2.	Doporučený postup při odběru.....	36
10.2.1.	Invazivní prenatalní vyšetření.....	36
10.2.2.	Odběr periferní krve.....	37
10.2.3.	Specifika odběru pro imunologická vyšetření.....	38
10.2.4.	Odběr potracené tkáně - produktů koncepce (tkání plodu a placenty) k vyšetření QF-PCR a array.....	38

SQ-014 Laboratorní příručka

10.2.5. Odběr ejakulátu.....	38
10.2.6. Odběr folikulární tekutiny.....	39
10.2.7. Odběr materiálu z MESA, TESE.....	39
10.2.8. Odběr buněk trofektodermu na PGT.....	39
10.2.9. Odběr zamraženého materiálu	40
10.2.10.Odběr slizničního stěru z dutiny ústní (bukální stěr)	40
10.2.11.Protokolární odběr k DNA paternitní expertíze s posudkem soudního znalce	40
10.2.12.Odběr vzorku endometria	41
11. Transport a manipulace s biologickým materiálem (se vzorky)	41
12. Fáze po vyšetření	42
12.1. Bezpečné odstraňování materiálů použitých při odběru.....	42
12.2. Manipulace a skladování materiálu	42
12.3. Dodatečná vyšetření a časový interval pro jejich požadování.....	44
12.4. Opakování vyšetření stejného primárního vzorku.....	44
13. Vydávání výsledků a komunikace s laboratoří	44
13.1. Informace o formách vydávání výsledků	44
13.2. Změny výsledků a nálezů	45
13.3. Intervaly od dodání materiálu k vydání výsledků.....	46
13.4. Konzultační činnost laboratoře.....	46
13.5. Způsob řešení stížností a reklamací.....	46
14. Přílohy.....	47

SQ-014 Laboratorní příručka

1. Úvod

Společnost GENNET s.r.o. byla založena v roce 1996 jako centrum lékařské genetiky. Své služby postupně rozšířila o další odbornosti, jako je fetální medicína, reprodukční medicína, gynekologie a porodnictví urologie alergologie a klinická imunologie. Dále je společnost provozovatel genetických laboratoří, imunologické laboratoře, embryologické a andrologické laboratoře, kryobanky, tkáňové a kmenové banky. Společnost se také zabývá vývojem a výzkumem nových metod fetální medicíny, genetického testování, diagnostických a léčebných metod k léčbě neplodnosti mužů a žen. Zákazníci klinik společnosti mohou využít služeb našich odborníků celkem na čtyřech pobočkách – tři se nacházejí v Praze (GENNET Letná, GENNET Archa a GENNET Pekařská) a jedna v Liberci (GENNET Liberec).

Od dubna roku 2023 vznikla pro genetické laboratoře nová obchodní značka GNTlabs by GENNET (dále jen „GNTlabs“), pod kterou budou genetické laboratoře nově vystupovat zejména při spolupráci se zahraničními zákazníky.

V současné době jsou kliniky společnosti místem, kde je poskytována komplexní péče v oblasti reprodukční medicíny na jednom místě. Cílem je zákazníkům zajistit co nejnadnější cestu k jejich vytyčenému cíli - mít zdravé dítě.

Společnost disponuje moderním vybavením, nejnovějšími technologiemi a poskytuje profesionální a individuální přístup ke každému zákazníkovi, proto se na společnost každoročně s důvěrou obrací tisíce zákazníků z celého světa. Od roku 2015 jsou kliniky společnosti navíc členem skupiny FutureLife, a.s., která sdružuje zdravotnická zařízení zabývající se reprodukčním zdravím, nejen v České Republice, ale i v dalších zemích Evropy.

Kliniky společnosti jsou od roku 2007 certifikovány a mají nastavený systém řízení kvality dle požadavků mezinárodní normy ISO 9001. Zdravotnické laboratoře byly prvně akreditovány v roce 2009 dle mezinárodní normy ISO 15189.

Laboratoře GENNET, jako akreditovaný objekt, nabízí své služby na klinikách společnosti v Praze a Liberci na celkem 8 pracovištích zdravotnických laboratoří v rozsahu uvedeném v příloze Osvědčení k akreditaci.

Plněním kritérií uváděných mezinárodních norem kliniky společnosti oficiálně každoročně potvrzují svou odbornost, objektivitu a nezávislost pro vykonávání svých činností. Kliniky společnosti se také každoročně účastní mezinárodních kontrol kvality a podporují mezinárodní výzkumné projekty.

SQ-014 Laboratorní příručka

1.1. Laboratoře GENNET

Od roku 2007 je společnost GENNET, s.r.o. certifikovaná a má nastavený systém řízení kvality dle požadavků normy ISO 9001. Laboratoře GENNET byly prvně akreditovány ČIA v roce 2009 a plnily požadavky normy ČSN EN ISO 15189:2007. V roce 2015 zahájilo svou činnost Centrum reprodukční imunologie, které zahrnuje, jak služby ambulantní (konzultační), tak laboratorní.

Laboratoře GENNET byly posouzeny ČIA a nyní plní Laboratoře GENNET požadavky normy ČSN EN ISO 15189:2013. Laboratoře GENNET jako akreditovaný objekt nabízí své služby na 4 pobočkách společnosti GENNET, s.r.o. a těchto pracovištích:

Pracoviště zdravotnické laboratoře

1. Molekulárně genetická laboratoř	Pekařská 635/6, 158 00 Praha 5
2. Cytogenetická laboratoř - Pekařská	Pekařská 635/6, 158 00 Praha 5
3. Laboratoř pro PGT	Pekařská 635/6, 158 00 Praha 5
4. Cytogenetická laboratoř - Liberec	Liliová 118/1, 460 01 Liberec
5. Laboratoř IVF - Liberec	Liliová 118/1, 460 01 Liberec
6. Laboratoř IVF – Letná	Kostelní 292/9, 170 00 Praha 7
7. Laboratoř IVF – Archa	Na Poříčí 1046/24, 110 00 Praha 1
8. Imunologická laboratoř	Na Poříčí 1046/24, 110 00 Praha 1

Laboratoře GENNET jsou vybaveny nejmodernějším přístrojovým vybavením a splňují kritéria, která jsou dána vyhláškou Ministerstva zdravotnictví. Personální obsazení laboratoří splňuje svým vzděláním podmínky odborné způsobilosti.

Díky těmto základním požadavkům Laboratoře GENNET mohou nabídnout široké spektrum nabízených služeb.

Kontaktní údaje:

Název:	GENNET, s.r.o.
Právní forma:	společnost s ručením omezení
Sídlo firmy:	Kostelní 292/9, 17000 Praha 7
IČ:	27080234
DIČ:	CZ699004108

Statutární orgán společnosti

Statutárním orgánem společnosti jsou jednatelé: Ing. Michal Fazekaš, Ing. Miloš Anđel

SQ-014 Laboratorní příručka

Akreditovaný objekt:

Laboratoře GENNET

Vedoucí Laboratoří GENNET:

Jméno: MUDr. Monika Koudová, MBA
tel.: 242 456 819/226 231 619
e-mail: monika.koudova@gennet.cz

Ředitel pro preimplantační genetické testování

Jméno: Mgr. Jakub Horák, Ph.D.
tel.: 226 231 670
e-mail: jakub.horak@gennet.cz

Manažer genetických laboratoří GENNET

Jméno: Mgr. Petr Klempt
tel.: 226 231 620
e-mail: petr.klempt@gennet.cz

Vedoucí laboratoří lékařské genetiky:

jméno: Mgr. Martina Bittóová, MBA
tel.: 226 231 610
e-mail: martina.bittoova@gennet.cz

Vedoucí centrálního příjmu vzorků:

jméno: Mgr. Jana Vávrová
tel.: 242 456 779
e-mail: jana.vavrova@gennet.cz

Vedoucí laboratoří IVF:

jméno: Ing. Radomír Křen, Ph.D.
tel.: 242 456 757
e-mail: radomir.kren@gennet.cz

Vedoucí laboratoří IML:

Jméno: Ing. Štěpánka Luxová
tel.: 242 456 845
e-mail: stepanka.luxova@gennet.cz

Manažer kvality Laboratoří GENNET:

Jméno: Zuzana Valentová
tel.: 242 456 711
e-mail: zuzana.valentova@gennet.cz

SQ-014 Laboratorní příručka

Metrolog:

jméno: Lenka Dvořáková
tel.: 242 456 724
e-mail: lenka.dvorakova@gennet.cz

Pracoviště akreditovaného objektu:

Pobočka GENNET, s.r.o. – Pekařská Pekařská 635/6, 158 00 Praha 5

Molekulárně genetická laboratoř (MGL)

Vedoucí MGL: Mgr. Martina Bittóová, MBA
tel.: 226 231 610
e-mail: martina.bittoova@gennet.cz

Provozní doba:

Po – Čt: 7:30 – 19:00
Pá: 7:30 – 16:00

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

Cytogenetická laboratoř (CL)

Vedoucí CL: RNDr. Jiří Horáček
tel.: 226 231 650
e-mail: jiri.horacek@gennet.cz

Provozní doba:

Po – Čt: 7:00 – 19:00
Pá: 7:00 – 16:00

Víkendy a většina svátků: 7:00 – 15:30, jinak dle domluvy.

Laboratoř pro preimplantační genetické testování (PGTL)

Vedoucí PGTL: Ing. Eva Račochová
tel.: 226 231 671
e-mail: eva.racochova@gennet.cz

Provozní doba:

Po – Pá: 7:30 – 16:00

Víkendový provoz není.

SQ-014 Laboratorní příručka

Oddělení bioinformatiky genetických laboratoří GENNET

Vedoucí BioIT: Ing. Filip Zembol
tel.: 226 231 630
e-mail: filip.zembol@gennet.cz

Centrální příjem vzorků (CPV)

Vedoucí centrálního příjmu: Mgr. Jana Vávrová
tel: 242 456 811
e-mail: jana.vavrova@gennet.cz

Provozní doba:

Po-Pá: 7:30-19:00

Pobočka GENNET, s.r.o. – Letná

Kostelní 292/9, 170 00 Praha 7

Laboratoř IVF

Vedoucí laboratoře IVF: MUDr. Pavlína Potužníková
tel.: 242 456 756
e-mail: pavlina.potuznikova@gennet.cz

Provozní doba:

Po – Pá: 7:30 – 16:00

So: 7:30 – 12:30 – příjem vzorků

Pobočka GENNET, s.r.o. – Archa

Na Poříčí 1046/24, 110 00 Praha 1

Imunologická laboratoř (IML)

Vedoucí IML: Ing. Štěpánka Luxová
tel.: 242 456 799
e-mail: stepanka.luxova@gennet.cz

Provozní doba:

Po – Pá: 7:00 – 16:00

Laboratoř IVF

Vedoucí laboratoře IVF: RNDr. Eva Cibulková
tel.: 242 456 854
e-mail: eva.cibulkova@gennet.cz

Provozní doba:

Po – Pá: 7:30 – 15:00

So: 7:30 – 10:00 – příjem vzorků

SQ-014 Laboratorní příručka

Pobočka GENNET, s.r.o. – Liberec**Liliová 118/1, 460 01 Liberec**

Cytogenetická laboratoř (CL)

Vedoucí laboratoře CL: Ing. Jitka Janáková
tel.: 483 101 324/335
e-mail: jitka.janakova@gennet.cz**Provozní doba:****Po – Pá:** 6:00 – 17:00

Laboratoř IVF

Vedoucí laboratoře IVF: Ing. Dagmar Milická
tel.: 483 101 327
e-mail: dagmar.milicka@gennet.cz**Provozní doba:****Po – Pá:** 7:30 – 15:00**So:** 7:30 – 10:00 – příjem vzorků

Laboratoře GENNET, respektive její vedení, odpovídá za provádění služeb zdravotnické laboratoře vč. odpovídajících interpretací a poradenských služeb. Tyto služby jsou prováděny v požadovaném rozsahu, kvalifikovaně a s definovanou nejistotou tak, aby byly prováděny operativně a ve shodě s platnou mezinárodní normou, odbornými normami, vyhláškami, zákony a ve shodě s požadavky žadatele, kontrolních orgánů nebo organizací poskytujících jejich uznání.

Laboratoř provádí výše zmíněné služby ve stálých prostorách se stálým laboratorním vybavením, kde jsou zajišťovány trvale vyhovující podmínky prostředí pro činnost zdravotnické laboratoře.

2. Zaměření laboratoře a spektrum nabízených služeb

Laboratoře GENNET jsou akreditovány v rozsahu cytogenetických a molekulárně-genetických vyšetření včetně preimplantačního genetického testování embryí, laboratorní andrologie pro IVF a vyšetření v odbornosti alergologie a klinické imunologie vymezená přílohou osvědčení o akreditaci.

Naše laboratoře provádějí specializovaná cytogenetická, molekulárně - cytogenetická, molekulárně genetická, preimplantační genetické testování, alergologická a imunologická vyšetření a metody asistované reprodukce z těchto **primárních materiálů**:

• periferní krev	• FTA karta
• pupečnicková (fetální) krev	• ejakulát
• plodová voda	• folikulární tekutina
• choriové klky	• materiál po MESA, TESE
• trofektoderm	• čerstvé reprodukční buňky (spermie, oocyty)
• parafinové bločky	• zamražené reprodukční buňky (embrya, spermie)

SQ-014 Laboratorní příručka

<ul style="list-style-type: none">• bukální stěr (výtěr z dutiny ústní)	<ul style="list-style-type: none">• stolice
<ul style="list-style-type: none">• produkt koncepce (tkáň plodu/a nebo placenty)	<ul style="list-style-type: none">• kostní dřev
<ul style="list-style-type: none">• solidní tkáň	<ul style="list-style-type: none">• endometriální tkáň

Seznam nabízených služeb - viz samostatné přílohy k této laboratorní příručce.

U genetických vyšetření, která nejsou na našem pracovišti prováděna, je v MGL provedena pouze izolace DNA. Na základě požadavku klinického genetika o předání alikoty izolované DNA zpět, je v laboratoři připraven vzorek DNA, který je následně klinickým genetikem odeslán do jiného genetické pracoviště na indikované genetické vyšetření (např. dovyšetření celé kódující sekvence genu DHCR7 v případě pozitivního nálezu mutace genu DHCR7 a podezření na SLOS v laboratoři FN Brno, vyšetření genu pro Marfanův syndrom v laboratoři Agel, Nový Jičín apod.). Kompletní seznam nabízených vyšetření je uveden na průvodce molekulárně-genetického vyšetření daného genetického pracoviště. Seznam genetických pracovišť a jejich vyšetření je uveden v databázi odborné společnosti SLG na <https://www.slg.cz/pracoviste/>.

3. Základní informace pro uživatele laboratorních služeb

Laboratoře GENNET neprovádí odběr primárních vzorků. Vzorky jsou do laboratoře přijímány buď od externích lékařů nebo ze strany interních lékařů společnosti GENNET, s.r.o.

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

3.1. Cytogenetické metody

3.1.1. Chromozomální vyšetření

Slouží k určení karyotypu klasickými cytogenetickými metodami a fluorescenční in situ hybridizací (FISH) a dále ke stanovení početních i strukturních chromozomálních aberací (odchylek) v postnatálním, prenatalním i preimplantačním období.

Vyšetření se provádí:

Z plodové vody/choriových klků/pupečnickové(fetální)krve

Důvodem odběru je požadavek na chromozomální vyšetření buněk plodu nebo vyšetření jednotlivých genů k vyloučení vývojových vad u plodu. Z odebraných vzorků lze buď přímo izolovat DNA, nebo lze tyto vzorky použít ke kultivaci v laboratorních podmínkách. Dalším zpracováním takto vzniklých tkáňových kultur je možné provést chromozomální vyšetření plodu nebo izolovat fetální DNA.

Změny v počtu nebo ve struktuře chromozomů doprovázejí závažné vrozené vývojové vady, které ve většině případů nelze po porodu léčit.

SQ-014 Laboratorní příručka

Vlastní kultivace a zhodnocení preparátu se pohybuje většinou mezi 9 – 16 dny, proto je důležitý termín provedení odběru. Je nutné počítat s dostatečnou lhůtou na případnou kultivaci, zpracování a odečtení vzorku.

Indikace k vyšetření:

- předchozí narození plodu s chromozomální abnormalitou nebo s vrozenými vývojovými vadami
- narození mrtvého plodu nebo úmrtí novorozence
- nosičství chromozomální přestavby
- opakované spontánní potraty
- výskyt mozaiky nebo aneuploidie pohlavních chromozomů u jednoho z rodičů
- pozitivní screening mateřského séra
- věk matky nad 35 let
- patologický nález při ultrazvukovém vyšetření plodu
- pozitivní screening I. trimestru
- další méně časté indikace

Podrobnosti metod jsou uvedeny v *SOP-CL-002*, *SOP-CL-003* a *SOP-CL-004*.

Z periferní krve

Důvodem odběru je určení karyotypu vyšetřovaného pacienta. Při cytogenetickém vyšetření karyotypu z krve kultivujeme T-lymfocyty. Dělení T-lymfocytů stimuluje rostlinným lektinem phytohaemaglutininem (PHA). Pod mikroskopem sledujeme počet a strukturu jednotlivých chromozomů. Odběr neprovádíme po transfúzi krve (bezpečný časový odstup alespoň 6 měsíců) z důvodů vlivu na výsledky vyšetření, neboť karyotyp by pak mohl odpovídat karyotypu dárce, nikoliv pacienta.

Indikace k vyšetření:

- abnormální fenotyp pacienta
- problémy růstu a vývoje u pacienta
- mentální retardace pacienta nebo v rodině pacienta
- narození mrtvého plodu a úmrtí novorozence
- opakované spontánní potraty
- infertilita či opakované neúspěchy IVF
- pozitivní rodinná anamnéza chromozomálních přestaveb

Podrobnosti metod jsou uvedeny v *SOP-CL-001*.

Z produktů koncepce (tkáň plodu /a nebo placenty)

Důvodem odběru je určení karyotypu potráceného plodu. K vyšetření je nutné dodat sterilně odebranou tkáň o velikosti 0,5 x 0,5 cm (minimálně), která se vloží do sterilní zkumavky s fyziologickým roztokem.

SQ-014 Laboratorní příručka

Indikace k vyšetření:

- stanovení karyotypu potraceného plodu

Podrobnosti metod jsou uvedeny v *SOP-CL-005*

3.2. Molekulárně-cytogenetické metody

3.2.1. FISH vyšetření

Fluorescenční hybridizace *in situ* (FISH) je založena na navázání fluorescenčně značených DNA sond ke komplementárním úsekům cílové DNA chromozomů nebo interfázních buněčných jader fixovaných na mikroskopickém preparátu. Ty jsou následně vizualizovány a detekovány pomocí epifluorescenčního mikroskopu.

FISH vyšetření se používá k upřesnění a doplnění chromozomálního vyšetření, popř. verifikaci nálezu zjištěného běžným cytogenetickým rozbořem. V některých případech může FISH analýza nahradit běžný cytogenetický rozbor (selhání kultivace, časový stres).

Používané FISH sondy:

Centromerické sondy

- lokalizace: hybridizují s repetitivními satelitními sekvencemi především v centromerických oblastech
- účel: slouží k diagnostice numerických chromozomálních aberací, detekci chromozómů neznámého původu

Lokus-specifické sondy

- lokalizace: hybridizují s jedinečnými sekvencemi DNA
- účel: slouží k diagnostice numerických chromozomálních aberací, k vyšetření, mikrodeleci u mikrodelečních syndromů (např. Prader-Willi/Angelman sy., DiGeorge sy.), zjištění amplifikace onkogenů a některých specifických translokací

Celochromozomové sondy

- lokalizace: hybridizují s mnohačetnými chromozomovými sekvencemi, označují celý chromozom
- účel: slouží k vyšetření chromozomálních přestaveb a analýze komplexních translokací, k detekci původu marker chromozomů

K následujícím molekulárně cytogenetickým metodám je výchozí krokem izolace DNA.

Podrobnosti metod jsou uvedeny v *SOP-CL-009*.

3.2.2. Array CGH a SNP array

Molekulárně cytogenetická vyšetření metodami array slouží k celogenomové detekci zejména submikroskopických chromozomálních aberací (deleci a/nebo duplikací) u vzorků prenatálního i postnatálního původu. Principem metody je hybridizace vyšetřované DNA na specifických chipch. Podrobnosti metod jsou uvedeny v *SOP-CL-015 a SOP-CL-016*.

SQ-014 Laboratorní příručka

3.2.3. Preimplantační genetická vyšetření – PGT („Preimplantation Genetic Testing“) metodou NGS

Molekulárně cytogenetické vyšetření metodou NGS slouží k celogenomové detekci numerických chromozomálních změn (aneuploidii) event. delecí a/nebo duplikací u vyšetřovaných embryí (buňky trofektodermu). Principem metody je sekvenace úseků vyšetřované DNA.

Podrobnosti metody jsou uvedeny v *SOP-PGTL-003*.

3.2.4. Preimplantační genetická vyšetření – PGT („Preimplantation Genetic Testing“) metodou karyomapping

Molekulárně cytogenetické vyšetření metodou karyomapping slouží ke zjištění rodičovského původu úseků chromozomů u vyšetřovaných embryí a k případné detekci různých typů genetických poruch, včetně monogenních. Principem metody je hybridizace vyšetřované DNA na specifických chipech.

Podrobnosti metody jsou uvedeny v *SOP-PGTL-002*.

3.3. Molekulárně genetické metody

Molekulárně genetické vyšetření je ve většině případů indikováno lékařem- klinickým genetikem /odb. 208/ po genetické konzultaci pacienta. Některá genetická vyšetření mohou být indikována i lékařem jiné odbornosti- specialistou, např. vyšetření trombofilních mutací může být indikováno také lékařem odbornosti hematologie nebo gynekologie.

Izolace DNA je výchozí krok ke všem metodám molekulární genetiky.

Laboratoř provádí:

- izolaci DNA ze vzorku periferní krve
- izolaci DNA ze vzorku plodové vody, choriových klků či pupečnickové krve a izolaci DNA z kultivovaných buněk buněčných kultur
- izolaci DNA ze slizničních stěrů /bukální stěr/
- izolaci DNA z produktů koncepce
- izolaci DNA z tkání fixovaných v parafinových bločcích
- izolaci cfDNA z periferní krve matky

a) Plodová voda a CVS

Při požadavku na prenatální molekulárně genetické vyšetření je nejčastěji primárním materiálem pro vyšetření plodová voda a z ní získané buňky (tzv. amniocyty). Plodová voda obsahuje kožní a slizniční buňky z povrchu plodu. V případě, že je výchozím materiálem izolace DNA vzorek CVS, je nutné jej do laboratoře MGL dodat očištěný od krevních sraženin, které na vzorku ulpívají při odběru. Sražená krev je v tomto případě mateřského původu, izolovaná DNA by byla směsí DNA plodu a matky a vydání výsledku vyšetření by bylo v takovém případě znemožněno.

b) Periferní krev

Odběr krve by neměl být proveden minimálně 6 týdnů po transfúzi, dále u pacientů, kterým byla provedena alogenní transplantace kostní dřeně. V takových případech je nutné konzultovat možnosti odběru jiného typu biologického materiálu od pacienta s vedoucí MGL.

SQ-014 Laboratorní příručka

c) Produkty koncepce (tkáně plodu/ a nebo placenty)

Spontánním potratem (SAB) končí přibližně 15% klinických gravidit. Riziko SAB stoupá s věkem matky. Nejčastější příčinou jsou genetické vady, především chromozomální aberace, které jsou nacházeny v až 60 % případů. Vyšetření produktů koncepce umožňuje objasnit příčinu SAB, indikovat další cílená vyšetření páru i stanovit optimální léčebný postup (např. PGT v další graviditě). K analýze je nutné dodat odebranou tkáň (není nutný sterilní odběr) o velikosti cca 0,5 x 0,5 cm, která se vloží do zkumavky s fyziologickým roztokem, sterilní vodou nebo bez roztoku. Vzorek je vhodné dopravit na vyšetření v co nejkratší době, při delším skladování je nutné držet před transportem, popř. v průběhu delšího transportu, v chladu (při 2-8 °C). Před odesláním všech vzorků potrácené tkáně na DNA vyšetření je nutná pečlivá separace tkáně plodu od ostatních tkání, které jsou mateřského původu a mohou vzorek kontaminovat a tím znemožnit vyšetření. K molekulárně-genetickému vyšetření potrácené tkáně je vhodné současně dodat periferní krev matky pro srovnávací analýzu k vyloučení kontaminace. Podrobnosti metody jsou uvedeny v *SOP-MGL-016*.

3.3.1. QF-PCR vyšetření

Rychlá diagnostika (do 48 hod od dodání vzorku do laboratoře) aneuploidií autozomálních chromozomů 13, 18, 21 a pohlavních chromozomů X a Y analýzou STR lokusů na automatickém genetickém analyzátoru (sekvenátoru). Aneuploidie chromozomů 2, 4, 6, 7, 14, 15, 16 a 22 u produktů koncepce.

Indikace k vyšetření:

- riziko biochemického screeningu I. a II. trimestru vyšší než 1:100
- celkové genetické riziko nad 10%
- abnormální ultrazvukový nález
- kombinace více rizikových faktorů
- produkt koncepce (spontánní potrat)

Podrobnosti metody jsou uvedeny v *SOP-MGL-001* a *SOP-MGL-016*.

3.3.2. Vyšetření mutací v genu pro cystickou fibrózu (*CFTR*)

Laboratoř provádí vyšetření 50 nejčastějších mutací *CFTR* genu a stanovení polymorfismu v intronu 8 (Tn varianty) kitem ELUCIGENE CF-EU2v1. Prováděné vyšetření zachytí 91,7% všech mutací *CFTR* genu v české populaci. Test je schopen zachytit jak asymptomatické přenašeče (heterozygoty), tak postižené jedince (homozygoty).

Indikace k vyšetření:

- u pacienta s příznaky cystické fibrózy.
- u příbuzných pacienta s cystickou fibrózou a detekovanými mutacemi v *CFTR*.
- u partnera nosiče mutace *CFTR* před plánovaným těhotenstvím, případně v průběhu těhotenství.
- u dospělých mužů s poruchou plodnosti (patologickým spermioqramem- azoospermie, nebo oligo/oligozoospermie).
- prenatální diagnostika v případě partnerů heterozygotů pro mutaci v *CFTR* genu
- prenatální diagnostika u plodů s UZ známkami rizika CF (střevní hyperechogenita)

SQ-014 Laboratorní příručka

Podrobnosti metody jsou uvedeny v *SOP-MGL-004*.

3.3.3. Vyšetření mikroleceí AZF oblasti na Y chromozomu:

Analýza AZF oblasti (azoospermický faktor) na dlouhém rameni Y chromozomu. Jsou vyšetřovány oblasti AZFa, AZFb, AZFc a z každé oblasti jsou vyšetřovány 2 STS lokusy. Uvedený postup zachytí cca 90% delecí v AZF oblastech.

Indikace k vyšetření:

- Porucha plodnosti u mužů – azoospermie nebo těžká oligospermie (oligozoospermie).

Podrobnosti metody jsou uvedeny v *SOP-MGL-017*.

3.3.4. Vyšetření trombofilních mutací:

- gen *F5* pro koagulační faktor V – mutace FV Leiden – G1691A (R506Q; Arg506Gln)
- gen *F2* pro protrombin (koagulační faktor II) – mutace G20210A
- gen *MTHFR* pro methylenetetrahydrofolát reduktázu - varianta C677T
- varianta A1298C

Indikace k vyšetření:

Indikace jsou součástí Doporučeného postupu odborné společnosti SLG ČLS JEP- viz <https://slg.cz/doporuceni/trombofilni-stavy/>

- **Před zahájením** kombinované perorální hormonální kontracepce a/nebo hormonální substituční léčby (HRT) u žen s:
 - pozitivní osobní anamnézou prodělané TEN
 - pozitivní rodinnou anamnézou výskytu TEN u příbuzných prvního stupně (matky, otce, vlastních sourozenců a dětí).
- U žen s primární sterilitou nebo opakovanými aborty v 1. trimestru gravidity nebo u každé ztráty plodu po tomto období gravidity.
- U těhotných žen s pozitivní osobní nebo rodinnou anamnézou prodělané TEN (viz bod 1) nebo při těžkých formách preeklampsie, retardaci plodu, abrupci placenty a porodu mrtvého plodu.
- U osob se stavem po prodělané idiopatické TEN při pátrání po vyvolávající příčině a kvůli rozhodování o délce antikoagulační léčby.
- Při pozitivním záchytu trombofilních mutací je vhodné provést tato vyšetření u příbuzných prvního stupně. U dětí po 12 letech jejich věku, pokud nejsou jiné důvody k provedení tohoto vyšetření dříve.
- Event. z jiné indikace po vyšetření v Trombotickém centru.

Podrobnosti metody jsou uvedeny v *SOP-MGL-002*.

SQ-014 Laboratorní příručka

3.3.5. Vyšetření trombofilních markerů: Gen *PAI-1* (4G/5G)

Vyšetření se provádí za účelem detekce polymorfizmu 4G/5G genu *PAI-1* (inhibitor aktivátoru plazminogenu). Přítomnost alely 4G v homozygotním stavu je spojována s vyšší hladinou PAI-1, která je asociována s vyšším rizikem rozvoje kardiovaskulárních onemocnění (koronárního syndromu, infarktu myokardu a cévní mozkové příhody) a komplikací po chirurgických výkonech. Pacientky s tímto genotypem mohou mít vyšší výskyt komplikací během těhotenství a porodu.

Indikace k vyšetření:

- u osob s osobní nebo rodinnou anamnézou (příbuzní I. stupně) kardiovaskulárních chorob (koronárního syndromu, infarktu myokardu a cévní mozkové příhody) ve věku do 50 let
- z jiné indikace po vyšetření v Trombotickém centru.

Podrobnosti metody jsou uvedeny v *SOP-MGL-002*.

3.3.6. Vyšetření mutace 35delG v genu pro connexin 26:

Vyšetření se provádí za účelem detekce mutací v genu *GJB2*, které jsou zodpovědné za AR dědičnou nesyndromovou poruchu/ztrátu sluchu (hluchotu).

Indikace k vyšetření:

- vrozená prelinguální ztráta sluchu
- vrozená prelinguální ztráta sluchu v rodině
- vyšetření vrozené ztráty sluchu před kochleární implantací
- testování přítomnosti mutace u partnerů v příbuzenském svazku, popř. u novorozenců narozených z incestních vztahů
- vyšetřování slyšících příbuzných v rodinách, kde již byla mutace *GJB2* zjištěna
- u partnera nosiče mutace *GJB2* před plánovaným těhotenstvím, případně v průběhu těhotenství.
- vyšetření dárců gamet

Podrobnosti metody jsou uvedeny v *SOP-MGL-009*.

3.3.7. DNA určování otcovství pomocí STR markerů:

Multiplex PCR 15-ti STR markerů + amelogeninového markeru k určení pohlaví s následnou fragmentační analýzou, za použití kitu AmpFESTR[®] Identifier[®] Kit. Jedná-li se o účely soudně-znaleckého posudku je vyšetřeno celé trio (domnělý otec, matka a dítě), popř. více domnělých otců, či více dětí.

Ve výjimečných případech lze soudně-znalecký posudek uzavřít i bez vyšetření matky, vždy však s jejím souhlasem. Pokud je požadován posudek pro soudně-znalecké účely musí být vzorky odebrány dle protokolárního odběru (viz kap. 5.4.5) za přítomnosti soudního znalce. Pokud znalecký posudek není požadován, lze provést analýzu pouze otce a dítěte bez vyšetření matky, v tomto případě není nutné provést protokolární odběr za přítomnosti soudního znalce, identita vyšetřovaných je však vždy ověřena dle předložených dokumentů (OP, pas, rodný list) - tyto analýzy provádíme pouze ve výjimečných případech s ohledem na zájmy nezletilého dítěte a vždy se souhlasem zákonného zástupce dítěte.

SQ-014 Laboratorní příručka

Indikace k vyšetření:

- vyšetření provádíme na základě objednávky žadatelů o vyšetření (soukromé osoby, soudy, státní zastupitelstva, popř. jiné orgány činné v trestním řízení)- samoplátců, vyšetření není hrazeno ze ZP

Podrobnosti metody jsou uvedeny v *SOP-MGL-007*.

3.3.8. Preimplantační genetické vyšetření monogenních chorob - PGT-M

Jedná se o vysoce specializované vyšetření DNA z buněk embrya na základě indikace klinickým genetikem u onemocnění autozomálně recesivních, autozomálně dominantních a X-vázaných. Před vyšetřením je nutná konzultace s klinickým genetikem a gynekologem IVF centra a provedení laboratorní přípravy v laboratoři pro preimplantační genetické testování. Vyšetření je vždy navázáno na provedení oplození *In vitro* v našem, popřípadě spolupracujícím IVF centru.

Podrobnosti metody jsou uvedeny v *SOP-MGL-008 a SOP-PGTL-002*.

3.3.9. Vyšetření nejčastějších mutací v genu *HFE*

Vyšetření se provádí za účelem detekce nejčastějších mutací (C282Y, H63D a S65C) v genu *HFE* pro hereditární hemochromatózu

Indikace k vyšetření:

- klinické podezření na hemochromatózu (zvýšená sérová koncentrace železa, zvýšená koncentrace sérového feritinu, hepatomegalie, diabetes mellitus, kožní hyperpigmentace)
- prokázaná hemochromatóza nebo mutace genu *HFE* u příbuzného

Podrobnosti metody jsou uvedeny v *SOP-MGL-005 a SOP-MGL-029*.

3.3.10. Vyšetření dědičné dispozice k nádorovým chorobám metodou NGS onkopanellem CZECANCA

Cílem vyšetření je identifikace pacientů/rodin s vrozenou dispozicí k určitým typům nádorů, specifikace onkologického rizika pro členy rodin se zatíženou onkologickou anamnézou a doporučení vhodné prevence v těchto rodinách. Detekují se mutace v kódujících oblastech a přilehlých nekódujících oblastech genů obsažených v panelu CZECANCA dle klinické indikace.

Informace o panelovém testování jsou dostupné v

- Klinické onkologii 2016 Supplementum: Hereditární nádorová onemocnění IV, ke stažení na: <http://www.linkos.cz/casopis-klinicka-onkologie>
- CZECANCA: CZEch CANcer paNel for Clinical Application – návrh a příprava cíleného sekvenčního panelu pro identifikaci nádorové predispozice u rizikových osob v České republice, Soukupová Jana, Zemánková (Boudová) Petra, Kleiblová Petra, Janatová Markéta, Kleibl Zdeněk. Klinická onkologie. 2016; 29(Supplementum 1): 46-54

SQ-014 Laboratorní příručka

Indikace k vyšetření:

Kdy je genetické vyšetření u pacientů s onkologickým onemocněním (nebo jejich příbuzných) vhodné:

- v případě diagnózy nádorového onemocnění v neobvykle mladém věku,
- u osob s různými typy nádorového onemocnění,
- při výskytu oboustranných nádorů v párových orgánech,
- při opakovaném výskytu stejného typu nádorového onemocnění (např. karcinomu prsu nebo karcinomu tlustého střeva a konečníku) v rodině,
- při kombinaci určitých typů nádorů u blízkých příbuzných (karcinom prsu) a vaječníků, karcinom střeva a dělohy), zvláště pak v případech, kdy k manifestaci onemocnění došlo v mladším věku.

O indikaci genetického vyšetření rozhoduje klinický genetik na základě rozboru osobní a rodinné anamnézy pacienta, pokud jsou splněna tzv. „indikační kritéria“ pro vyšetření některého z dědičných nádorových syndromů, jako jsou například Hereditární karcinom prsu a vaječníků, Lynchův syndrom, Familární adenomatózní polypóza, Li- Fraumeni syndrom, Tuberózní skleróza apod.

Indikační kritéria vznikla jako konsensus odborných společností Onkologické a SLG ČLS JEP a byla publikována v Supplementech Klinické onkologie v roce 2009, 2012 a 2016 (www.mou.cz). Pro vyšetření dědičné dispozice k nádorovým chorobám metodou NGS onkopanellem CZECANCA má laboratoř udělenou flexibilitu, jedná se o akreditovaný režim validace postupu vyšetření nového genu v rámci stanovení diagnózy onkologického onemocnění. Součástí tohoto režimu je oznamování nových verzí vyšetřovacích postupů, sledování výsledků interních a externích kontrol kvality vyšetření a v případě zjištěných nedostatků, stažení a revize výsledků vyšetření, včetně těsné komunikace s indikujícími lékaři. Podrobnosti metody jsou uvedeny v **SOP-MGL-013**.

3.3.11. **Vyšetření fragilního X chromozomu:**

Vyšetření se provádí za účelem zjištění přítomnosti a rozsahu expanze CGG tripletů v oblasti IT15 genu *FMRI*.

Indikace k vyšetření:

- pacient s mentální retardací či opožděným mentálním vývojem a/nebo fenotypovými rysy pro FRAXA
- příbuzní pacienta s FRAXA a detekovanou mutací ve *FMRI* genu.
- příbuzní ženy- nositelky premutace nebo intermediální alely *FMRI* genu
- prenatální diagnostika u žen nositelek premutace nebo mutace *FMRI* genu
- ženy s POF
- prekoncepční vyšetření žen s tremorem u rodiče

Podrobnosti metody jsou uvedeny v **SOP-MGL-011** a **SOP-MGL-024**.

SQ-014 Laboratorní příručka

3.3.12. Vyšetření polymorfismu N680S genu *FSHR* metodou Real-Time PCR

Gen *FSHR* kóduje bílkovinu FSHr, která v buňkách vaječníků a varlat váže (působí jako receptor) řídící hormon pohlavních žláz - folikulostimulační hormon (FSH). Vazebné schopnosti FSHr ovlivňuje jedno-nukleotidový polymorfismus (SNP), kterým se mění aminokyselina serin (Ser) na asparagin (Asn) na pozici 680 proteinového řetězce FSHr (Ser680Asn). Deficit FSHr je spojen s přítomností aminokyseliny serin a je nejvyšší u homozygotů Ser680Ser s frekvencí 20% v evropské populaci – je spojen s nižší senzitivitou FSH receptoru na gonadotropiny.

Indikace k vyšetření:

pacientky před léčbou v Centru asistované reprodukce pro nastavení optimální hormonální stimulace.

Podrobnosti metody jsou uvedeny v *SOP-MGL-015*.

3.3.13. Vyšetření HLA znaků asociovaných s celiakií

Celiakální sprue (Celiakie) je chronický zánět sliznice tenkého střeva, při kterém se u geneticky disponovaných osob vlivem netolerance k lepku (glutenu) obsaženému v potravě začínají tvořit protilátky napadající sliznici tenkého střeva. Vyšetření stanovuje přítomnost HLA alel II. třídy, které jsou asociovány se zvýšeným rizikem rozvoje celiakie: HLA-DQ2.5 (DQA1*05/DQB1*02), HLA-DQ2.2 (DQA1*02/DQB1*02) a HLA-DQ8 (DQA1*0301/DQB1*03:02).

Indikace k vyšetření:

- pacienti s nejasnou diagnózou celiakie a podezřením na ni (latentní, silentní formy)
- pacienti s klinickým předpokladem celiakie a vysokou hladinou specifických protilátek pro dg. celiakie bez nutnosti provedení invazivní biopsie (např. u dětí)
- skupiny se zvýšeným rizikem celiakie:
 - přímí příbuzní pacienta s potvrzenou dg. celiakie
 - pacienti s onemocněním, které má asociaci s celiakií (např. DM I. typu, SLE, autoimunní thyreoiditis, M. Down, IgA nefropatie).

Podrobnosti metody jsou uvedeny v *SOP-MGL-022*.

3.3.14. Vyšetření rizikové alely HLA-B27

Vyšetření haplotypu HLA-B27. Stanovení HLA-B27 je primárně používáno jako podpůrné vyšetření při podezření na ankylozující spondylitidu (Bechtěrevova choroba), reaktivní artritidu, juvenilní revmatoidní artritidu nebo u přední uveitidy.

Indikace k vyšetření:

- v anamnéze Bechtěrevova nemoc nebo podezření na ni (dle vyšetření specialisty-revmatolog, ortoped, imunolog)
- jednostranná uveitis přední oční komory často spojená s bolestí zad
- pozitivita HLAB27 u příbuzného I. stupně, rodinná anamnéza M. Bechtěrev nebo podobného revmatického onemocnění

Podrobnosti metody jsou uvedeny v *SOP-MGL-023 a SOP-MGL-029*.

SQ-014 Laboratorní příručka

3.3.15. Neinvazivní prenatalní test aneuploidií chromozomů 13, 18 a 21 z mateřské plazmy

Vyšetření volné (nebuněčné) DNA plodu cirkulující v krvi matky v průběhu gravidity. U těhotných s aneuploidním plodem je poměr mezi mateřskou a fetální cfDNA změněn a toto vyšetření stanoví rozložení (distribuce) volně kolujících úseků kyselinydeoxyribonukleové (cfDNA) podle jejich příslušnosti k chromozomům. cfDNA test je uzavřen jako pozitivní v případě, že je zjištěna statisticky významná odchylka odočekávaného zastoupení úseků volné DNA určitého chromozomu (více než 15 % křivky zachycující trend v rozložení úseků volné DNA je nad horní hranici).

Indikace k vyšetření:

cfDNA test je součástí screeningového programu kliniky GENNET- indikací k vyšetření je riziko kombinovaného screeningu I. trimestru v rozmezí 1/100-1/500 pro plod bez UZ nálezu

Podrobnosti metody jsou uvedeny v *SOP-MGL-014*.

3.3.16. CarrierTest

CarrierTest testuje přenašečství častých a ověřených mutací recesivních genů způsobující více než 60 genetických chorob a stavů, které mohou ohrozit potomky vyšetřovaných. Patří mezi ně cystická fibróza, spinální muskulární atrofie, vrozené vady metabolismu (např. phenyketonurie), poruchy zraku a sluchu, choroby pohybového aparátu a kůže. Mutace další skupiny genů mohou být významné pro léčbu poruch plodnosti (trombofilní profil, odezva na hormonální léčbu). U této skupiny genů se může projevit vliv mutace již u přenašečů.

V genech vyšetřovaných CarrierTestem byly vybrány tzv. „klíčové mutace“, což jsou buď časté mutace pacientů s daným onemocněním (např. mutaci Phe508del genu CFTR přítomnou u 70 % pacientů s cystickou fibrózou) nebo mutace opakovaně publikované u dané choroby.

Výsledek CarrierTestu zcela vyloučí nebo potvrdí přítomnost klíčové mutace. Nevyloučí ale přenašečství jakékoliv mutace zkoumaných genů. Podle odhadu senzitivity testu a frekvence přenašečství mutace daného genu v populaci je výsledkem testu „Reziduální riziko přenašečství“. Od tohoto rizika se odvozuje riziko postižení potomka (míra genetické kompatibility páru). U některých genů CarrierTest cílí pouze na určité mutace (například při testování trombofilního profilu) a v těchto případech je výsledek kategoričtý (mutace přítomna/nepřítomna).

Indikace k vyšetření:

- páry s poruchami reprodukce a před IVF
- pacienti s dědičným onemocněním v osobní nebo rodinné anamnéze
- příbuzenské sňatky
- dárce gamet
- prekoncepční genetické vyšetření u párů bez poruch plodnosti (na žádost pacienta-samoplátci)

SQ-014 Laboratorní příručka

Opatření při zjištění nosičství mutací stejného genu u obou partnerů s vysokým rizikem postižení potomků:

- preimplantační diagnostika – PGT-M . Zárodky vytvořené z vajíček a spermií partnerů v programu asistované reprodukce (IVF) jsou vyšetřeny a do mateřské dělohy vloženy jen zárodky bez nepříznivé kombinace mutací
- použití spermií nebo vajíček od kompatibilních dárců
- prenatalní vyšetření buněk plodu po přirozeném početí z odběru choriových klků (CVS) nebo plodové vody (AMC)
- cílený průkaz dědičné choroby a dostupná léčba co nejdříve po narození

Zjištění mutací genů trombofilního profilu, mutací spojených s terapeutickou odezvou a s chorobami ovlivněnými prostředím může pomoci k cílené léčbě poruch plodnosti a obecné úpravě životního stylu. Pro vyšetření CarrierTestu, který testuje přenašečství častých a ověřených mutací recesivních genů metodou NGS má laboratoř udělenou flexibilitu, jedná se o akreditovaný režim validace postupu vyšetření nových genů v rámci testování přenašečství, které mohou ohrozit potomky vyšetřovaných. Součástí tohoto režimu je oznamování nových verzí vyšetřovacích postupů, sledování výsledků interních a externích kontrol kvality vyšetření a v případě zjištěných nedostatků, stažení a revize výsledků vyšetření, včetně těsné komunikace s indikujícími lékaři. Podrobnosti metody jsou uvedeny v **SOP-MGL-013**.

3.3.17. Klinický Exom GERDA

Exomové sekvenování identifikuje změny v DNA pacienta se zaměřením na nejinformativnější oblasti genomu – kódující DNA neboli exom.

U řady pacientů není kombinace symptomů dostatečně specifická ke stanovení diagnózy. Oproti doposavadním přístupům analýzy jednotlivých genů či menších NGS panelů, umožňuje exomové sekvenování analýzu sekvence kódující všechny lidské geny s následným cílením pomocí virtuálních panelů s ohledem na danou diagnózu. V případě potřeby je pak možné data zpětně prohlédnout a rozšířit indikaci na téměř libovolný gen. Dle odhadů se velká část mutací způsobujících onemocnění (60-85%) vyskytuje právě v kódujících oblastech genomu – exonech. Tento přístup umožňuje identifikovat kauzální varianty v genech, které by byly přehlédnuty příliš cílenými přístupy.

Primárně je analýza na našem pracovišti zaměřena na 7 955 klinicky významných genů – virtuální panel GERDA (Gennet Exome for Rapid Diagnostic Assessment), v případě potřeby lze analyzovat i ostatní geny exomu (20 981 genů). GERDA obsahuje: geny klinických genetických databází (ClinVar: 6381 genů, OMIM s vazbou k ORPHA/OMIM disease: 3698 genů), geny a lokusy obsažené v panelech CarrierTest (70 genů) a Czecanca (310 genů), geny doporučené ACMG guidelines (American College of Medical Genetics) pro reportování náhodných nálezů u vyšetření Exomu (59 genů). Při celoexomovém sekvenování je u jednoho vzorku nalezeno kolem 40 000 variant. Proto je na data aplikována řada filtračních postupů pro získání relevantních variant pro klinické hodnocení u dané rodiny. Využití HPO termínů je jedním z těchto prioritizačních kroků. Přesné rozlišení fenotypu dle HPO je tedy podmínkou úspěšného nalezení genetické kauzality. CNV analýza (velké genové delece/duplikace) – je prováděna v genech odpovídajících fenotypu dle indikujícího lékaře a hodnotícího laboratorního pracovníka.

SQ-014 Laboratorní příručka

Indikace k vyšetření:

- Rekurentní těhotenské ztráty (SAB, UUT pro opakovaný závažný fenotyp)
Trio/Quatro analýza: Matka – Otec – Plod(y) – Potomci bez fenotypu
- Postnatálně pro závažný fenotyp u dětí i dospělých
Trio/Quatro analýza: Matka – Otec – Potomek s fenotypem – Potomci bez fenotypu
- Postnatálně pro výskyt nádorových onemocnění v RA/ v mladém věku, s negativním výsledkem z panelu Czecanca
Duo/Trio/Single: relevantní členové rodiny s/bez fenotypu
- Postnatálně pro fenotyp dědičného onemocnění vyžadující kompletní NGS analýzu více genů
Duo/Trio/Single: relevantní členové rodiny s/bez fenotypu

O indikaci genetického vyšetření rozhoduje klinický genetik na základě rozboru osobní a rodinné anamnézy pacienta.

Pro vyšetření Klinického exomu GERDA, který identifikuje změny v DNA pacienta se zaměřením na nejinformativnější oblasti genomu – kódující DNA neboli exom metodou NGS má laboratoř udělenou flexibilitu, jedná se o akreditovaný režim validace postupu vyšetření nových genů v rámci testování rodin se závažným fenotypem. Součástí tohoto režimu je oznamování nových verzí vyšetřovacích postupů, sledování výsledků interních a externích kontrol kvality vyšetření a v případě zjištěných nedostatků, stažení a revize výsledků vyšetření, včetně těsné komunikace s indikujícími lékaři. Podrobnosti metody jsou uvedeny v **SOP-MGL-013**.

3.3.18. Samostané vyšetření 3 nejčastějších mutací genu *DHCR7* pro Smith-Lemli-Opitz syndrom (SLOS)

Smith-Lemli-Opitz syndrom (SLO syndrom, OMIM 270400) je relativně časté autozomálně recesivní onemocnění, které bylo poprvé popsáno v roce 1964 Davidem Smithem, belgickým pediatrem Lucem Lemlim a Johnem Opitzem u 3 pacientů s mikrocefalií, charakteristickými dermatoglyfickými rysy, hypospadií, opožděním vývoje a těžkou poruchou příjmu potravy. Spektrum malformací u pacientů se SLO syndromem je poměrně rozmanité: mikrocefalie, rozštěp patra, syndaktylie 2/3 prstu, polydaktylie, obličejové malformace, anomálie srdce a ledvin, nejednoznačně diferencovaný genitál u chlapců. Klinické projevy jsou značně variabilní od středně těžkého dysmorfismu s mírnou mentální retardací (SLO I) až po intrauterinní úmrtí (popřípadě úmrtí v ranném věku) plodu se SLO syndromem (SLO II). *DHCR7* gen je lokalizován na 11. chromosomu (11q12-13). Má velikost zhruba 14 kb a je tvořen 9 exony a 8 introny. První dva exony jsou nekódující, start kodon je lokalizován v exonu 3. Exon 9 je největší a obsahuje stop kodon. Smith-Lemli-Opitz syndrom je prevalentní v populacích střední Evropy, v České republice je uváděna incidence na 1/10 000. Frekvence nosičů může být až 2%. V naší laboratoři provádíme screening 3 nejčastějších mutací genu *DHCR7*: c.452G>A (p.Trp151Ter) , c.976G>T (p.Val326Leu) , c.964-1G>C (IVS8-1G>C), které představují asi 81% všech mutací u pacientů se SLOS

Indikace k vyšetření:

- pozitivní TT/Integrovaný test, nebo zvýšené NT v I. trimestru
- abnormální UZ nález ve 20. týdnu s podezřením na SLOS (genitál, srdeční vada)
- postižené dítě s podezřením na SLOS

SQ-014 Laboratorní příručka

Postup k vyšetření SLOS dle indikace:

1. pozitivní TT/Integrovaný test, nebo zvýšené NT v I. trimestru:
 - invazivní PND – vyšetření SLOS se provede na našem pracovišti (screening 3 nejčastějších mutací c.452G>A (p.Trp151Ter) , c.976G>T (p.Val326Leu) , c.964-1G>C (IVS8-1G>C)), v případě detekce jedné mutace ze screening se odešle izolovaná DNA na specializované pracoviště (FN BRNO) k sekvenaci kódující oblasti genu *DHCR7*.
2. abnormální UZ nález ve 20. týdnu s podezřením na SLOS (genitál, srdeční vada):
 - invazivní PND - izolovaná DNA se odešle z naší laboratoře na specializované pracoviště (FN BRNO) k sekvenaci kódující oblasti genu *DHCR7*.
3. postižené dítě s podezřením na SLOS:
 - izolovaná DNA odešle z naší laboratoře na specializované pracoviště (FN BRNO) k sekvenaci kódující oblasti genu *DHCR7*.

Podrobnosti metody jsou uvedeny v *SOP-MGL-028*.

3.3.19. Samostatné vyšetření M2 haplotypu genu *ANXA5*.

Gen *ANXA5* kóduje bílkovinu Annexin5 a je lokalizovaný na 4q27 (MIM 131230), která tvoří zevní ochranu buněčných stěn a zabraňuje vzniku krevních sraženin. Význam Annexinu5 byl prokázán při asistované reprodukci (IVF) a v těhotenství. Směs Annexinu5 vytvářeného plodem a matkou se ukládá na povrchu klků placenty a zabraňuje tam vzniku krevních sraženin, které mohou snižovat kvalitu výživy plodu a vést ke komplikacím těhotenství.

Tvorba Annexinu5 je ovlivněna dědičnými změnami (variantami) ve složení genu. Významné jsou čtyři vyšetřované varianty v regulační oblasti genu *ANXA5* (rs112782763, rs28717001, rs28651243 a rs113588187), které se dědí současně jako tzv. haplotyp *ANXA5*. Riziková kombinace těchto variant tvoří M2 haplotyp *ANXA5*. Přepis genetického kódu do struktury Annexinu5 a jeho tvorba mohou být u nosičů haplotypu M2/*ANXA5* v některých tkáních (například v placentě) zpomaleny.

Indikace k vyšetření:

- opakované spontánní aborty
- neúspěšné ET
- léčba IVF

M2 haplotyp genu *ANXA5* se vyšetřuje vždy u obou partnerů.

Podrobnosti metody jsou uvedeny v *SOP-MGL-027*.

3.3.20. Vyšetření alely *HLA-DQA1*05* a genotypu *rs2097432*

Varianta alely *HLA-DQA1*05A>G* (rs2097432) je spojována s významně vyšší incidencí a rychlejší progresí tvorby protilátek proti léčbě anti-TNF preparáty. Protilátky se vyvinou až u 91% pacientů během jednoho roku léčby.

Toto genetické testování může pomoci personalizovanému výběru anti-TNF terapie a potřeby kombinace této terapie s imunomodulátory, které redukují riziko tvorby protilátek u přenašečů alely *HLA-DQA1*05A>G* (rs2097432) při srovnání s pacienty s WILD genotypem.

Uvádí se, že přibližně 79% pacientů s tvorbou protilékových protilátek (ADA – antidrug antibody) jsou nosiči *HLA-DQA1*05A>G* (rs2097432) alely. Zbývající 21% pacientů vytváří tyto protilátky i bez nosičství této alely.

SQ-014 Laboratorní příručka

Vyšetření se provádí za účelem detekce alely HLA-DQA1*05. V případě pozitivní nálezu následuje genotypizace varianty rs2097432.

Indikace k vyšetření:

- prediktor imunogenicity (rychlosti tvorby protilátek) u pacientů s Crohnovou nemocí léčených anti-TNF preparáty.

Podrobnosti metody jsou uvedeny v *SOP-MGL-026*.

3.3.21. **Vyšetření mutačního statusu genu TPMT alely *1, *2, *3A, B, C (mutace c.238G>C, c.460G>A a c.719A>G)**

Thiopurin S-methyltransferáza (TPMT) je zásadním enzymem pro biodegradaci thiopurinů. Mezi thiopuriny patří protinádorová léčiva thioguanin a merkaptopurin, používaná zejména v hematologii, a imunosupresivum azathiopirin, určený k terapii autoimunitních onemocnění a prevenci rejekce transplantátu. Mezi nežádoucí účinky při odbourávání thiopurinů patří neurotoxicita, hepatotoxicita, myelosuprese a záněty sliznic. Snížená metabolická aktivita enzymu TPMT je důsledkem přítomnosti funkčních polymorfismů v kódující oblasti genu TPMT, z nichž mezi nejčastější deficitní alely v evropské populaci patří TPMT*2, TPMT*3A a TPMT*3C a méně častá TPMT*3B. Klinické projevy deficitu TPMT mohou být závažné pro pacienty, kteří jsou heterozygoty nebo homozygoty pro funkčně variantní alely.

Vyšetření genu TPMT se provádí za účelem detekce alely *1, *2, *3A, B, C (mutace c.238G>C, c.460G>A a c.719A>G).

Indikace k vyšetření:

- vyšetření mutačního statusu genu TPMT je součástí farmakogenetického algoritmu pro individualizaci dávek léčiva před podáním thiopurinových léčiv

Podrobnosti metody jsou uvedeny v *SOP-MGL-035*.

3.3.22. **Vyšetření mutačního statusu genu NUDT15 alely *1, *2, *3, *4, *5 (mutace c. 415C>T, c. 416 G>A a c.52G>A)**

Enzym NUDT15 (nudix hydroláza) se přímo podílí na metabolismu thiopurinových léčiv.

Mutantní varianty NUDT15 jsou spojeny s vyšší hladinou cytotoxických látek, která je zapříčiněna pomalejší přeměnou thiopurinů na neaktivní metabolity. Redukce podávaných dávek thiopurinů u pacientů s prokázanými mutacemi v genu NUDT15 snižuje výskyt toxicity na úroveň srovnatelnou s normální aktivitou NUDT15. Vyšetřením se identifikují pacienti, u kterých vzniká riziko nežádoucích toxických účinků při léčbě thiopurinovými léky.

Vyšetření genu NUDT15 se provádí za účelem detekce alel *1, *2, *3, *4 a *5 (mutace c. 415C>T, c. 416 G>A a c.52G>A)

SQ-014 Laboratorní příručka

Indikace k vyšetření:

- vyšetření mutačního statusu genu NUDT15 je součástí farmakogenetického algoritmu pro individualizaci dávek léčiva před podáním thiopurinových léčiv.
- u pacientů užívajících thiopuriny by mělo být provedeno i molekulárně genetické vyšetření mutací genu *TPMT*

Podrobnosti metody jsou uvedeny v *SOP-MGL-034*.

3.3.23. Endometriální test receptivity metodou masivně paralelního sekvenování

Gennet Endometrium Receptivity Test (GERT) je diagnostický test určený k vyšetření receptivity děložní sliznice (tzv. endometria). Pro zdárný embryotransfer při asistované reprodukce, je důležitá nejen implantace kvalitního embrya, ale i čas, kdy je embryo transferováno. Úkolem GERT je zjistit vhodnou dobu, kdy je endometrium pro embryo správně receptivní. Metodou GERT analyzujeme děložní sliznici na molekulární úrovni a stanovujeme tzv. implantační okno, tedy čas, kdy je endometrium správně vnímavé pro přenos embrya. Nedostatečná receptivita endometria může negativně ovlivnit uhníždění embrya a tím i úspěšnost asistované reprodukce, proto je vyšetření vhodné zejména pro ženy s opakovanými neúspěšnými embryotransfery.

Za účelem tohoto vyšetření je odebrána tkáň endometria pro vyšetření RNA. Biopsie tkáně endometria a vyšetření optimálně probíhá v předchozím cyklu než je plánována implantace embrya. Z odebrané tkáně se izoluje mRNA, jež se následně reverzně transkribuje na komplementární cDNA, z které je připravena sekvenační knihovna následně sekvenována na sekvenátorech platformy Illumina. Sekvenační data jsou nahrána do aplikace ChromGo ve formě fastq, kde dochází k analýze a vydání informace o receptivitě endometria.

Cílem GERT je detekovat expresi relevantních genů na úrovni mRNA v čase odběru. Míra exprese je určena pomocí FPKM (Fragments Per Kilobase Milion), které jsou dále zpracovávány a pomocí bioinformatických výpočtů porovnávány s tzv. transkriptomickým profilem endometria. Tento profil byl definován pro krátké receptivní období a díky němu byl vytvořen predikční model, jež spolehlivě identifikuje receptivní, prereceptivní a postreceptivní fázi a konkrétní implantační okno.

Indikace k vyšetření:

- při opakovaných neúspěšných embryotransferech lze vyšetřit, zda sliznice děložní je v den prováděného embryotransferu receptivní, tedy schopná embryo přijmout.

Podrobnosti metody jsou uvedeny v *SOP-MGL-036*.

SQ-014 Laboratorní příručka

3.4. Centrum asistované reprodukce

Metody asistované reprodukce slouží k léčbě poruch plodnosti partnerských párů. V laboratoři asistované reprodukce se provádí vyšetření kvality reprodukčních buněk a jejich následné použití pro umělé oplodnění.

3.4.1. Vyšetření spermiogramu makro- a mikroskopicky

Na základě mikroskopického vyšetření ejakulátu (spermatu) se orientačně posuzuje plodnost muže. Vyšetřované parametry jsou: objem, viskozita, přítomnost cizorodých součástí, koncentrace, motilita a morfologie. Následuje separace spermií, kdy se ejakulát upraví na optimální množství spermií a oddělí se živé spermie od mrtvých. Upravený vzorek lze použít k inseminaci AIH, in vitro fertilizaci nebo ke kryokonzervaci.

Vyšetření se provádí:

Z ejakulátu

Indikace k metodě

- neplodnost páru
- žádost pacienta
- darování spermií

Z testikulární tkáň

Důvodem je zjištění přítomnosti spermií v odsáté tekutině z punkce nadvarlat (MESA) nebo po biopsii varlat (TESE) a jejich vhodnosti k následnému použití v ART. Hodnotí se počet pohyblivých a nepohyblivých spermií za určitý časový úsek (5min, 10min) a stupeň jejich patologie. Odebraný materiál se hodnotí ihned po odběru po 24 hodinové kultivaci.

Indikace k vyšetření:

- těžké poruchy spermiogeneze
- azoospermie (obturační)

Podrobnosti metody jsou uvedeny v **SOP-IVF-001**.

3.4.2. Kryokonzervace spermií

Kryokonzervace spermií zahrnuje počáteční vystavení ejakulátu kryoprotektivu, zmrazení na teplotu hluboko pod 0 °C a uchovávání v LN2. Součástí tohoto procesu je také pozdější rozmrazení a odstranění kryoprotektiv.

Metoda se provádí:

U ejakulátu

Indikace k metodě:

- uchování spermií pro léčbu neplodnosti páru
- uchování spermií před onkologickou léčbou
- žádost pacienta (social freezing)
- darování spermií

SQ-014 Laboratorní příručka

U testikulární tkáně

Indikace k metodě:

- uchování spermií pro léčbu neplodnosti páru

Podrobnosti metody jsou uvedeny v *SOP-IVF-002*.

3.4.3. **Odběr oocytů, in vitro fertilizace, kultivace embryí a embryotransfer**

Důvodem je získání kvalitních oocytů pro účely in vitro fertilizace. Kvalita získaných oocytů se posuzuje podle stádia meiotického zrání. Pro účely asistované reprodukce jsou použity pouze oocyty v metafázi II se zřetelným pólóvým tělískem. Takovéto oocyty jsou umístěny do kultivačního media a buď spontánně nebo pomocí metody ICSI in vitro oplozeny. Vzniklá embrya jsou před vlastním embryotransferem (ET) kultivována v podmínkách in vitro po dobu 2 až 6 dnů. Na žádost pacienta lze provést asistovaný hatching (AZH). V odůvodněných případech se provádí biopsie trofektodermu za účelem preimplantačního genetického testování - PGT („Preimplantation Genetic Testing“). Podrobnosti o metodách asistované reprodukce jsou uvedeny v příslušných *SOP-IVF*.

Metoda se provádí:

Z folikulární tekutiny

Indikace k vyšetření:

- neplodnost páru
- onkologická léčba
- social freezing
- darování oocytů

Podrobnosti metody jsou uvedeny v *SOP-IVF-003*.

3.4.4. **Kryokonzervace embryí a oocytů**

Účelem kryokonzervace embryí a oocytů je maximální využití získaného biologického materiálu při minimálním zdravotním zatížení pacientky. Zvyšuje se tak celková efektivita procesu ART. Embrya se zamrazují od stadia zygoty až po blastocyty a to pouze s písemným souhlasem obou partnerů. Oocyty se mrazí pouze s písemným souhlasem pacientky.

Metoda se provádí:

U oocytů a embryí

Indikace k metodě:

- uchování nadbytečných embryí po ET pro další léčbu
- riziko OHSS,
- nedostatečná proliferace děložní sliznice
- PGT
- darování oocytů
- social freezing

Podrobnosti metody jsou uvedeny v *SOP-IVF-005*.

SQ-014 Laboratorní příručka

3.4.5. Asistovaný hatching

Účelem metody je zvýšit pravděpodobnost nidace embrya. V podmínkách in vitro kultivace dochází ke zvýšení tuhosti ZP. V takovém případě ji pak embryo nedokáže protrhnout a zcela opustit ZP což je nutný předpoklad k jeho následné nidaci. Bez nidace nemůže dojít k další proliferaci a diferenciaci embrya a tím pádem k prosperující graviditě. Opodstatněné použití má AH i u embryí po rozmrazení, protože proces mrazení/rozmrazení je dalším faktorem, který může negativně ovlivnit schopnost embrya protrhnout ZP a vycestovat.

Zvláštním typem AH je celkové odstranění ZP. Tento AH provádíme v případě, kdy je u pacientky zjištěna zvýšená hladina protilátek proti ZP, které mohou být důvodem opakovaného selhání nidace embrya v děloze. Tuto techniku AH nazýváme ZONA FREE.

Metoda se provádí:

U embrya

Indikace k metodě AZH:

- silná a/nebo tuhá ZP
- opakovaný neúspěch IVF
- kryokonzervace embryí
- biopsie embryí
- přání pacientka

Indikace k metodě ZONA FREE:

- zvýšená hladina protilátek proti ZP

Podrobnosti metody jsou uvedeny *SOP-IVF-004*.

3.4.6. Biopsie embryí pro preimplantační genetické testování (PGT)

Tato metoda slouží k odběru buněk embrya pro vyšetření PGT uvedené v kap. 3.2.3 - 3.2.4; 3.3.8

Metoda se provádí:

U embrya

Indikace k metodě:

- Indikace lékaře - genetika

Podrobnosti metody jsou uvedeny *SOP-IVF-006*.

SQ-014 Laboratorní příručka

3.4.7. MACS

Metoda MACS je určena pro selekci a odstranění apoptotických, k fertilizaci nevhodných, spermií ze vzorku ejakulátu před dalšími metodami asistované reprodukce (IVF, ICSI, IUI, kryokonzervace, atd.).

Metoda se provádí:

U ejakulátu

Indikace k metodě:

- neplodnost páru
- opakované neúspěchy v léčbě neplodnosti
- zvýšená fragmentace DNA u spermií
- vysoký podíl apoptotických spermií v ejakulátu
- žádost pacienta

Podrobnosti metody jsou uvedeny **SOP-IVF-007**.

3.4.8. MFSS

Mikrofluidic Sperm Sorting je šetrnou alternativou standardního zpracování spermií pomocí čipu. Metoda je určena k výběru normálních zdravých spermií za účelem ICSI nebo IUI/IVF. Na rozdíl od ostatních metod nevyžaduje žádnou předchozí úpravu vzorku spermatu a použití přístrojů (např. odstředivka), čímž snižuje oxidativní stres spermií.

Metoda se provádí:

U ejakulátu

Indikace k metodě:

- neplodnost páru
- opakované neúspěchy v léčbě neplodnosti
- zvýšená fragmentace DNA u spermií
- vysoký podíl apoptotických spermií v ejakulátu
- žádost pacienta

Podrobnosti metody jsou uvedeny **SOP-IVF-008**.

SQ-014 Laboratorní příručka

3.5. Imunologická laboratoř

Imunologická laboratoř zajišťuje služby v oboru 813 – Laboratoř alergologická a imunologická. Pracoviště je zaměřeno na diagnostiku autoimunitních chorob, imunodeficiencí, alergií a jiných imunopatologických chorob spojených především s poruchou plodnosti. Jsou zde prováděna vyšetření biologických materiálů (krev, seminární plazma, stolice a jiné). Přehled prováděných vyšetření je uveden v *SQ-014 P1 Seznam vyšetření IML*.

4. Obecné informace o provedení objednávky vyšetření

Pro požadavky na vyšetření v Laboratořích GENNET doručujeme použít žádanky Laboratoří GENNET, které splňují veškeré formální náležitosti vyžadované zdravotními pojišťovnami a jsou k dispozici na <http://www.gennet.cz/pro-lekare>. Pro genetické vyšetření a na metody, kde je potřeba souhlas pacienta, je k dispozici i obecný informovaný souhlas s vyšetřením. Laboratoř ale může přijmout jakýkoliv typ žádanky s povinně vyplněnými základními identifikačními znaky (např. Poukaz na vyšetření/ošetření K-06 dle platné metodiky VZP).

4.1. Základní identifikační znaky požadované a povinně uváděné na žádance

- jméno a příjmení pacienta
- pohlaví pacienta
- datum narození pacienta
- číslo pojištěnce (rodné číslo, číslo pojištěnce, u cizince vygenerované náhradní číslo z SW dle data narození)
- kód pojišťovny pacienta nebo údaj, že se jedná samoplátce (genetické vyšetření pak není hrazeno ze ZP, ale je provedeno za přímou úhradu)
- identifikace žadatele - indikujícího lékaře a zdravotnického zařízení (razítko, které musí obsahovat tyto údaje - jméno, odbornost, IČP, pracoviště, razítko, podpis)
- druh primárního vzorku
- požadovaná vyšetření, vč. naléhavosti (statim)
- základní diagnóza a další diagnózy pacienta
- klinická data
- datum a čas odběru vzorku - je nezbytné uvádět vzhledem k nutnosti sledovat dodržení podmínek preanalytické fáze
- datum a čas příjmu vzorku do laboratoře – je nutné uvádět vzhledem k nutnosti sledovat dodržení doby odezvy

SQ-014 Laboratorní příručka

Nepovinné nebo fakultativní údaje:

Na volné místo na žádance lze uvést doplňující informace jako např. bydliště pacienta, telefon na pacienta, nebo další kontakt na žadatele – indikujícího lékaře.

Současně se může dále jednat o klinické informace týkající se pacienta a vyšetření (pro interpretační účely), popis typu primárního vzorku a případně i anatomická specifikace místa odběru, respektive podmínek, za kterých byl odběr realizován (např.: s manžetou - bez manžety, vleže - vsedě, s blíže specifikovanou zátěží atd.). V případě potřeby je nutné tyto informace sdělit separátně.

4.2. Identifikační označení primárního vzorku

Každý biologický materiál musí být označen štítkem obsahujícím **minimálně**:

1. jméno a příjmení pacienta
2. identifikační číslo (rodné číslo pacienta, případně datum narození)

U samoplátců (např. cizinci) pokud není uvedeno rodné číslo, je vždy uvedeno datum narození pacienta.

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

5. Žádanka na laboratorní vyšetření

Laboratoře GENNET přijímají požadavky od externích lékařů či interních lékařů společnosti GENNET, s.r.o..

5.1. Příjem interních požadavků

V případě interního odběru vzorku (společnost GENNET, s.r.o.) jsou na příslušných odděleních zaznamenány požadavky na daná vyšetření do systému „SmartMEDIX“ v případě IVF laboratoří a Imunologické laboratoře. V případě genetických laboratoří se požadavek zaznamenává v systému „GLEX“, kde je vytvořena interní žádanka, která je společně se vzorkem předána do příslušné laboratoře provádějící vyšetření. V případě genetických laboratoří a imunologické laboratoře je tato interní žádanka současně elektronicky přenesena do příslušného LIS.

Laboratoře GENNET nezajišťují odběr biologického materiálu. Odběry biologického materiálu zajišťují zdravotní sestry a jejich činnost spadá pod ambulantní složku společnosti GENNET, s.r.o.. Dále jsou odběry vzorků zajištěny odběrovou místností laboratoře VIDIA-DIAGNOSTIKA.

V případě odběrů v rámci jedné pobočky společnosti jsou vzorky opatřeny interními žádankami, které generuje systém „SmartMedix“. Vzorky krve a ejakulátu jsou následně 60 minut po odběru, osobně předány zdravotním pracovníkem do příslušné laboratoře provádějící vyšetření v uzavíratelných, označených a dezinfikovatelných boxech, tak aby nedošlo k poškození vzorku během transportu. S ohledem na umístění odběrové místnosti a laboratoře v jedné společné budově, není při tomto typu transportu monitorována teplota ani vyhodnocována doba transportu. Toto se týká pouze laboratoří IVF a imunologické laboratoře.

SQ-014 Laboratorní příručka

Mezi pobočkami společnosti GENNET, s.r.o. jsou vzorky transportovány vždy řidičem společnosti GENNET, s.r.o. Svoz probíhá v uzavíratelných, označených a dezinfikovatelných boxech tak, aby nedošlo k poškození vzorku během transportu. Boxy jsou vybaveny kalibrovaným min. - max. teploměrem. Pokud se jedná o transport vzorků na suchém ledu, teplota není monitorována.

Pokud jsou vzorky předávány k dalšímu zpracování do jiné laboratoře, je vedena evidence těchto vzorků v příslušné laboratoři, která vzorky po zpracování předává dál.

5.2. Příjem externích požadavků

Pokud se jedná o požadavky na genetická vyšetření, jsou všechny tyto požadavky soustředěny na pobočku Pekařská, kde si je přebírá centrální příjem vzorků. Externí žádanka na vyšetření je pracovníkem centrálního příjmu vzorků přiložena k interní žádance vytvořené v systému „GLEX“ a společně se vzorkem jsou obě žádanky předány do příslušné genetické laboratoře. Tato interní žádanka je současně elektronicky přenesena do příslušného LIS.

V případě imunologické laboratoře, jsou doručovány žádanky od externích lékařů přímo do imunologické laboratoře a jsou zapisovány do jejich systému DsSoft. Na žádost externího lékaře rep. externího pracoviště je možné nainstalovat modul DSClient, který umožní tvorbu elektronické žádanky a přenos požadavků od externího lékaře do systému DSSoft. V případě laboratoří IVF neprobíhá příjem externích požadavků.

V případě laboratoří IVF neprobíhá příjem externích požadavků.

Vzorky jsou transportovány jak externími svozovými službami, tak řidičem společnosti GENNET, s.r.o. Požadavky na podmínky transportu a stability vzorků jsou definovány v *příloze č. 6* této *Laboratorní příručky*. Kontrolu dodržování podmínek preanalytické fáze provádí pracovník centrálního příjmu vzorků nebo přímo pracovník příjmu příslušné laboratoře.

V případě požadavku na více typů genetických vyšetření je pracovníkem centrálního příjmu vzorků vytvořena kopie externí žádanky. Příslušná laboratoř má tedy vždy k dispozici interní žádanku a originál či kopii externí žádanky.

Pokud jsou vzorky předávány k dalšímu zpracování do jiné laboratoře, je vedena evidence těchto vzorků v příslušné laboratoři, která vzorky po zpracování předává dál.

6. Požadavky na urgentní vyšetření

Požadavky na genetická vyšetření STATIM (akutní, „přednostní“ vyšetření) se do laboratoří dodávají na stejných žádankách generovaných ze systému „GLEX“, jako pro ostatní běžná vyšetření, ale jsou navíc označeny slovem STATIM. Žádanka musí obsahovat stejné povinné údaje, jako u běžného vyšetření. **Vzorek bude přednostně zpracován a odečten.**

Imunologická laboratoř a laboratoře IVF v režimu STATIM nepracují, v případě urgentního zpracování je třeba telefonická domluva.

SQ-014 Laboratorní příručka

Poznámka: Všechna genetická vyšetření plodové vody a choriových klků jsou povahy STATIM. Tento typ materiálu zastupuje explicitní označení STATIM.

7. Ústní požadavky na vyšetření

Laboratoř může přijmout ústní (telefonický) požadavek na vyšetření v případě, že byl do laboratoře doručen materiál a žádanka daného pacienta, laboratoř má archivován dostatek materiálu a umožňuje-li to povaha požadovaného vyšetření (stabilita). Požadavek je přijímán od lékaře, nikoli od pacientů. Žadatel, ale musí vždy dodat novou samostatnou žádanku s indikací dodatečného vyšetření. Toto neplatí pro vyšetření spermiogramu.

8. Důvody pro odmítnutí vzorků pro zpracování

8.1. Odmítnutí požadavku

Vzorky, které nevyhovují daným kritériím na kvalitu dodaného materiálu **nejsou dále zpracovávány**; naše žadatele (zákazníky) informujeme telefonicky a žádáme o nový odběr.

Laboratoř může odmítnout:

- žádanku s biologickým materiálem, na které chybí nebo jsou nečitelné základní údaje (povinné dle kapitoly 4.2)
- žádanku nebo odběrovou nádobu znečištěnou biologickým materiálem, nebo jakoli jinak poškozenou odběrovou nádobou
- nádobu s biologickým materiálem, kde není způsob identifikace materiálu z hlediska nezaměnitelnosti dostatečný, za dostatečnou identifikaci materiálu se považuje splnění uvedených pokynů o nezbytné identifikaci biologického materiálu
- nádobu s biologickým materiálem, kde zjevně došlo k porušení doporučení preanalytické fáze a výsledky vyšetření by byly negativně ovlivněny kvalitou materiálu; takové zjištění je zapsáno do Knihy neshod při příjmu vzorků s uvedením data, identifikace pacienta, zaměstnance laboratoře, důvodu odmítnutí a komu bylo odmítnutí hlášeno. Současně jsou záznamy o nedodržení podmínek preanalytické fáze uváděny na interní žádanku. V případě neshody zjištěné v IML je informace zapsána i do systému DsSoft – záložka Neshody u konkrétního pacienta. Všechny tyto neshody jsou centrálně evidovány na intranetu v Knize neshod. V příslušné laboratoři jsou následně vyhodnoceny odpovědným pracovníkem rizika možného ovlivnění výsledků vyšetření. Pokud je riziko shledáno jako významné, je vždy uveden i záznam na výsledkový list
- biologický materiál bez žádanky (bez uvedení požadavků oprávněné osoby)

8.2. Postupy při nesprávné nebo neúplné identifikaci vzorku nebo žádanky

- neúplnost údajů na žádance – údaje jsou doplněny ústní domluvou/telefonicky, záznam se provádí na žádanku a žadatel je požádán o doplnění nebo zaslání nové žádanky. V případě IML se dodatečně zjištěné údaje dopisují přímo do systému DsSoft, záložky Neshody u konkrétního pacienta
- v případě, že se jedná o nenahraditelný biologický materiál (vzácný materiál, nemožnost zajištění dalšího odběru apod.) a není jednoznačně identifikovaný, laboratoř začne tento materiál vždy

SQ-014 Laboratorní příručka

zpracovávat, ale výsledky nebudou uvolněny, dokud požadující lékař nebo osoba odebírající materiál nepřevzme odpovědnost za doplnění správných identifikačních údajů.

- Laborantka daného oddělení doplní informace do příslušné laboratorní knihy s uvedením jména pracovníka, který poskytl doplňující informace a vlastní podpis. Na výsledkovém listě bude uvedena podstata problému a případně upozornění, že je nutno výsledek interpretovat s opatrností

9. Prohlášení o souhlasu

Před každým genetickým vyšetřením musí být pacient lékařem (žadatelem) seznámen s účelem, povahou a důsledkem prováděného vyšetření. Svým podpisem Informovného souhlasu pak stvrzuje, že souhlasí s odběrem a provedením indikovaného genetického vyšetření, včetně případného uchování vzorku izolované DNA. V případě invazivní prenatální diagnostiky po poučení klinickým genetikem podepisuje pacientka Prohlášení před aminocentézou, CVS nebo kordocentézou, kde souhlasí s provedením daného invazivního výkonu.

Informovaný souhlas pro externí žadatele je k dispozici na <http://www.gennet.cz/pro-lekare>, Informované souhlasy pro interní požadavky (GENNET, s.r.o.) jsou generovány přímo ze systému SmartMedix a jsou uloženy ve zdravotnické dokumentaci pacienta v ambulantní části společnosti GENNET, s.r.o.

V případě vědeckých studií, které probíhají v Imunologické laboratoři, podepisují účastníci těchto studií informovaný souhlas s příslušnou studií, který je naskenován do systému DsSoft a je archivován společně se žádankami.

10. Informace pro odběr biologického materiálu včetně minimálního množství

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

10.1. Odběrové nádoby

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

Doporučujeme užívat níže uvedené odběrové systémy, **minimálně konzervační látky:**

- **Plodová voda nebo choriové klky**
 - Zkumavky BD Vacutainer Z nebo sterilní kultivační lahvičky pro TK. Odběr do zkumavek bez konzervační látky.
- **Produkt koncepce (tkáň plodu/ a nebo placenty) QF-PCR a array**
 - Tkáň plodu ve fyziologickém roztoku – nepoužívat formaldehyd, vždy odebírat krev matky do K3EDTA k vyloučení případné maternální kontaminace
- **Ejakulát**
 - Sterilní kontejner se šroubovacím víčkem
- **Folikulární tekutina**
 - Sterilní 14 ml zkumavka s víčkem

SQ-014 Laboratorní příručka

- **Materiál z MESA, TESE**
 - Sterilní 14 ml zkumavka s víčkem nebo injekční stříkačka (1 ml)
- **Zamražený materiál**
 - specifický nosič určený pro kryokonzervaci nebo vitrifikaci lidských reprodukčních buněk a embryí
- **Buňky trofektodermu na PGT**
 - mikrozkušavky s příslušným pufrem u metody NGS/karyomapping
- **Bukální stěry**
 - stěrový tampon k PCR vyšetření
- **Periferní krev**
 - na chromozomální vyšetření (karyotyp): zkumavky Vacuette (zelené víčko) s náplní lithium Heparin
 - na molekulárně genetické a molekulárně cytogenetické vyšetření: zkumavky Vacuette (fialové víčko) s náplní K3EDTA
 - na molekulárně genetické vyšetření (dovyšetření pro onkopanel CZECANCA - RNA izolace a sekvenační analýza):
 - sterilní 10 ml zkumavka Tempus™ Blood RNA Tube – na vyžádání k dispozici u vedoucí CPV (Tel.: 242 456 779)
 - vyšetření buněčné imunity zkumavky BD Vacutainer (zelené víčko) s náplní lithium Heparin. Je možné použít i odběrový systém jiného výrobce.
 - vyšetření látkové imunity (komplement, protilátky, proteiny akutní fáze): zkumavky Vacuette (červené nebo zlaté víčko) bez přísad. Je možné použít i odběrový systém jiného výrobce.
- **Pupečníková (fetální) krev**
 - na chromozomální vyšetření (karyotyp): zkumavky Vacuette (zelené víčko) s náplní lithium Heparin
 - na molekulárně genetické a molekulárně cytogenetické vyšetření: zkumavky Vacuette (fialové víčko) s náplní K3EDTA
- **FTA**
 - na molekulárně genetické a molekulárně cytogenetické vyšetření
- **Izolovaná DNA**
 - na molekulárně genetické a molekulárně cytogenetické vyšetření
- **Stolice**
 - sterilní kontejner se šroubovacím víčkem
- **Vzorek endometria (biopsie)**
 - uzavíratelná sterilní zkumavka/nádobka se speciálním kultivačním médiem, dodá na požádání laboratoř

Při odběru je nutné vždy odběrové nádobky/zkumavky řádně označit dle výše uvedených pravidel.

Pozor na záměnu biologického materiálu!

Nestandardní odběr je nutno specifikovat na průvodce.

SQ-014 Laboratorní příručka

10.2. Doporučený postup při odběru

10.2.1. Invazivní prenatalní vyšetření

Invazivní prenatalní vyšetření provádí po ultrazvukovém vyšetření pod kontrolou ultrazvuku a za sterilních podmínek lékař Fetální medicíny- gynekolog. Všechny výkony se provádí při prázdném močovém měchýři.

- odběr plodové vody (amniocentéza)
- odběr choriových klků (CVS)
- odběr krve plodu z pupečnicku (kordocentéza)

Amniocentéza se provádí ambulantně za sterilních podmínek a těhotná při výkonu leží. Břišní stěnu dezinfikujeme a následně se vpichem v oblasti podbřišku se do dutiny děložní zavede jehla na jedno použití o průměru 0,7-0,9 mm, na kterou se nasadí sterilní vakuová zkumavka.

Poloha hrotu jehly je stále kontrolována ultrazvukem. Výkon se provádí bez lokálního umrtvení. Optimálním obdobím pro provedení aminocentézy je 15. -17. týden těhotenství.

CVS se provádí ambulantně za sterilních podmínek a těhotná při výkonu leží. Vpichem v oblasti podbřišku se do placentární tkáně zavede jehla o průměru 1,2mm na jedno použití. Místo vpichu se místně znecitliví. Poloha hrotu jehly je stále kontrolována ultrazvukem. Vyjíměčně je zapotřebí opakování odběru, pokud se získá málo materiálu. Výkon se provádí při prázdném močovém měchýři. Optimálním obdobím pro provedení CVS je 11. -13. týden těhotenství.

Kordocentéza se provádí za sterilních podmínek a těhotná při výkonu leží. Odběr krve plodu je proveden jehlou na jedno použití o průměru 0,42-0,53 mm přes břišní a děložní stěnu asi 1 cm nad odstupem pupečnicku z plodové plochy placenty, méně často z volné kličky nebo úponu pupečnicku na břišní stěně plodu. Výkon se provádí bez lokálního umrtvení. Poloha hrotu jehly je kontrolována ultrazvukem. Odebírá se 3 - 4 ml krve.

V ojedinělých případech je nutno odběr opakovat. V případě odběru provedeného ve vyšších týdnech gravidity je potřeba brát v úvahu, že přerušeni těhotenství z důvodu poškození plodu je až na výjimky povoleno pouze do konce 24. týdne těhotenství.

Invazivní odběry (aminocentézu, CVS i kordocentézu) lze přirovnat k odběru krve. Většina žen udává, že vpich je nebolestivý a je vnímán jako tupý tlak. Celý zákrok trvá několik minut. Po výkonu, pokud se těhotná cítí dobře, může s doprovodem odejít domů. Po zákroku doporučujeme 3 dny klidového režimu. Vhodná je asi týdenní pracovní neschopnost, kterou vystaví dle svého uvážení oš. gynekolog.

Nejzávažnější komplikací těchto invazivních odběrů je samovolný potrat. Riziko je závislé na stavu plodu před výkonem a může se snížit, bude-li dodržován lékařem doporučený klidový režim. Riziko nechtěné ztráty těhotenství v souvislosti s aminocentézou/CVS je dle dlouholetých zkušeností o 0,5 – 1 % vyšší než je obecné populační riziko. Riziko potratu po kordocentéze je zvýšeno o 0,8 % - 1% oproti obecnému riziku těhotenské ztráty, v některých případech může však dojít i k odúmrtí plodu v důsledku krevní sraženiny v pupečnicku. Tato komplikace se udává v 1,4% případech.

SQ-014 Laboratorní příručka

Termín invazivního odběru se domluví při genetické konzultaci na našem pracovišti (ambulanci Lékařské genetiky). Pokud se odběr neprovádí na našem pracovišti, je nutné zajistit transport do laboratoře co nejdříve. Při časovém odstupu delším než 8 hodin je nutné udržovat vzorek při teplotě 2 až 8 °C.

10.2.1.1. Specifika odběru pro cytogenetická vyšetření

Minimální odebrané množství potřebné pro vyšetření plodové vody je **10 ml**. Při standardním odběru je odsáto do tří zkumavek celkem 20 ml plodové vody, tj. pouze 5 % celkového množství plodové vody. Odsáté množství se do několika málo hodin opět doplní. Standardně je při CVS odebráno asi 5 – 40 mg choriových klků. Standardně jsou při kordocentéze odebrány 3 - 4 ml krve.

10.2.1.2. Specifika odběru pro molekulárně genetická vyšetření

Minimální odebrané množství PV/pupečnickové krve dodané na vyšetření je 1 ml, optimální množství PV je 10 ml a pupečnickové krve 2 ml. Minimální odebrané množství potřebné pro vyšetření choriových klků je 5mg.

10.2.2. Odběr periferní krve

Odběr materiálu na cytogenetické, molekulárně genetické i imunologické vyšetření nevyžaduje žádnou speciální přípravu pacienta.

Krev se odebírá z periferní žíly v loketní jamce. Paže se volně položí, dezinfikuje se místo vpichu (např. Cutasept, Braunoderm) – **nesmí se používat dezinfekce s obsahem jodu**, které by mohly být příčinou neúspěšné kultivace.

Po stabilizování polohy provedeme vpich jehlou s nasazeným nástavcem a po té se na nástavec nasadí příslušná zkumavka. Místo vpichu se zakryje čtverečkem z buničiny, opatrně se přitlačí a vytáhne jehla a přelepíme náplast. Vyzveme pacienta, aby si tisknul místo vpichu (cca 2-5 minut) a po cca 20 minutách si náplast odstraní.

10.2.2.1. Specifika odběru pro cytogenetická vyšetření (karyotyp)

Optimální množství jsou 4 – 5 ml krve, minimálně však **2 ml** (např. u malých dětí). Ihned po odběru je nutné zkumavku promíchat. Pro cytogenetické vyšetření je zkumavka se zeleným víčkem (**heparin**).

Odebraná krev se uchovává v lednici při teplotě 2 až 8 °C. Transport do laboratoře je nutno zajistit co nejdříve. Externě odebíraný materiál je do laboratoře dopravován svozem za dodržení pravidel bezpečnosti práce s biologickým materiálem.

10.2.2.2. Specifika odběru pro molekulárně genetická a molekulárně cytogenetická vyšetření

Optimální množství jsou 2 ml krve, minimálně však 400 µl. Pro molekulárně genetické a molekulárně cytogenetické vyšetření je zkumavka s fialovým víčkem (**K₃EDTA**).

Odebraná krev se uchovává v lednici při teplotě 2 až 8 °C. Transport do laboratoře je nutno zajistit co nejdříve. Externě odebíraný materiál je do laboratoře dopravován svozem za dodržení pravidel bezpečnosti práce s biologickým materiálem.

SQ-014 Laboratorní příručka

10.2.3. Specifika odběru pro imunologická vyšetření

V imunologické laboratoři se odběr a skladování vzorků řídí pokyny uvedenými v příslušných SOP. Primární odběrový materiál je skladován maximálně 3 dny v lednicích při teplotách 2 až 8 °C. Vzorky nerážlivé krve pro vyšetření buněčných testů jsou uchovány maximálně 3 dny při pokojové teplotě. Sekundární materiál (sérum, plazma) jsou po alikvotování uchovávány v lednici při 2 až 8°C nebo zamražený. Ejakulát je uchováván maximálně do druhého dne při pokojové teplotě. Zkumavky s materiálem musí být do laboratoře doručeny co nejdříve po odběru. Při přepravě je nutné zajistit transport v boxech zamezujících znehodnocení vzorku mrazem nebo horkem. Externě odebraný materiál je do laboratoře dopravován svozem za dodržení pravidel bezpečnosti práce s biologickým materiálem.

Doporučené množství plné krve /ejakulátu/stolice při primárním odběru:

Humorální imunita	běžný odběr 4-8 ml srážlivé krve v závislosti na množství požadavků
Buněčná imunita	odběr minimálně 2 ml nesrážlivé krve - Heparin (při odběru do K ₃ EDTA nelze vyšetřit funkční testy)
Stolice	Odběr stolice o velikosti lískového oříšku do sterilní nádoby – vyšetření Kalprotektin
Reprodukční imunologie	Minimálně 0,5 ml ejakulátu do sterilní zkumavky
Uterinní NK	Minimálně 10 mg děložní endometriální tkáň do sterilní uzavíratelné zkumavky s 2 ml kultivačního média X-Vivo

10.2.4. Odběr potracené tkáňe - produktů koncepce (tkání plodu a placenty) k vyšetření QF-PCR a array

Odběr produktů koncepce provádí vždy lékař-gynekolog ve zdravotnickém zařízení. Odebraný materiál za sterilních podmínek vloží do sterilní označené zkumavky či nádoby s fyziologickým roztokem a s řádně vyplněnou žádankou/průvodkou dopraví do laboratoře. Současně se provede odběr 5-10 ml krve pacientky do zkumavky s EDTA k vyloučení ev. maternální kontaminace odebraného vzorku.

10.2.4.1. Specifika odběru pro molekulárně genetická a molekulárně cytogenetická vyšetření

Odebraný materiál se uchovává v lednici při teplotě 2 až 8 °C. Transport do laboratoře je nutno zajistit co nejdříve. Externě odebraný materiál je do laboratoře dopravován svozem za dodržení pravidel bezpečnosti práce s biologickým materiálem.

10.2.5. Odběr ejakulátu

Odebírá se po 2-5 denní pohlavní abstinenci a pečlivém dodržení hygieny (omyté ruce a pohlavní orgány). Odběr je proveden masturbací do speciálního sterilního kontejneru se šroubovacím víčkem. Vzorek by měl být získán tak, aby nedošlo k úniku části ejakulátu mimo sterilní kontejner, a nesmí být znečištěn jinými tělními tekutinami.

SQ-014 Laboratorní příručka

10.2.5.1. Specifika odběru

Odběr ejakulátu pro vyšetření spermogramu nebo na cytometrické vyšetření kvality spermií je možné výjimečně provést doma a vzorek pak přinést na pracoviště. V těchto případech je nutné použít předem označenou sterilní nádobu vydanou pracovníky naší kliniky. Na nádobce je nalepen štítek, který, pokud již není vyplněný, před odběrem vyplňte. Po odběru musí být nádobka pevně uzavřená, s vyplněným přesným časem odběru a dopravená do příslušné laboratoře do 60 minut. Při tom je nutné zajistit teplotu, co nejbližší teplotě lidského těla (ideálně **při teplotě 20 až 37 °C**).

Vzorek musí na našem pracovišti předat muž, jemuž vzorek patří, a při tom se prokázat dokladem totožnosti s fotografií, na základě kterého bude provedeno ověření jeho totožnosti.

10.2.6. Odběr folikulární tekutiny

Odběr provádí lékař punkcí folikulů na operačním sále do zkumavek s víčkem. Zkumavky pro odběr folikulární tekutiny jsou po celou dobu odběru umístěny ve vyhřívacím stojánku přímo na sále. Po předání do laboratoře je obsah každé zkumavky prohlédnut pod stereolupou. Nalezené oocyty jsou přemístěny do kultivačního média a folikulární tekutina uzavřena zpět do zkumavky.

10.2.6.1. Specifika odběru

Odebraný vzorek je nutné předat do laboratoře a **nejpozději do 15 min od odběru zpracovat**. Je nutné zabránit podchlazení vzorku pod 37 °C.

10.2.7. Odběr materiálu z MESA, TESE

Odběr provádí lékař aspirací z nadvarlete (MESA) do sterilní injekční stříkačky (1 ml) nebo biopsií varletní tkáně (TESE) do 14 ml sterilní zkumavky. Jednotlivé vzorky jsou po odběru ihned předány do laboratoře IVF, kde se prohlédnou pod mikroskopem a vyhodnotí se přítomnost a kvalita spermií.

10.2.7.1. Specifika odběru

Odebraný vzorek je nutné okamžitě dopravit do laboratoře **nejpozději do 15 min od odběru vyhodnotit**. Je nutné zabránit podchlazení vzorku pod 37 °C.

10.2.8. Odběr buněk trofektodermu na PGT

Odběr provádí embryolog v laboratoři IVF za využití mikromanipulačního zařízení a nástrojů. Pro PGT vyšetření jsou buňky trofektodermu odebírány z 5-6 denního embrya. Po odběru jsou buňky umístěny do pufrů v mikrozskumavkách dodaných laboratoří PGT a transportovány za stanovených podmínek do laboratoře PGT. Odebrané vzorky musejí být do zpracování (transport, manipulace a uskladnění) udržovány při minimální teplotě – 15 °C. Stabilita vzorku je při uchování na dostatečném množství suchého ledu nebo v podmínkách minimálně – 15 °C neomezená.

10.2.8.1. Specifika odběru

Odběr musí probíhat za přísně sterilních podmínek (ochranné pomůcky, čistota prostředí A), aby nedošlo ke kontaminaci vzorků cizí DNA.

SQ-014 Laboratorní příručka

10.2.9. Odběr zamraženého materiálu

Odběr (převzetí) provádí pracovník v laboratoři IVF. Vzorky musí být zamrazeny ve specifickém nosiči určeným výhradně pro kryokonzervaci nebo vitrifikaci lidských reprodukčních buněk a embryí podle postupů výrobce.

10.2.9.1. Specifika odběru

Teplota vzorku do zpracování (transport, manipulace a uskladnění) musí být udržována pod -150°C .

10.2.10. Odběr slizničního stěru z dutiny ústní (bukální stěr)

Odběr provádí sestra nebo konzultující lékař. Pacientovi se dle pokynů vytře sliznice dutiny ústní sterilním tamponem (např. Dispolab, OmniSwab apod.) a výtěr vloží do označené zkumavky.

V rámci našeho pracoviště je toto vyšetření prováděno po předchozím objednání pacienta k odběru nebo konzultaci v ambulanci Lékařské genetiky.

Před odběrem by měl pacient minimálně 1 hodinu nejíst, nepít (ev. jen nesycenou vodu) a nežvýkat.

10.2.10.1. Specifika odběru

Materiál je možno uchovávat v lednici při teplotě 2 až 8°C maximálně 14 dnů, po té je nutno skladovat v mrazáku při teplotě -18 až -22°C .

10.2.11. Protokolární odběr k DNA paternitní expertíze s posudkem soudního znalce

Protokolární odběr probíhá za přítomnosti soudního znalce je nutné objednání odběru v naší ambulanci nebo u soudního znalce.

- během protokolárního odběru se ověřuje totožnost pomocí platných dokladů (OP, pas, rodný list, nebo jiný platný doklad totožnosti)
- součástí odběru je zhotovení fotografie zúčastněných osob
- žadatel o vyšetření si může zvolit druh primárního vzorku (bukální stěr nebo periferní krev)
- během odběru se sepisuje protokol o odběru, jehož součástí je – jméno, rodné číslo, adresa, a **prohlášení domnělého otce a matky:**
 - o správném označení odebraného vzorku
 - o správnosti uvedené totožnosti
 - o tom, zda byla či nebyla provedena alogenní transplantace kostní dřeně a zda byla či nebyla v době 6 týdnů před odběrem podána transfuze krve
 - souhlas pro zpracování a použití primárního vzorku k provedení paternitní expertízy

Tato prohlášení a souhlasy vždy podepisují matka, domnělý otec, v případě zletilosti dítěte také dítě a v případě nezletilosti matky nebo otce jejich zákonný zástupce.

10.2.11.1. Specifika odběru

Odebraný vzorek je nutné uložit v lednici (2 až 8°C).

SQ-014 Laboratorní příručka

10.2.12. Odběr vzorku endometria

10.2.12.1. Odběr materiálu

Odběr vzorku endometria se provádí při požadavku na fenotypizaci uterinních NK buněk nebo pro vyšetření ERT. Odběr vzorků se provádí bez anestezie, je sám o sobě nebolestivý a dá se přirovnat k provedení embryotransferu. Po zavedení gynekologických zrcadel do pochvy je zaveden do čípku katetr, kterým je proveden odběr vzorku sliznice dělohy velikosti několika milimetrů. Celý zákrok trvá 5 - 10 minut.

Odběr biopsie je zákrokem malého rozsahu, a je proveden po desinfekci pochvy, komplikací může být i přesto zánět dělohy, vyžadující léčbu antibiotiky. Riziko je však velmi malé (pro srovnání např. před samotným embryotransferem, kde se desinfekce neprovádí vůbec je riziko infekce menší než 1 promile).

10.2.12.2. Specifika odběru pro fenotypizaci uterinních NK buněk

Vzorek se vloží do nádobky s médiem X-VIVO, kterou dodává laboratoř a skladuje se při pokojové teplotě (18-25°C). Je třeba jej neprodleně dopravit do laboratoře.

10.2.12.3. Specifika odběru pro vyšetření ERT

Vzorek odebrané tkáně endometria by měla být čistá bez krevních sraženin alespoň o velikosti 8mm³ (šířka 2 mm x hloubka 2 mm x výška 2 mm), vzorek je třeba umístit do zkumavky s RNA sample storage bufferem a zkumavku 10krát převrátit nahoru a dolů. Vzorek v RNA storage bufferu lze skladovat do transportu po dobu 4 dní při 2-8°C a transportovat při 2-8°C (nemrazit).

11. Transport a manipulace s biologickým materiálem (se vzorky)

Informace k dopravě:

- Za zajištění transportu a zajištění bezpečnosti přepravce (vhodný způsob balení a označení) vždy odpovídá žadatel (lékař požadující laboratorní vyšetření).
- Doprava materiálu má být šetrná, rychlá a musí být dodržovány specifické podmínky - **zejména dodrženy podmínky transportu dle SQ-014 P6 Podmínky transportu a stabilita vzorků**
- S materiálem se nesmí během přepravy prudce manipulovat, aby nedošlo k mechanickému poškození – vhodná přeprava v transportních boxech (určených pouze pro přepravu vzorků)
- Žádanky/průvodkyna vyšetření musí být umístěny v samostatném obalu, např. v igelitovém dvoukomorovém plastovém sáčku tak, aby nemohlo při náhodném vylití biologického materiálu dojít k jejich potřísnění
- Při transportu je důležité biologický materiál vozit za dodržení podmínek transportu, zejména dodržovat teplotu transportu a chránit materiál před světlem. Je nutné během transportu monitorovat teplotu v transportním boxu kalibrovaným teploměrem.
- Při transportu zamrazených embryí nebo spermií v LN2 je nutné zabránit možnosti nepatřičného úniku LN2 a vyvarovat se přímého kontaktu s ním. Nesmí dojít k rozmrznutí převáženého materiálu, stejně tak u CO2.
- Je nutné zabránit zmrznutí nebo přehřátí vzorku, aby se uchovala schopnost kultivace buněk a růstu in vitro

Podmínky transportu jsou uvedeny v příloze SQ-014 P6 Podmínky transportu a stabilita vzorků této Laboratorní příručky.

SQ-014 Laboratorní příručka

Upozornění:

Pokud dojde během transportu k vylití materiálu nebo k jeho znehodnocení (např. zmrznutí), pak tuto skutečnost, laboratoř žadateli telefonicky oznámí a požádá o nový odběr.

12. Fáze po vyšetření

12.1. Bezpečné odstraňování materiálů použitých při odběru

Materiál použitý při odběru primárních vzorků je považován za potencionálně infekční (vatové tampony nebo buničité čtverce, rukavice, zbylý ejakulát, folikulární tekutina bez oocytů), ukládá se do nepropustného obalu a je likvidován dle dokumentované platné legislativy. V rámci pracoviště je postup specifikován v interní dokumentaci. Použité jehly se odhazují do plastových uzavíratelných kontejnerů k tomu určených a jsou rovněž likvidovány výše zmíněným způsobem.

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

12.2. Manipulace a skladování materiálu

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

V průběhu zpracování je materiál uchováván dle podmínek uvedených v jednotlivých **SOP** pro vyšetření a tak, aby nedošlo k jeho znehodnocení. S materiálem se manipuluje s ohledem na bezpečnost práce a ochrany zdraví pracovníka.

Imunologická laboratoř	
<ul style="list-style-type: none">• čerstvý ejakulát• zamražený ejakulát• periferní krev (srážlivá)	<ul style="list-style-type: none">• zpracování v den odběru, likvidace do 24h od odběru po provedení analýzy• zamražený ejakulát (fragmentace DNA) je skladován při -18 až -25 °C, likvidace po zpracování• primární vzorek maximálně 3 dny v lednici při 2 až 8 °C• sekundární vzorek (separované sérum) – do zpracování vyšetření buď v lednici při 2 až 8 °C nebo v mrazáku při -18 až -25 °C (podle informací uvedených v SOP)• archivní vzorek po dobu minimálně 1 měsíce při -18 až -25°C
<ul style="list-style-type: none">• periferní krev pro FC (nesrážlivá – EDTA, Heparin)	<ul style="list-style-type: none">• skladování maximálně 3 dny při laboratorní teplotě
<ul style="list-style-type: none">• Stolicе	<ul style="list-style-type: none">• zpracování do 2 dnů od odběru, uchování v lednici při 2 až 8 °C, likvidace po provedení analýzy
<ul style="list-style-type: none">• Biopsie endometriální tkáně	<ul style="list-style-type: none">• zpracování v den odběru, likvidace po zpracování
Nezpracované části vzorků jsou likvidovány jako nebezpečný odpad dle SQ-003 Provozní řád	

SQ-014 Laboratorní příručka

Cytogenetická laboratoř	
Trvalé preparáty patologické normální	<ul style="list-style-type: none"> s dobou uchovávání 5 let
FISH preparáty	<ul style="list-style-type: none"> pouze s patologickým výsledkem, v mrazáku (-18 až -22 °C) maximálně po dobu použitelnosti udanou výrobcem sondy

Molekulárně genetická laboratoř	
<ul style="list-style-type: none"> periferní krev pupečnicková krev plodová voda choriové klky solidní tkáň tkáň endometria k vyšetření ERT parafinové bločky výtěr z dutiny ústní MDA produkty po celogenomové amplifikaci blastomer/trofektodermu FTA izolovaná DNA Fluorescenčně značený PCR amplifikát 	<ul style="list-style-type: none"> se uchovávají v lednici do doby vydání výsledků, aliqot 1 ml uchováván v mrazáku, při -20 °C (-18 až -22 °C) nebo při -60 °C (-50 až -70° C) po dobu minimálně 5 let se uchovávají v lednici do doby vydání výsledků, aliqot 1 ml uchováván v mrazáku, při -20 °C (-18 až -22 °C) nebo při -60 °C (-50 až -70° C) dobu minimálně 5 let se uchovávají v lednici do doby vydání výsledků (2 až 8 °C) se uchovávají v lednici do doby vydání výsledků (2 až 8 °C) se uchovávají v lednici do doby vydání výsledků (2 až 8 °C) uchovává se v mrazáku, při -20 °C až -80 °C se uchovávají v lednici do doby zahájení izolace DNA (2 až 8 °C) se uchovávají v lednici do doby vydání výsledků (2 až 8 °C) okamžité zpracování, zbytky MDA produktů se uchovávají v mrazáku (-18 až -22 °C) uchovávána v lednici do doby vydání výsledků (2 až 8 °C) uchovávána v lednici do doby vydání výsledků (2 až 8 °C) dále uchovávána v mrazáku (min. -15 °C) po dobu minimálně 5 let <p>Vzorky jsou likvidovány jako nebezpečný odpad dle SQ-003 Provozního řád</p> <ul style="list-style-type: none"> je uchováván na tmavém místě v lednici do vydání výsledků

Laboratoř pro preimplantační genetické testování	
Primární vzorky <ul style="list-style-type: none"> buňky trofektodermu izolovaná DNA/amplifikovaná DNA 	<ul style="list-style-type: none"> likvidace po zpracování doba bez omezení, minimálně však 5 let v mrazáku (min. -15 °C) <p>Vzorky jsou likvidovány jako nebezpečný odpad dle SQ-003 Provozního řád</p>

Laboratoř IVF
neskladuje vzorky po zpracování k dalšímu dovyšetření.

SQ-014 Laboratorní příručka

12.3. Dodatečná vyšetření a časový interval pro jejich požadování

Dodatečná vyšetření jsou limitována vlastností, množstvím a uchováním zpracovávaného biologického materiálu. Kvalita případného dalšího nebo opakovaného vyšetření může být ovlivněna dobou a metodou skladování.

Dodatečná vyšetření nelze provést u ejakulátu, resp. spermií. Dodatečná vyšetření u embryí lze provést pouze v případě jejich rebiopsie nebo s využitím materiálu po celogenomové amplifikaci, vždy s předchozím informovaným souhlasem daného páru.

Dodatečně požadovaná molekulárně genetická vyšetření lze provést z izolované DNA archivované v laboratoři (pokud byl dán předchozí souhlas pacienta s jejím uchováním), uložené v mrazáku (-18 až -22 °C). Dodatečně požadovaná cytogenetická vyšetření lze provést v rámci omezení uvedených v bodě 12.2. Manipulace a skladování materiálu

Dodatečně požadovaná imunologická vyšetření lze provést pouze z archivovaného séra, viz podmínky v bodě 12.2. Manipulace a skladování materiálu

Laboratoř může přijmout ústní (telefonický) požadavek na vyšetření v případě, že byl do laboratoře doručen materiál a žádanka daného pacienta, laboratoř má archivován dostatek materiálu a umožňuje-li to povaha požadovaného vyšetření (stabilita). Požadavek je přijímán od lékaře, nikoli od pacientů. Žadatel ale musí vždy dodat novou samostatnou žádanku s indikací dodatečného vyšetření.

V případě, že pro konečné vydání výsledků je nutné dovyšetření nebo případný nový odběr biologického materiálu, komunikuje s žadatelem o vyšetření vedoucí úseku.

12.4. Opakování vyšetření stejného primárního vzorku

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

13. Vydávání výsledků a komunikace s laboratoří

13.1. Informace o formách vydávání výsledků

Výsledky jsou vydávány na výsledkových listech a zahrnují informace poskytované lékařem žádajícím o vyšetření, informace nezbytně potřebné k hodnocení a interpretaci výsledků pro ošetřujícího lékaře.

Výsledky vyšetření jsou uváděny přesně, jednoznačně a objektivně.

Laboratoře používají v současné době primárně vydávání výsledků v tištěné formě výsledkových listů prostřednictvím aktuálního LIS. V tištěné podobě je výsledek vložen do obálky, na kterou odpovědný pracovník doplní jméno lékaře a přesnou adresu pracoviště. V takto zalepené a popsané obálce je výsledek vyšetření poté odeslán k externímu žadateli o vyšetření a to buď přímo řidičem, který vyzvedává vzorky na externích pracovištích nebo prostřednictvím České pošty, a to vždy doporučeně s dodejkou do vlastních rukou lékaře.

SQ-014 Laboratorní příručka

Současně je některým žadatelům (dle domluvy) zasílán elektronický výsledek vyšetření formou přenosu strukturovaných dat nebo zasláním výsledkového listu na emailovou adresu pomocí zaheslované přílohy, přičemž každý externí žadatel má přiřazen unikátní kód.

Výsledky musí být čitelné a bez přepisů. Před vydáním jsou všechny výsledky kontrolované pracovníky a podepsány oprávněným pracovníkem, vedoucím laboratoře nebo lékařem s odpovídající odborností.

Interpretaci výsledků provádí vždy lékař s odpovídající odborností. Při interpretaci výsledků je důležité brát v úvahu doporučení odborných společností a platnou legislativu (například dobu pro ukončení těhotenství). Je-li to nutné, je pacient pozván ke konzultaci do ambulance, kde mu lékař vždy osobně výsledky sdělí, vysvětlí a doporučí případná další dovyšetření či další řešení.

Odpovědnost za distribuci výsledků:

- z genetických vyšetření k externímu i internímu žadateli o vyšetření je odpovědný Centrální příjem vzorků
- z imunologických vyšetření k externímu žadateli o vyšetření jsou odpovědní pracovníci IML
- z imunologických vyšetření k interním žadatelům jsou odpovědné zdravotní sestry společnosti
- z IVF laboratoře k interním žadatelům jsou odpovědné zdravotní sestry společnosti

Komunikace telefonem je užívána jen v případě nebezpečí z prodlení, řešení nějakého vzniklého problému, k zajištění potřebných chybějících informací apod.

Zaměstnanec, který hlásí výsledky telefonem, je povinen se přesvědčit, že výsledky sděluje oprávněnému lékaři- žadateli o laboratorní vyšetření - dle pravidel pracoviště a směrnice **SQ-024 Směrnice o ochraně osobních údajů společnosti GENNET, s.r.o**

13.2. Změny výsledků a nálezů

Všechny procesy jsou v laboratořích nastaveny tak, aby ke změně výsledků nemohlo dojít. Pokud by k němu přesto došlo, je zaznamenán datum a jméno osoby, která změnu dodatečně provedla.

V případě, že laboratoř zjistí chybně vydaný výsledek vyšetření nebo potřebuje ještě do zprávy něco doplnit (např. komentář k výsledku), komunikuje s žadatelem vždy vedoucí příslušné laboratoře a žadateli o vyšetření (indikujícímu lékaři) je vždy dodán nový výsledkový list.

Pokud je výsledek změněn, je žadatel (indikující lékař) informován o změně výsledků a nový výsledkový list je mu zaslán s novým datem, hodinou tisku a s informací o změně výsledku.

Nový výsledkový list musí obsahovat informace o:

- tom, že se jedná o přepracování/opravnou zprávu
- stažení již uvolněných zpráv (likvidace přímo žadatelem, nebo zaslání Laboratořím GENNET zpět k likvidaci)
- novém výsledku

Revidovaný výsledek je v elektronické i tištěné formě jednoznačně označen

SQ-014 Laboratorní příručka

13.3. Intervaly od dodání materiálu k vydání výsledků

Vzorky jsou průběžně zpracovávány podle požadovaného vyšetření v pořadí, ve kterém jsou přijímány do laboratoře. Doba požadovaného vyšetření od příjmu vzorku do vydání závěrečné zprávy pro nabízené diagnózy se liší dle povahy požadovaného vyšetření:

- **Chromozomální vyšetření plodové vody, choriových klků, fetální krve:** 2 týdny (nemělo by přesáhnout 4 týdny)
- **Chromozomální vyšetření periferní krve:** 6 – 8 týdnů (nemělo by obvykle přesáhnout 12 týdnů, případné výjimky budou vždy individuálně řešeny s žadatelem o vyšetření), STATIM do 4 týdnů
- **Vyšetření metodou FISH:** 2 - 4 týdny
- **Prenatální vyšetření metodami array CGH nebo SNP array:** 1 - 2 týdny (nemělo by obvykle přesáhnout 4 týdny)
- **Postnatální vyšetření metodami array CGH nebo SNP array:** 3 - 4 týdny (nemělo by obvykle přesáhnout 8 týdnů)
- **Preimplantační genetické testování metodou NGS (trofektoderm):** 2 - 4 týdny, STATIM 2 týdny
- **Preimplantační genetické testování metodou karyomapping (trofektoderm):** 4 týdny, STATIM 2 týdny
- **Vyšetření potracené tkáně:** 2 – 8 týdnů
- **Molekulárně-genetické vyšetření (obecně):** 2 - 3 týdny (individuálně dle vyšetření – QF-PCR max. 48 hodin (v pracovních dnech), vyšetření panelem CZEKANCA (3 měsíce, STATIM 1 měsíc), vyšetření panelem CarrierTest (4 - 6 týdnů, STATIM 1 měsíc), Klinický Exom GERDA (6 – 8 měsíců).
- **Spermiogram:** do 24 hodin
- **ART:** do 1 týdne
- **Vypracování znaleckého posudku:** do 3 týdnů - vyšetření není hrazeno žádnou pojišťovnou, proto si žadatel plně hradí veškeré náklady i vyšetření sám. Částka je dána dle aktuálního ceníku.
- **Imunologické vyšetření:** obvykle jeden týden, přesné údaje doby odezvy u jednotlivých vyšetření jsou uvedeny v *SQ-014 P1 Seznam vyšetření IML*

13.4. Konzultační činnost laboratoře

Lékařům a žadatelům vyšetření jsou poskytovány konzultace v odborné oblasti související s laboratorními vyšetřeními a jejich výsledky. Kontakty jsou uvedeny v kapitole 1.1. této *Laboratorní příručky*.

13.5. Způsob řešení stížností a reklamací

Stížnost žadatele o vyšetření pacienta a ostatních účastníků je podnětem pro zlepšení práce na našem pracovišti a zabýváme se prošetřením každé uplatněné stížnosti.

SQ-014 Laboratorní příručka

Zákazníci nebo jiné zainteresované strany mohou podávat stížnosti na činnosti Laboratoří GENNET týkající se:

- výsledků laboratorních vyšetření
- způsob jednání zaměstnanců
- nedodržení ujednání vyplívajících z uzavřené dohody o provedení vyšetření, zejména pak nedodržení dohodnuté lhůty

Způsob podání stížnosti:

- písemně (poštou, faxem, e-mailem)
- ústně (telefonicky, při osobním jednání)

Stížnost může obdržet jakýkoli pracovník společnosti nebo Laboratoří GENNET, který je v tomto případě povinen stížnost předat svému přímému nadřízenému (zpravidla odpovědnému vedoucímu)

Termíny pro vyřízení stížností:

- pokud stížnost není řešena ihned, je **termín na vyřízení stížnosti 30 dnů**
- v tomto termínu oznámí řešitel stížnosti žadateli výsledek šetření
- případě, že nelze v tomto termínu stížnost dořešit informuje stěžovatele o dosavadním postupu

Obecný postup vyřízení stížnosti

- odpovědný vedoucí přešetří oprávněnost stížnosti a činností, které ke stížnosti vedly
- určí oprávněné osoby k řešení stížnosti, nebo bude řešit stížnost sám
- po vyřízení jsou všechny stížnosti zasílány na oddělení kvality na email qm@gennet.cz, které stížnost zaeviduje do ***Knihy stížností***.

14. Přílohy

SQ-014 P1 Seznam vyšetření IML

SQ-014 P2 Seznam vyšetření MGL

SQ-014 P3 Seznam vyšetření IVF

SQ-014 P4 Seznam vyšetření CL

SQ-014 P5 Seznam vyšetření PGTL

SQ-014 P6 Podmínky transportu a stabilita vzorků