

SQ-014 Laboratorní příručka

OBSAH

| | | |
|---------|---|----|
| 1. | Úvod..... | 3 |
| 1.1. | Laboratoře GENNET | 3 |
| 2. | Zaměření laboratoře a spektrum nabízených služeb..... | 7 |
| 3. | Základní informace pro uživatele laboratorních služeb..... | 8 |
| 3.1. | Cytogenetické metody..... | 8 |
| 3.1.1. | Chromozomální vyšetření | 8 |
| 3.2. | Molekulárně-cytogenetické metody | 9 |
| 3.2.1. | FISH vyšetření | 9 |
| 3.2.2. | Array CGH a SNP array..... | 10 |
| 3.2.3. | Preimplantační genetická vyšetření – PGT („Preimplantation Genetic Testing“) metodou array CGH..... | 10 |
| 3.2.4. | Preimplantační genetická vyšetření – PGT („Preimplantation Genetic Testing“) metodou array NGS | 10 |
| 3.2.5. | Preimplantační genetická vyšetření – PGT („Preimplantation Genetic Testing“) metodou Karyomapping | 10 |
| 3.3. | Molekulárně genetické metody | 11 |
| 3.3.1. | QF-PCR vyšetření..... | 12 |
| 3.3.2. | Vyšetření mutací v genu pro cystickou fibrózu (<i>CFTR</i>): | 12 |
| 3.3.3. | Vyšetření mikrodelecií AZF oblasti na Y chromozomu:..... | 12 |
| 3.3.4. | Vyšetření trombofilních mutací: | 13 |
| 3.3.5. | Vyšetření trombofilních markerů: Gen <i>PAI-1</i> (<i>4G/5G</i>)..... | 13 |
| 3.3.6. | Vyšetření mutace 35delG v genu pro connexin 26:..... | 14 |
| 3.3.7. | DNA určování otcovství pomocí STR markerů: | 14 |
| 3.3.8. | Preimplantační genetické vyšetření monogenních chorob - PGT-M:..... | 14 |
| 3.3.9. | Vyšetření nejčastějších mutací v genu <i>HFE</i> :..... | 15 |
| 3.3.10. | Vyšetření dědičné dispozice k nádorovým chorobám metodou NGS onkopanelem CZECANCA | 15 |
| 3.3.11. | Vyšetření fragilního X chromozomu:..... | 16 |
| 3.3.12. | Vyšetření polymorfismu N680S genu <i>FSHR</i> metodou Real-Time PCR | 16 |
| 3.3.13. | Vyšetření HLA znaků asociovaných s celiakií..... | 16 |
| 3.3.14. | Vyšetření rizikové alely HLA-B27 | 17 |
| 3.3.15. | Neinvasivní prenatální test aneuploidií chromozomů 13, 18 a 21 z mateřské plazmy | 17 |
| 3.3.16. | CarrierTest | 17 |
| 3.4. | Centrum asistované reprodukce | 18 |
| 3.5. | Imunologická laboratoř | 20 |
| 4. | Obecné informace o provedení objednávky vyšetření..... | 20 |
| 4.1. | Základní identifikační znaky požadované a povinně uváděné na žádance | 20 |
| 4.2. | Identifikační označení primárního vzorku..... | 21 |
| 5. | Žádanka na laboratorní vyšetření | 21 |
| 5.1. | Příjem interních požadavků..... | 21 |
| 5.2. | Příjem externích požadavků | 22 |
| 6. | Požadavky na urgentní vyšetření..... | 22 |

SQ-014 Laboratorní příručka

| | | |
|----------|---|----|
| 7. | Ústní požadavky na vyšetření..... | 22 |
| 8. | Důvody pro odmítnutí vzorků pro zpracování | 22 |
| 8.1. | Odmítnoutní požadavku | 22 |
| 8.2. | Postupy při nesprávné nebo neúplné identifikaci vzorku nebo žádanky | 23 |
| 9. | Prohlášení o souhlasu..... | 23 |
| 10. | Informace pro odběr biologického materiálu včetně minimálního množství | 23 |
| 10.1. | Odběrové nádoby | 23 |
| 10.2. | Doporučený postup při odběru..... | 25 |
| 10.2.1. | Invazivní prenatalní vyšetření | 25 |
| 10.2.2. | Odběr periferní krve..... | 26 |
| 10.2.3. | Odběr potracené tkáně - produktů koncepce (tkání plodu a placenty) k vyšetření QF-PCR a array | 27 |
| 10.2.4. | Odběr ejakulátu..... | 27 |
| 10.2.5. | Odběr folikulární tekutiny..... | 28 |
| 10.2.6. | Odběr materiálu z MESA, TESE | 28 |
| 10.2.7. | Odběr blastomery/buněk trofektodermu na PGT | 28 |
| 10.2.8. | Odběr zamraženého materiálu..... | 28 |
| 10.2.9. | Odběr slizničního stěru z dutiny ústní (bukální stěr)..... | 28 |
| 10.2.10. | Protokolární odběr k DNA paternitní expertize s posudkem soudního znalce | 29 |
| 11. | Transport a manipulace s biologickým materiálem (se vzorky) | 29 |
| 12. | Fáze po vyšetření | 30 |
| 12.1. | Bezpečné odstraňování materiálů použitých při odběru..... | 30 |
| 12.2. | Manipulace a skladování materiálu..... | 30 |
| 12.3. | Dodatečná vyšetření a časový interval pro jejich požadování | 32 |
| 12.4. | Opakování vyšetření stejného primárního vzorku..... | 32 |
| 13. | Vydávání výsledků a komunikace s laboratoří..... | 33 |
| 13.1. | Informace o formách vydávání výsledků | 33 |
| 13.2. | Změny výsledků a nálezů..... | 33 |
| 13.3. | Intervaly od dodání materiálu k vydání výsledků..... | 34 |
| 13.4. | Konzultační činnost laboratoře..... | 34 |
| 13.5. | Způsob řešení stížností | 35 |
| 14. | Přílohy..... | 35 |

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 asistovaná reprodukce, fetální medicína, urologie nebo imunologie. Klienti klinik GENNET se mohou svěřit do péče odborníkům na celkem 4 pobočkách: dvě se nacházejí v Praze (GENNET Letná a GENNET Archa), jedna v Liberci (GENNET Liberec) a další v Londýně (GENNET City Fertility).

Dnes jsou kliniky GENNET místem, kde je poskytována komplexní péče v oblasti reprodukční medicíny tzv., pod jednou střešou“, a tak můžeme našim pacientům zajistit veškerou nutnou péči a usnadnit cestu k jejich vytyčenému cíli mít zdravé dítě. Disponujeme moderním vybavením, nejnovějšími technologiemi a usilujeme o profesionální a individuální přístup ke každému pacientovi, proto se na nás každoročně s důvěrou obrací tisíce klientů s celého světa. Naše kliniky jsou certifikovány dle evropské normy ČSN EN ISO 9001:2016 a zdravotnické laboratoře akreditovány dle ČSN EN ISO 15189:2013. Splněním těchto kritérií kliniky GENNET oficiálně potvrdily svou odbornost, objektivitu a nezávislost pro vykonávání svých činností. Kliniky GENNET se také každoročně účastní mezinárodních kontrol kvality a podporují mezinárodní výzkumné projekty. Od roku 2015 jsou kliniky GENNET navíc členem skupiny FutureLife, která sdružuje zdravotnická zařízení zabývající se reprodukčním zdravím, nejen v České Republice, ale i v dalších zemích Evropy.

1.1. Laboratoře GENNET

Od roku 2004 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 subjekt nabízí své služby na 3 pracovištích společnosti GENNET, s.r.o.

SQ-014 Laboratorní příručka

Pracoviště zdravotnické laboratoře

- | | |
|-------------------------------------|--------------------------------|
| • Cytogenetická laboratoř – Letná | Kostelní 9/292, 170 00 Praha 7 |
| • Molekulárně genetická laboratoř | Kostelní 9/292, 170 00 Praha 7 |
| • Laboratoř IVF - Letná | Kostelní 9/292, 170 00 Praha 7 |
| • Cytogenetická laboratoř - Liberec | Liliová 1, 460 01 Liberec |
| • Laboratoř IVF - Liberec | Liliová 1, 460 01 Liberec |
| • Laboratoř IVF - Archa | Na Poříčí 26, 110 00 Praha 1 |
| • Imunologická laboratoř | Na Poříčí 26, 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 spectrum nabízených služeb.

Kontaktní údaje:

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

Statutární orgán společnosti

Statutárním orgánem společnosti jsou jednatelé: JUDr. Matěj Stejskal, Mgr. Miroslav Janov

Akreditovaný subjekt: Laboratoře GENNET

Vedoucí Laboratoří GENNET:

| | |
|---------|--|
| Jméno: | MUDr. Monika Koudová |
| tel.: | 242 456 819 |
| e-mail: | monika.koudova@gennet.cz |

Manažer kvality Laboratoří GENNET:

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

Metrolog:

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

SQ-014 Laboratorní příručka

Vedoucí laboratoří lékařské genetiky:

jméno: Mgr. Martina Bittóová
tel.: 242 456 731
e-mail: martina.bittoova@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

Vedoucí centrálního příjmu - Letná:

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

Pracoviště akreditovaného subjektu:

Pobočka GENNET, s.r.o. – Letná

Kostelní 9/292, 17000 Praha 7

Cytogenetická laboratoř (CL)

Vedoucí CL: RNDr. Jiří Horáček
tel.: 242 456 727
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.

Molekulárně genetická laboratoř (MGL)

Vedoucí MGL: Mgr. Martina Bittóová
tel.: 242 456 730
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.

SQ-014 Laboratorní příručka

Centrální příjem vzorků (CPV)

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

Provozní doba:

Po-Pá: 7:30-19:00

Laboratoř IVF

Vedoucí laboratoře IVF: Ing. Josef Míka CSc.
tel.: 242 456 756
e-mail: josef.mika@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 26, 110 00 Praha 1

Imunologická laboratoř (IML)

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

Provozní doba:

Po – Pá: 7:00 – 16:00

Laboratoř IVF

Vedoucí laboratoře IVF: Ing. Leona Urbánková
tel.: 242 456 854
e-mail: leona.urbankova@gennet.cz

Provozní doba:

Po – Pá: 7:30 – 15:00

So: 7:30 – 10:00 – příjem vzorků

Pobočka GENNET, s.r.o. – Liberec

Liliová 1, 460 01 Liberec

Cytogenetická laboratoř (CL)

Vedoucí laboratoře CL: Ing. Jitka Zatloukalová
tel.: 483 101 324/335
e-mail: jitka.zatloukalova@gennet.cz

Provozní doba:

Po – Pá: 6:00 – 17:00

SQ-014 Laboratorní příručka

Laboratoř IVF

Vedoucí laboratoře IVF: Ing. Dagmar Milická
tel.: 483 101 327
e-mail: dagmar.milicka@gennet.cz

Provozní doba:

Po – Pá: 7:30 – 16:00

So: 7:30 – 10:00 – příjem vzorků

Laboratoř, 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 cytogenetická a molekulárně-genetická vyšetření včetně preimplantační diagnostiky monogenních chorob PGT-M na embryích, laboratorní andrologie pro IVF a vyšetření v odbornosti alergologie a klinické imunologie.

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

| | |
|---|---|
| • periferní krev | • FTA |
| • pupečnicková (fetální) krev | • ejakulát |
| • plodová voda | • folikulární tekutina |
| • choriové klky | • materiál po MESA, TESE |
| • blastomera/trofoektoderm | • čerstvé reprodukční buňky (spermie, oocyty) |
| • parafinové bločky | • zamražené reprodukční buňky (embrya, spermie) |
| • bukální stěr (výtěr z dutiny ústní) | • stolice |
| • produkt koncepce (tkáň plodu/a nebo placenty) | • kostní dřeň |
| • nativní cytogenetické preparáty | |

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

U genetických vyšetření, která nejsou na našem pracovišti prováděna, je možno v naší MGL provést pouze **izolaci DNA** a zprostředkovat vyšetření na jiném, pro dané vyšetření specializovaném pracovišti molekulární genetiky (např. vyšetření genu pro SLOS v laboratoři FN Brno, vyšetření genu pro Marfanův syndrom v laboratoři Agel, Nový Jičín apod.) Kompletní seznam nabízených vyšetření je vyjmenován na průvodce molekulárně-genetického vyšetření daného genetického pracoviště. Seznam

SQ-014 Laboratorní příručka

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.

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 nálezní při ultrazvukovém vyšetření plodu
- pozitivní screening I. trimestru
- další méně časté indikace

SQ-014 Laboratorní příručka

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

Z produktů koncepce (tkáň plodu /a nebo placenty)

Důvodem odběru je určení karyotypu potraceného 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.

Indikace k vyšetření:

- stanovení karyotypu potraceného plodu

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 rozbohem. 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 chromozomů neznámého původu

SQ-014 Laboratorní příručka

Lokus-specifické sondy

- **lokalizace:** hybridizují s jedinečnými sekvencemi DNA
- **účel:** slouží k diagnostice numerických chromozomálních aberací, k vyšetření mikrodelecí 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.

3.2.2. Array CGH a SNP array

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

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

Molekulárně cytogenetické vyšetření metodou array CGH slouží k celogenomové detekci numerických chromozomálních změn (aneuploidií) event. delecí a/nebo duplikací u vyšetřovaných embryí (buňky trofektodermu nebo blastomery). Principem metody je hybridizace vyšetřované DNA na specifických chipech. Podrobnosti metody jsou uvedeny v *SOP-CL-012*.

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

Molekulárně cytogenetické vyšetření metodou NGS slouží k celogenomové detekci numerických chromozomálních změn (aneuploidií) event. delecí a/nebo duplikací u vyšetřovaných embryí (buňky trofektodermu nebo blastomery). Principem metody je sekvenace úseků vyšetřované DNA. Podrobnosti metody jsou uvedeny v *SOP-CL-013*.

3.2.5. 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-CL-014*.

SQ-014 Laboratorní příručka

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 prenatalní 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.

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. PGS 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-001*.

SQ-014 Laboratorní příručka

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, 7, 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 nálezn
- kombinace více rizikových faktorů
- produkt koncepce (spontánní potrat)

Podrobnosti metody jsou uvedeny v *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)

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*.

SQ-014 Laboratorní příručka

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://www.slg.cz/2011/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.

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*.

SQ-014 Laboratorní příručka

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[®] Identifiler[®] 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.

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 molekulární genetiky. Vyšetření je vždy navázáno na provedení oplození *In vitro* v našem, popřípadě spolupracujícím IVF centru.

SQ-014 Laboratorní příručka

Pro preimplantační vyšetření monogeních chorob má laboratoř udělenou flexibilitu, jedná se o akreditovaný režim validace postupu vyšetření nového genu v rámci stanovení diagnózy monogenních onemocnění. K této důvěře se pojí závazek zveřejňování nových verzí vyšetřovacích postupů, bedlivé 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-008*.

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-018*.

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

Cílem vyšetření je identifikace pacientů/rodin s vrozenou dispozí 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 sekvenačního 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

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.

SQ-014 Laboratorní příručka

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). 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*.

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: DQA1*0501-DQB1*0201 v pozici cis (haplotyp DQ2.5cis), DQA1*0505-DQB1*0301/DQA1*0201-DQB1*0202 v pozici trans (haplotyp DQ2.5trans) a DQA1*0301-DQB1*0302 v pozici cis (haplotyp DQ8.1).

SQ-014 Laboratorní příručka

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:
 - přírodní 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-012*.

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

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.

SQ-014 Laboratorní příručka

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 kategorický (mutace přítomna/nepřítomna).

Indikace k vyšetření:

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

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. Podrobnosti metody jsou uvedeny v **SOP-MGL-013**.

3.4. Centrum asistované reprodukce

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

- **Vyšetření spermií (spermiogram)** – mikroskopické vyšetření ejakulátu (spermatu), na jehož základě se orientačně posuzuje plodnost muže.
- **Kapacitace spermií (separace)** – ejakulát se upraví na optimální množství spermií a oddělí se živé spermie od mrtvých. Upravený vzorek lze použít k inseminaci AIH.

SQ-014 Laboratorní příručka

Vyšetření se provádí:

Z ejakulátu

Důvodem je mikroskopické vyšetření ejakulátu (spermatu), na jehož základě 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.

Indikace k vyšetření

- neplodnost páru
- uchování spermií před onkologickou léčbou
- žádost pacienta
- darování spermií

Z materiálu po MESA, TESE

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 a 24 hodin po kultivaci.

Indikace k vyšetření:

- azoospermie

Z folikulární tekutiny

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 pólovým 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 5 dnů. Na žádost pacienta lze provést asistovaný hatching (AZH). V odůvodněných případech se provádí biopsie blastomery/trofoblastu za účelem preimplantačního genetického vyšetření - PGT („Preimplantation Genetic Testing“). Podrobnosti o metodách asistované reprodukce jsou uvedeny v příslušných **SOP-IVF**.

Indikace k vyšetření:

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

Zamražený materiál (spermie, embrya)

Hodnotí se kvalita rozmrazeného materiálu a jeho vhodnost (nevhodnost) pro další použití ART.

SQ-014 Laboratorní příručka

Indikace k vyšetření:

- Použití k fertilizaci oocytů (spermie)
- Použití k ET

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 a jiné).

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>. Součástí žádanek na genetické vyšetření a na metody, kde je potřeba souhlas pacienta, je informovaný souhlas. 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 žadance

- jméno a příjmení pacienta
- číslo pojištěnce (rodné číslo, číslo pojištěnce, u cizince vygenerované náhradní číslo z LIS dle data narození)
- datum narození pacienta *
- pohlaví pacienta*
- kód pojišťovny pacienta nebo údaj, že se jedná samoplátce /genetické vyšetření pak není hrazeno ze ZP, ale je provedeno za přímou úhradu/
- základní diagnóza a další diagnózy pacienta
- datum a čas odběru vzorku - je nezbytné uvádět vzhledem k nutnosti sledovat dodržení podmínek preanalytické fáze!!
- typ primárního vzorku
- identifikace objednavatele- indikujícího lékaře a zdravotnického zařízení (razítko, které musí obsahovat tyto údaje- jméno, odbornost, IČP)
- podpis objednavatele - lékaře
- požadovaná vyšetření (vázaná k dodanému vzorku nebo k dodaným vzorkům)

**) Nutné vyplnit především v případě, že tyto údaje nejsou zřejmé z rodného čísla (např. cizinci) a/nebo jsou podstatná pro požadované vyšetření*

Nepovinné nebo fakultativní údaje:

Na volné místo na žadance lze uvést doplňující 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,

SQ-014 Laboratorní příručka

vleže - vsedě, s blíže specifikovanou zátěží atd.). V případě potřeby je nutné tyto informace sdělit separátně.

- Bydliště pacienta
- Telefon
- Kontakt na objednavatele - lékaře (adresa, telefon nebo jiné spojení, např. email)

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 oddělení zaznamenány požadavky na daná vyšetření do systému „SmartMedix“, kde je vytvořena interní žádanka, která je společně se vzorkem předána do příslušné laboratoře provádějící vyšetření.

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 Synlab.

Vzorky jsou opatřeny interními žádankami, které generuje systém „SmartMedix“. Vzorky jsou do 60 minut po odběru předány zdravotním pracovníkem do laboratoře 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.

Mezi pobočkami společnosti GENNET, s.r.o. jsou vzorky transportovány 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.

SQ-014 Laboratorní příručka

5.2. Příjem externích požadavků

Externí žádanka na vyšetření je pracovníkem centrálního příjmu přiložena k interní žádance vytvořené v systému „SmartMedix“ a společně se vzorkem jsou obě žádanky předány do příslušné laboratoře. V případě laboratoře imunologie, jsou doručovány žádanky od externích lékařů přímo a jsou zapisovány do jejich LIS Envis.

Vzorky jsou transportovány externími svozovými službami. Požadavky na podmínky transportu jsou definovány v této *Laboratorní příručce*. Sledování dodržování podmínek preanalytické fáze provádí pracovník příjmu.

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

6. Požadavky na urgentní vyšetření

Požadavky na vyšetření STATIM (akutní, „přednostní“ vyšetření) se do laboratoře dodávají na stejných žádankách generovaných z elektronického IS SmartMEDIX jako pro ostatní běžná vyšetření a jsou navíc označeny vyznačeným slovem STATIM. Žádanka musí obsahovat stejné povinné údaje jako u běžného vyšetření.

Vzorek bude přednostně zpracován a odečten.

Poznámka: Všechna cytogenetická 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.

8. Důvody pro odmítnutí vzorků pro zpracování

8.1. Odmítnoutní požadavku

- žádanku s biologickým materiálem, na které chybí nebo jsou nečitelné základní údaje (povinné dle kapitoly 4.2)
- žádanku nebo odběrovou nádobu znečištěnou biologickým materiálem,
- nádobu s biologickým materiálem, kde není způsob identifikace materiálu z hlediska nezaměnitelnosti dostatečný, za dostatečnou identifikaci materiálu se považuje splnění uvedených pokynů o nezbytné identifikaci biologického materiálu
- 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

SQ-014 Laboratorní příručka

do Knihy neshod při příjmu vzorků s uvedením – data, identifikace pacienta, pracovníka laboratoře, důvodu zápisu a komu byla neshoda hlášena.

- 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 LIS Envis, kde jsou vedeny neshody na příjmu.
- V případě, že se jedná o nenahraditelný biologický materiál a není jednoznačně identifikovaný, laboratoř začne tento materiál vždy zpracovávat, ale výsledky nebudou uvolněny, dokud požadující lékař nebo osoba odebírající materiál nepřevezmou 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.

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 uchovávání 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.

Informované souhlasy jsou součástí externích žádanek 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 v zdravotnické dokumentaci pacienta v ambulantní části společnosti GENNET, s.r.o.

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

SQ-014 Laboratorní příručka

- **Ejakulát**
 - Sterilní kontejner se šroubovacím víčkem
- **Folikulární tekutina**
 - Sterilní 14 ml zkumavka s víčkem (Falcon 35-2005)
- **Materiál z MESA, TESE**
 - Sterilní 14 ml zkumavka s víčkem (Falcon 35-2005) nebo injekční stříkačka (1 ml)
- **Zamražený materiál**
 - specifický nosič určený pro kryokonzervaci nebo vitrifikaci lidských reprodukčních buněk a embryí
- **Blastomery nebo buňky trofektodermu na PGT**
 - polylysinovaná podložní sklíčka u metody FISH
 - mikrozkušavky s příslušným pufrem u metody array/NGS
- **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 sekvenční 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
 - vyšetření látkové imunity (komplement, protilátky, proteiny akutní fáze):
zkumavky Vacuette (červené nebo zlaté víčko) bez přísad
- **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

Při odběru je nutné vždy odběrové nádoby/zkušavky 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 ultrazukovém 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 pupečníku (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 ultrazukem. 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 znečistiví. Poloha hrotu jehly je stále kontrolována ultrazukem. Vyjimečně 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 pupečníku z plodové plochy placenty, méně často z volné kličky nebo úponu pupečníku na břišní stěně plodu. Výkon se provádí bez lokálního umrtvení. Poloha hrotu jehly je kontrolována ultrazukem. 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 přerušení 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 pupečníku. Tato komplikace se udává v 1,4% případech. Termín invazivního odběru se domluví při genetické konzultaci na našem pracovišti (ambulanci Lékařské

SQ-014 Laboratorní příručka

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 – 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**).

10.2.2.2. Specifika odběru pro molekulárně genetická a molekulárně cytogenetické 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 – 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,

10.2.2.3. Specifika odběru pro imunologická vyšetření

V imunologické laboratoři je primární odběrový materiál skladován minimálně 3 dny v lednicích při teplotách 2-8°C, výjimkou jsou vzorky pro průtokovou cytometrii, které se uchovávají při pokojové teplotě. Sekundární materiál (sérum, plazma) jsou do zpracování uchovávány v lednici při 2-8°C, není-li v SOP uvedeno jinak.

SQ-014 Laboratorní příručka

Transport vzorků do laboratoře nezajišťuje Laboratoř GENNET. 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 odebíraný materiál je do laboratoře dopravován svozem za dodržení pravidel bezpečnosti práce s biologickým materiálem.

Doporučené množství plné krve při primárním odběru:

| | |
|------------------------|---|
| Humorální imunita | běžný odběr 4-8 ml srážlivé krve v závislosti na množství požadavků |
| Buněčná imunita | odběr 2 ml nesrážlivé krve - Heparin (při odběru do K ₃ EDTA nelze vyšetřit funkční testy) současně nutno odebrat vzorek na krevní obraz (KO+dif) - 0,5 - 1,0 ml nesrážlivé krve do K ₃ EDTA |
| Stolice | Odběr stolice o velikosti lískového oříšku do sterilní nádoby – vyšetření Kalprotektin |
| Reprodukční imunologie | Minimálně 1 ml ejakulátu do sterilní zkumavky |

10.2.3. Odběr potracené tkáně - 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.

10.2.3.1. Specifika odběru pro molekulárně genetická a molekulárně cytogenetická vyšetření

Odebraný materiál se uchovává v lednici při teplotě 2 – 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.

10.2.4. 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.

10.2.4.1. Specifika odběru

Odběr spermatu pro vyšetření je možné provést doma a vzorek pak přinést na pracoviště jen výjimečně. 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 nádoba pevně uzavřená, s vyplněným přesným časem odběru a dopravená do naší kliniky do 60 minut. Při tom je nutné zajistit teplotu, co nejbližší teplotě lidského těla (ideálně **při teplotě 20-37°C**)

SQ-014 Laboratorní příručka

Vzorek musí na našem pracovišti předat muž, jemuž vzorek patří a při tom se prokázat osobními doklady.

10.2.5. 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.

10.2.5.1. Specifika odběru

Odebraný vzorek je nutné předat do laboratoře a **nejpozději do 15 min od odběru zpracovat**. Je nutné zabránit podchlazení vzorku pod 37,0 °C .

10.2.6. 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 (Falcon 35-2005). Jednotlivé vzorky jsou po odběru ihned předány do laboratoře IVF, kde se prohlédnou pod mikroskopem a vyhodnotí se přítomnost a kvalita spermií. Po vyhodnocení je se vzorky nakládáno dle *SOP-IVF-002*.

10.2.6.1. 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 .

10.2.7. Odběr blastomery/buněk trofektodermu na PGT

Odběr provádí embryolog v laboratoři IVF za využití mikromanipulačního zařízení a nástrojů. Pro PDG/PGS vyšetření jsou blastomery odebírány z 3-6 denního embrya. Po odběru jsou blastomery umístěny do pufrů v mikrozskumavkách dodaných laboratořemi MGL a CL nebo fixovány na polylysinové skla a transportovány za stanovených podmínek do laboratoří MGL a CL.

10.2.7.1. Specifika odběru

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

10.2.8. Odběr zamraženého materiálu

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

10.2.8.1. Specifika odběru

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

10.2.9. 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

SQ-014 Laboratorní příručka

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.

10.2.9.1. Specifika odběru

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

10.2.10. 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.

10.2.10.1. Specifika odběru

Odebraný vzorek je nutné uložit v lednici (2 – 8 °C) a dopravit do laboratoře nejpozději do týdne.

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 dodržení čas a podmínky transportu**
- 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 chránit biologický materiál před extrémní teplotou a světlem a je nutné během transportu monitorovat teplotu v transportním boxu kalibrovaným teploměrem

SQ-014 Laboratorní příručka

- 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 převážené 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 č. 5 Podmínky transportu vzorků této Laboratorní příručky.

Upozornění:

Pokud je materiál během transportu vylitý nebo rozbitý, laboratoř to žadateli telefonicky oznámí a požádá ho o nový odběr.

12. Fáze po vyšetření

12.1. Bezpečné odstraňování materiálů použitých při odběru

Materiál použitý při odběru primárních vzorků je považován za potenciaálně 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.

SQ-014 Laboratorní příručka

| Imunologická laboratoř | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> ejakulát periferní krev (srážlivá) periferní krev pro průtokovou cytometrii (nesrážlivá – EDTA, Heparin) Stolice | <ul style="list-style-type: none"> okamžité zpracování v laboratoři, není možné uchovávat primární vzorek minimálně 3 dny v lednici při 2-8°C sekundární vzorek (separované sérum) – do zpracování vyšetření v lednici při 2-8°C (není-li v SOP uvedeno jinak) archivní vzorek po dobu minimálně 1 měsíce při -18 až -25°C skladování 3 dny při laboratorní teplotě zpracování do 2 dnů od odběru, uchování v lednici při 2-8°C, likvidace po provedení analýzy <p>nezpracované části vzorků jsou likvidovány jako nebezpečný odpad dle <i>SQ-003 Provozní řád</i></p> |

| Cytogenetická laboratoř | |
|--|--|
| Primární vzorky <ul style="list-style-type: none"> periferní krev pupečnicková krev plodová voda - sediment choriové klky solidní tkáň blastomera/buňky trofektodermu | <ul style="list-style-type: none"> do doby úspěšné kultivace, 2-8°C do doby úspěšné kultivace, 2-8°C do doby zahájení kultivace, 2-8°C do doby zahájení kultivace, 2-8°C do doby zahájení kultivace, 2-8°C do doby amplifikace DNA (resp. hybridizace se značenou sondou), -18- 22°C <p>vzorky jsou likvidovány jako nebezpečný odpad dle <i>SQ-003 Provozní řád</i></p> |
| Buněčné suspenze (pokud jsou k dispozici) | se uchovávají v lednici do doby vydání výsledků 2 -8°C |
| Trvalé preparáty patologické normální | - s dobou uchovávání 5 let - s dobou uchovávání 5 let |
| FISH preparáty | pouze s patologickým výsledkem, v mrazáku (-18° až -22° C) maximálně po dobu použitelnosti udanou výrobcem sondy |

| Molekulárně genetická laboratoř |
|---------------------------------|
|---------------------------------|

SQ-014 Laboratorní příručka

| | |
|---|---|
| Primární vzorky <ul style="list-style-type: none">• periferní krev• pupečnicková krev• choriové klky• solidní tkáň• bukální stěr | <ul style="list-style-type: none">• po dobu 5 let v mrazáku (-18° až -22° C)• do doby izolace DNA, 2-8°C• do doby izolace DNA, 2-8°C• do doby izolace DNA, 2-8°C• do doby izolace DNA, 2-8°C vzorky jsou likvidovány jako nebezpečný odpad dle SQ-003 Provozního řád |
| Plodová voda (zbytek po izolaci DNApokud je k dispozici) | se uchovává v lednici do doby vydání výsledků, 2-8°C |
| Laboratoř IVF | |
| neskladuje vzorky po zpracování k dalšímu dovyšetření. | |

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 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).

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.

SQ-014 Laboratorní příručka

13. Vydávání výsledků a komunikace s laboratoří

13.1. Informace o formách vydávání výsledků

Laboratoře používají v současné době primárně vydávání výsledků v tištěné formě výsledkových listů přes laboratorní IS a v případě IML je v některých případech používáno i elektronické zaslání výsledkových listů. Výsledky musí být čitelné a bez přepisů. Před vydáním jsou všechny výsledky kontrolovány pracovníky a podepsány oprávněným pracovníkem (vedoucím úseku) a 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.

Pracovník centrálního příjmu zodpovídá za distribuci výsledků k externímu žadateli o vyšetření. Distribuce těchto výsledků je zajištěna dle domluvy s jednotlivými lékaři. Výsledek může být lékařem odeslán v elektronické podobě na uvedenou emailovou adresu pomocí zaheslované přílohy, přičemž každý externí žadatel má přiřazen unikátní kód. V tištěné podobě je výsledek vložen do obálky, na kterou 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 doporučené s dodejkou do vlastních rukou lékaře.

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 nález, komunikuje s žadatelem o vyšetření (lékařem indikujícím laboratorní vyšetření) vždy vedoucí daného oddělení, kde se chyba vyskytla. Žadateli je poté neprodleně dodán nový výsledkový list se správnými výsledky.

Pokud je výsledek změněn, je žadatel informován o změně výsledků a nový výsledkový list je mu zaslán s novým datem a hodinou tisku a s informací o změně výsledku. Nový výsledkový list je mu zaslán s průvodním a omluvným dopisem „Revize vyšetření“ se základními identifikačními údaji pacienta a důvodu vydávání nového revidovaného výsledkového listu. V novém výsledkovém listu musí být uvedeno: „Oprava výsledku pacienta **jméno, příjmení**. Tato výsledková zpráva nahrazuje zprávu ze dne **DD.MM.RRRR**. „Prosíme o skartaci původního 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:** 3 - 4 týdny (nemělo by obvykle přesáhnout 8 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
- **Preimplantační genetické testování metodou Karyomapping (trofektoderm):** 2-4 týdny
- **Vyšetření potracené tkáně:** 2 – 4 týdny
- **Molekulárně-genetické vyšetření (obecně):** 2-3 týdny (individuálně dle vyšetření – QF-PCR max. 48 hodin (v pracovních dnech), vyšetření panelem CZECANCA (3 měsíce, STATIM 1 měsíc), vyšetření panelem CarrierTest (4-6 týdnů, STATIM 1 měsíc)
- **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 *Příloze č.4*

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*.

SQ-014 Laboratorní příručka

13.5. Způsob řešení stížností

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

Stížnost lze podávat na:

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

Způsob podání stížnosti:

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

Termíny pro vyřízení stížností:

- Pokud stížnost není řešena ihned, je termín na vyřízení stížnosti 30 dnů. Odpovědný pracovník stěžovateli telefonicky nebo písemně sdělí výsledek šetření.

14. Přílohy

SQ-014 P1 Seznam vyšetření Imunologická laboratoř

SQ-014 P2 Seznam vyšetření Molekulárně genetická laboratoř

SQ-014 P3 Seznam vyšetření IVF laboratoř

SQ-014 P4 Seznam vyšetření Cytogenetická laboratoř

SQ-014 P5 Podmínky transportu vzorků