

Laboratorní příručka

Platnost dokumentu: **12. listopadu 2021**

Datum vypracování: 11. listopadu 2021

Datum schválení: 12. listopadu 2021

Vypracoval: Bc. Adéla Vosková

Schválil, podpis: Mgr. Sabina Planetová

Garant dokumentu: Mgr. Sabina Planetová

Verze: **002**

Identifikace dokumentu: **VD.GP 04**

Typ dokumentu: **Veřejný**

Výtisk č.:

Ostatní informace: Nahrazuje verzi 001 platnou od 20.10.2021.
Změny: kap. 4.1, 6.1.2.2, 6.1.3.1, 6.1.3.7, 8.2.2.1, 8.2.2.2; nová kap. 6.1.3.8

Před použitím dokumentu si podle čísla verze ověřte, že se jedná o aktuální verzi.

Obsah:

1. Úvod	4
2. Informace o laboratoři	5
2.1 Základní údaje o laboratoři	5
2.2 Úroveň a stav akreditace	6
3. Terminologie, definice, zkratky	7
4. Zaměření laboratoře a spektrum nabízených služeb	8
4.1 Seznam nabízených laboratorních vyšetření	9
4.2 Smluvní laboratoř	10
5. Prohlášení o souhlasu	11
6. Manuál pro odběr primárních vzorků	12
6.1 Základní informace pro uživatele laboratorních služeb Genetické laboratoře	12
6.1.1 Cytogenetické metody	12
6.1.1.1 Chromozomální vyšetření	12
6.1.2 Molekulárně-cytogenetické metody	13
6.1.2.1 FISH vyšetření	13
6.1.2.2 Vyšetření metodou array CGH	14
6.1.3 Molekulárně-genetické metody	15
6.1.3.1 QF PCR vyšetření	15
6.1.3.2 Vyšetření mutací v CFTR genu pro cystickou fibrózu	15
6.1.3.3 Vyšetření nejčastějších mikrodelecií AZF oblasti na Y chromozomu	16
6.1.3.4 Vyšetření na přítomnost trombofilních variant	16
6.1.3.5 Vyšetření mutace 35delG, W24X v genu pro connexin 26	16
6.1.3.6 DNA určování otcovství pomocí STR markerů	16
6.1.3.7 DNA vyšetření predispozičních alel k celiakii	17
6.1.3.8 DNA vyšetření alely HLA-B27	17
6.1.3.9 Vyšetření syndromu fragilního X chromozómu – FRAXA	17
6.1.3.10 Mutační analýza genů metodou Sangerova sekvenování	18
6.1.3.11 Mutační analýza genů metodou masivně paralelního sekvenování	18
6.1.3.12 Preimplantační genetické vyšetření chromozómových aberací (PGT-A, PGT-SR) metodou masivně paralelního sekvenování	19
6.1.3.13 Vyšetření delecí či duplikací metodou MLPA s následnou fragmentační analýzou 20	19
6.1.4 Metody reprodukční imunologie	21
6.1.4.1 Vyšetření protilátek proti fosfolipidům	21
6.1.4.2 Vyšetření antizonálních protilátek	21
6.1.4.3 Vyšetření antispermatozoidálních protilátek	21
6.1.4.4 Vyšetření intraakrozomálních enzymů	22
6.1.4.5 Průnik spermií ovulačním hlenem penetrační metodou (Kremerův test)	22
6.1.4.6 Vyšetření spermiogramu	22
6.2 Identifikační označení primárního vzorku	23
6.3 Průvodka na laboratorní vyšetření	23
6.4 Požadavky na urgentní vyšetření	24
6.5 Ústní požadavky na vyšetření	24
6.6 Informace pro odběr biologického materiálu včetně minimálního množství	24
6.6.1 Odběrové nádoby	24
6.6.2 Odběr plodové vody – amniocentéza	24
6.6.3 Odběr choriových klků	25
6.6.4 Odběr periferní krve	25
6.6.5 Odběr potracené tkáně	26

6.6.6	Biopsie trofoektodermu embryí.....	26
6.6.7	Odběr spermatu (ejakulátu).....	26
6.6.8	Odběr slizničního stěru z dutiny ústní (bukální stěr)	27
6.6.9	Protokolární odběr k DNA paternitní expertize s posudkem soudního znalce	27
6.6.10	Odběr ovulačního sekretu (hlenu)	27
6.7	Odběr primárního vzorku.....	27
6.8	Transport a manipulace s biologickým materiálem (se vzorky)	28
7.	Příjem vzorků do laboratoře	29
7.1	Důvody odmítnutí vzorků pro zpracování.....	29
7.2	Způsob řešení neshod na příjmu materiálu.....	29
8.	Fáze po laboratorním vyšetření	31
8.1	Bezpečné odstraňování materiálů použitých při odběru	31
8.2	Manipulace a skladování materiálu	31
8.2.1	Skladování před a v průběhu vlastního vyšetření	31
8.2.2	Skladování po vyšetření	31
8.2.2.1	Primární vzorky.....	31
8.2.2.2	Sekundární vzorky	31
8.2.2.3	Trvalé preparáty.....	32
8.3	Dodatečná vyšetření a časový interval pro jejich požadování	32
8.4	Opakování vyšetření stejného primárního vzorku	32
9.	Vydávání výsledků a komunikace s laboratoří	33
9.1	Informace o formách vydávání výsledků	33
9.2	Změny výsledků a nálezů	33
9.3	Intervaly dodání vzorků k vydání výsledků.....	33
9.4	Konzultační činnost laboratoře	34
9.5	Řešení stížností	34
9.6	Obecné zásady laboratoře na ochranu osobních údajů.....	34
10.	Související dokumentace.....	35
10.1	Informované souhlasy	35
10.2	Průvodky	35
10.3	Další související dokumentace	35
10.4	Přílohy.....	35

1. Úvod

Cílem dokumentu je informovat lékaře a žadatele o laboratorní vyšetření o nabídce našich služeb, poskytnout zdravotnickým pracovníkům potřebné informace před vlastním vyšetřením, z jeho průběhu a po vyšetření (informace o vydávání výsledků).

Tato příručka je jedním z prostředků pro komunikaci mezi lékaři a genetickou laboratoří a v neposlední řadě je prezentací naší práce. Obsahuje požadavky pro provedení správného odběru vzorků, jejich manipulaci a skladování tak, aby nebyl negativně ovlivněn výsledek laboratorních vyšetření. Žadatelé o vyšetření mají k příručce dostupné pokyny pro pacienty, formuláře pro informovaný souhlas a průvodky pro všechna laboratorní vyšetření.

Soubor nabízených laboratorních vyšetření a metod je vytvořen a inovován dle požadavků klientů s přihlédnutím k odbornému vývoji v oblastech klinické genetiky a reprodukční imunologie.

Laboratorní příručka je součástí řízené dokumentace laboratoře, je pravidelně aktualizována a žadatelům o vyšetření je dostupná na webových stránkách laboratoře www.genetika-plzen.cz. Žadatelé o vyšetření jsou informováni o změnách a aktualizacích. V tištěné podobě je k dispozici u manažera kvality Genetického pracoviště.

2. Informace o laboratoři

2.1 Základní údaje o laboratoři

Genetická laboratoř je součástí společnosti Genetika Plzeň, s.r.o., která je členem koncernu Skupiny NEXTCLINICS působící v oblasti poskytování zdravotní péče.

Název společnosti: **Genetika Plzeň, s.r.o.**
IČO: 26357623
Sídlo společnosti: Parková 1254/11a, 326 00 Plzeň-Černice
Statutární zástupci: Doc. MUDr. František Lošan, CSc., jednatel
MUDr. Petr Lošan, jednatel

Vedoucí genetického pracoviště: MUDr. Petr Lošan

Název laboratoře: **Genetická laboratoř**
Adresa laboratoře: Parková 1254/11a, 326 00 Plzeň-Černice
e-mail: office@genetika-plzen.cz
telefon: 377 241 529, 377 452 322

Vedoucí laboratoře: **Mgr. Sabina Planetová**
Zástupce vedoucí laboratoře: MUDr. Petr Lošan
Manažer kvality: Bc. Adéla Wosková

Genetickou laboratoř tvoří 4 samostatné odborné sekce:

Sekce cytogenetiky

Vedoucí sekce: Mgr. Sabina Planetová
604 106 586
sabina.planetova@next-clinics.com

Sekce reprodukční imunologie

Vedoucí sekce: Prof. MUDr. Zdeňka Ulčová-Gallová, DrSc.
720 973 820
zdenka.ulcova-gallova@next-clinics.com

Sekce reprodukční genetiky

Vedoucí sekce: RNDr. Martina Hrubá, Ph.D.
605 179 548
martina.hrub@next-clinics.com

Sekce molekulární genetiky

Vedoucí sekce: Mgr. Michaela Nečasánková, Ph.D.
731 433 571, 731 433 596
michaela.necasankova@next-clinics.com

Soudní znalec: Ing. Ivana Vobrubová
601 083 734
ivana.vobrubova@next-clinics.com

Odborné konzultace: Doc. MUDr. František Lošan, CSc.
MUDr. Petr Lošan
Prof. MUDr. Zdeňka Ulčová–Gallová, DrSc.
MUDr. Dagmar Štenglová
MUDr. Olga Slunečková
MUDr. Kateřina Čabradová
MUDr. Jan Cibulka, Ph.D.

Provozní doba laboratoře:

Pondělí	07:00 – 16:00
Úterý	07:00 – 16:00
Středa	07:00 – 16:00
Čtvrtek	07:00 – 16:00
Pátek	07:00 – 16:00

2.2 Úroveň a stav akreditace





Laboratoř je držitelem osvědčení o akreditaci systému managementu kvality dle požadavků normy ČSN EN ISO 15 189:2013 - Zdravotnické laboratoře – Požadavky na kvalitu a způsobilost pod číslem 8034. Dále má povolení činnosti diagnostické laboratoře od Státního ústavu pro kontrolu léčiv.

3. Terminologie, definice, zkratky

aCGH / array CGH	komparativní genomová hybridizace na čipu, metoda molekulární genetiky a cytogenetiky, z angl. <i>Array Comparative Genome Hybridization</i>
AIH	homologní inseminace (umístění spermií muže do dělohy partnerky), z angl. <i>Artificial Insemination by Husband's Sperm</i>
APS	antifosfolipidový syndrom, z angl. <i>Antiphospholipid Syndrome</i>
AZF	azoospermický faktor
CNV	odchylky počtu kopií, z angl. <i>Copy Number Variation</i>
DNA	deoxyribonukleová kyselina, z angl. <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
ELISA	imunologická metoda, z angl. <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
FITC	fluorescenční barvička, z angl. <i>Fluorescein IsoThioCyanate</i>
HBOC	hereditární karcinom prsu a ovárií, z angl. <i>Hereditary Breast-Ovarian Cancer</i>
IVF	<i>in vitro</i> fertilizace
MLPA	metoda molekulární genetiky z angl. <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
NGS	= masivně paralelní sekvenování, sekvenování nové generace z angl. <i>New Generation Sequencing</i>
OA	osobní anamnéza
PCR	polymerázová řetězová reakce z angl. <i>Polymerase Chain Reaction</i> , metoda molekulární genetiky
PGT	preimplantační genetické testování, metoda molekulární a reprodukční genetiky
PGT-A	preimplantační genetické vyšetření aneuploidií, z angl. <i>Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidies</i>
PGT-SR	preimplantační genetické vyšetření nebalancovaných forem familiárních chromozómových přestaveb, z angl. <i>Preimplantation Genetic Testing for Familial Chromosomal Structural Rearrangements</i>
QF PCR	kvantitativní fluorescenční PCR, z angl. <i>Quantitative Fluorescence PCR</i>
PMR	psychomotorická retardace
RA	rodinná anamnéza
SMA	spinální muskulární atrofie
STR	genetické markery z angl. <i>Short Tandem Repeats</i>

4. Zaměření laboratoře a spektrum nabízených služeb

Genetická laboratoř je členěna na 4 samostatné odborné sekce:

-  **Sekce cytogenetiky (CG)**
-  **Sekce reprodukční imunologie (RI)**
-  **Sekce reprodukční genetiky (RG)**
-  **Sekce molekulární genetiky (MG)**

Tato Laboratorní příručka popisuje provádění specializovaných cytogenetických, molekulárně genetických a imunologických vyšetření, a to z těchto **primárních materiálů**:

- plodové vody
- periferní krve
- fetální krve
- slizničního stěru z dutiny ústní
- potrácené tkáně
- choriových klků
- blastomer
- spermatu (kvalitativní a kvantitativní vyšetření u neplodných párů)
- ovulačního hlenu
- buněk trofoektodermu

Přehled prováděných vyšetření:

- genetické vyšetření dětí a dospělých s vrozenou vadou
- vyšetření rodin s výskytem nádorového onemocnění v několika generacích
- vyšetření manželských párů s poruchou plodnosti a s opak. spontánními potraty
- vyšetření mužské plodnosti – spermiogram
- předmanželské vyšetření pokrevně příbuzných partnerů
- screening vrozených vývojových vad plodu v I. a II. trimestru těhotenství
- 3 D (4 D) – ultrazvukové vyšetření plodu
- prenatální genetické vyšetření – odběr plodové vody event. choriových klků s vyšetřením karyotypu plodu
- u indikovaných případů rychlé vyšetření plodové vody nebo choriových klků metodou QF PCR. Vyšetření provádíme i jako nadstandardní (nehrazené pojišťovnou)
- chromozomální vyšetření klasickými cytogenetickými metodami včetně FISH metod (mikrodeleční syndromy)
- vyšetření počtu kopií CNV metodou komparativní genomové hybridizace na čipu
- chromozomální vyšetření potrácených plodů
- STR analýza k ověření příbuzenských vztahů
- molekulárně genetické vyšetření dědičnosti sklonu k trombózám (vyšetření trombofilních stavů), cystické fibrózy, mikrodelece Y chromozomu a nesyndromové hluchoty (gen GJB2)
- vyšetření celiakie
- mutační analýza genů souvisejících s hereditárním karcinomem prsu a ovárií
- vyšetření přenašečství pro nejčastější recesivní monogenní onemocnění – Carrier screening preimplantační genetické vyšetření chromozomových aberací (PGT-A, PGT-SR) metodou masivně paralelního sekvenování
- vyšetření intragenových přestaveb genů metodou MLPA
- stanovení protilátek proti spermiím v séru, ejakulátu, ovulačním sekretu
- vyšetření průniku spermií ovulačním hlenem
- vyšetření intrakrozomálních enzymů v lidských spermiích
- vyšetření ovulačního hlenu

- vyšetření antiovariálních a antizonálních protilátek
- stanovení protilátek proti profilu fosfolipidů: annexinu V, fosfatidil (ph)-serinu, ph-inositolu, ph-etanolamínu, ph-D glycerolu, proti kyselině fosfatidové, kardiolipinu a β 2-glykoproteinu I
- konzultační činnost, návrh léčby, ev. léčbu

V naší laboratoři je možné provést pouze izolaci DNA a zprostředkovat vyšetření prováděná ve specializovaných centrech molekulární genetiky (např. Marfanův syndrom, FAP apod.).

4.1 Seznam nabízených laboratorních vyšetření

816 - Laboratoř lékařské genetiky	
SOP 01/SOPV.GP 102	Cytogenetické vyšetření konstitučního karyotypu z lidských buněk
SOP 08/SOPV.GP 701	Detekce mutací v genech ¹⁾ pomocí alelově specifické PCR
SOP 09/SOPV.GP 702	Detekce mikroleceí na chromozómu Y pomocí multiplex PCR analýzy
SOP 10*/SOPV.GP 711	Určování otcovství analýzou STR markerů metodou multiplexní PCR s využitím komerčního kitu Identifiler
SOP 11/SOPV.GP 103	Vyšetření aneuploidií, mikroleceí a strukturních změn chromozomů metodou fluorescenční in situ hybridizace (FISH)
SOP 12/SOPV.GP 703#	STR ²⁾ analýza chromozómů ³⁾ metodou QF PCR
SOP 14/SOPV.GP 704#	Detekce predispozičních HLA alel a alelických skupin ⁴⁾ pomocí alelově specifické PCR
SOP 16/SOPV.GP 705	Stanovení mutací zodpovědných za vrozené trombofilní stavy ⁵⁾ pomocí Real Time PCR
SOP 17/SOPV.GP 706	Vyšetření expanze CGG repetice ve FMR1 genu metodou PCR s následnou fragmentační analýzou
SOP 18/SOPV.GP 707#	Mutační analýza/screening genů ⁶⁾ metodou Sangerova sekvenování
SOP 19/SOPV.GP 708	Vyšetření mutací ⁷⁾ CFTR genu metodou multiplex PCR s následnou fragmentační analýzou
SOP 20/SOPV.GP 101#	Vyšetření počtu kopií CNV metodou komparativní genomové hybridizace na čipu ⁸⁾ (ARRAY CGH)
SOP 22/SOPV.GP 501	Preimplantační genetické vyšetření chromozómových aberací ⁹⁾ (PGT-A, PGT-SR) metodou masivně paralelního sekvenování ¹⁰⁾
SOP 23/SOPV.GP 901#	Mutační analýza genů ⁶⁾ metodou masivně paralelního sekvenování ¹⁰⁾ (platforma Miseq, Illumina)
SOP 24/SOPV.GP 710#	Vyšetření intragenových přestaveb genů ⁶⁾¹¹⁾ metodou MLPA

Metoda s flexibilním rozsahem akreditace

* Metoda není v rozsahu akreditace

813 - Laboratoř reprodukční imunologie	
SOP 31/SOPV.GP 302	Stanovení protilátek proti kardiolipinu ve třídách IgG a IgM metodou ELISA
SOP 32/SOPV.GP 303	Stanovení protilátek proti annexinu V ve třídách IgG a IgM metodou ELISA
SOP 33/SOPV.GP 304	Stanovení protilátek proti beta2-glykoproteinu I ve třídách IgA a IgG metodou ELISA
SOP 34/SOPV.GP 305	Stanovení antispermatických protilátek ve třídě IgA a IgG v ejakulátu a ovulačním hľenu hemaglutinační metodou – přímý a nepřímý MAR test
SOP 37/SOPV.GP 306	Určování akrozómů spermií Lektinem z Pisum Sativum označeným FITC imunofluorescenční metodou
SOP 38/SOPV.GP 307	Průkaz anti-spermatozoidálních protilátek v séru aglutinační metodou

813 - Laboratoř reprodukční imunologie

SOP 39/SOPV.GP 308	Stanovení antiovariálních a antizonálních protilátek metodou nepřímé imunofluorescence
SOP 03/ SOPV.GP 301	Vyšetření spermiogramu makroskopickou a mikroskopickou technikou

- 1) geny: *GJB2*
- 2) STR markery: D13S634, D13S742, D13S305, D13S628, D13S800, D13S252, D13S325, D13S317, D13S1492, D18S535, D18S391, D18S386, D18S978, D18S499, D18S976, D18S1002, D18S858, GATA178F11, D18S1364, D21S1435, D21S11, D21S1270, D21S1411, D21S1444, D21S1442, D21S1437, D21S2055, D21S1409, D21S1280, D21S1446, D15S643, D15S657, D15S659, D15S822, D15S1513, D15S205, D15S1002, D15S1014, S15S1016, D15S1040, D16S539, D16S753, D16S2620, D16S3396, D22S1045, D22S683, D22S686, D22S689, GATA198B05, D14S49, D14S77, D14S43, D14S68, D14S51, P39, DXS981, DXS1187, XHPRT, DXS996, DXS1283E, DYS448, SRY, X22, AMEL, DXS2390, DXYS267, DXYS218, ZFX/Y, T1 (7q34/Xq13), T2 (Xq23/2p23.3), T3 (3p24.2/Xq21.1), sY625, DXS6809, DXS6854, DXS6803, DXS6807
- 3) chromozómy: 13, 15, 16, 18, 21, 22, X, Y
- 4) alely a alelické skupiny: DQ2, DQ8
- 5) geny: *F2, F5, MTHFR, PAI1*
- 6) onkopanel - geny: *ATM, APC, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, EPCAM, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, NBN, PALB2, PMS2, PTEN, RAD50, RAD51C, RAD51D, STK11, TP53*
carrier screening - geny: *ABCC8, ABCD1, ACADM, ACAVLD, AGA, AGL, AIRE, ALDOB, AR, ARSA, ASPA, ASS1, ATP7B, BCKDHA, BCKDHB, CAPN3, CATSPER2, CBS, CFTR, CLN5, CLRN1, CNGA3, CNGB3, CPT1A, CTNS, CYP1B1, DBT, DHCR7, DLD, DMD, F8, F9, FAH, FAM161A, FANCC, G6PC, G6PD, GAA, GALT, GBA, GCDH, GJB2, GLA, GLB1, GLE1, GNTPTAB, HADHA, HBA1, HBA2, HBB, HEXA, HEXB, HGD, HPS1, HYLS1, CHRNE, IKBKAP (ELP1), KCNJ11, L1CAM, MCOLN1, MEFV, MKS1, MMUT, MTHFR, MYO7A, NBN, NPHS1, PAH, PCCA, PCCB, PKHD1, PMM2, POLG1, PPT1, PROP1, RECQL3, RMRP, RPGR, SERPINA1, SGSH, SLC12A3, SLC17A5, SLC26A4, SMN1, SMPD1, STRC, TMEM216, TPP1, TYR, USH2A, XPA*
poruchy reprodukce - geny: *ANXA5, F2, F5, FSHR, MTHFR, USP9Y (AZFa)*
- 7) mutace: F508del, G542X, N1303K, W1282X, G551D, 1717-1G>A, R553X, CFTRdele2,3(21kb), I507del, 711+1G>T, R560T, 1898+G>A, 3120+1G>A, R347H, R347P, 621+1G>T, 3849+10kbC>T, 2789+5G>A, R1162X, 3659delC, R117H, R117C, R334W, G85E, 1078delT, 2183_AA>G, 2184insA, 1677delTA, 2143delT, 3272-26A>G, R1066C, Y1092X(C>A), L1077P, L1065P, T338I, I336K, Intron 8 - 5T(TG9-13)/7T/9T
- 8) SurePrint G3 Unrestricted CGH ISCA v2, 8x60K
- 9) vyšetření všech 24 chromozómů
- 10) název vyšetřovací metody „masivně paralelní sekvenování“ je ekvivalent termínu sekvenování nové generace (NGS, z angl. Next Generation Sequencing)
- 11) geny *SMN1, SMN2*

4.2 Smluvní laboratoř

Laboratoř lékařské genetiky spolupracuje s akreditovanými laboratořemi:

- Centrem lékařské genetiky s.r.o. (České Budějovice)
- Biopstickou laboratoří s.r.o. (Plzeň)
- Všeobecnou fakultní nemocnici v Praze – Klinická imunologie a alergologie

ve smyslu výpomoci v kritických situacích a ke konzultacím.

Dopravu zajišťuje odesílající laboratoř. Ve výsledkovém listu je jasně uvedeno, která laboratorní vyšetření byla provedena smluvní laboratoří nebo konzultantem.

5. Prohlášení o souhlasu

Pacient je vždy seznámen s účelem, povahou a důsledkem prováděného vyšetření. Svým podpisem stvrzuje, že souhlasí s odběrem, genetickým a imunologickým vyšetřením a případným uchováním odebraného genetického materiálu (je vždy uvedeno v informovaném souhlasu DNA). Dále si pacient zvolí, zda souhlasí se sdělením případných klinicky významných náhodných nálezů, které nesouvisí se základní diagnózou. V případě nesouhlasu pacienta s uchováváním DNA je po odebrání identifikace likvidována, jako biologický materiál.

Některé odběry pro laboratorní vyšetření prováděná v rámci Genetického pracoviště patří mezi invazivní a lékař odebírající materiál je povinen informovat pacienty a pořídit písemný souhlas o tomto informování na základě platné legislativy.

Těhotná pacientka je vždy informována a seznámena o moderním ultrazvukovém vyšetření D3 (D4), kdy je poučena o tom, že touto metodou nelze rozpoznat všechny vrozené vývojové vady plodu a svým podpisem stvrzuje, že s touto skutečností byla seznámena.

Samostatnými dokumenty souvisejícími s touto Laboratorní příručkou jsou formuláře pro informované souhlasy:

- **Souhlas vyšetřované/ho (zákonného zástupce) s genetickým laboratorním vyšetřením** (F.GP 901)
- **Nesouhlas vyšetřované osoby (zákonného zástupce) s genetickým laboratorním vyšetřením** – negativní revers (F.GP 902)
- **Poučení a informovaný souhlas s PGT / Informovaný souhlas se skladováním vzorků po PGT** (pro případy, kdy žadající užívá vlastní souhlas s PGT) – podrobněji viz VD.GP 05 Laboratorní příručka PGT.
- **Informovaný souhlas s invazivním prenatálním vyšetřením – amniocentéza, biopsie choriových klků** (F.GP 917)

6. Manuál pro odběr primárních vzorků

V této kapitole jsou všechny specifické pokyny týkající se správného odběru a zacházení s primárními vzorky. Tyto pokyny jsou důležité nejenom pro pracovníky laboratoře, ale i pro **pracovníky odpovědné za odběry primárních vzorků**.

Žadající ručí za správný odběr vzorku, jeho označení a transport do laboratoře dle pokynů této Laboratorní příručky.

Ovlivnění výsledků vyšetření:

1. Nedodržení zásad a pravidel pro odběr, uložení a transport do genetické laboratoře, které jsou uvedené v následujících kapitolách.
2. Nedodržení doby dodání biologického materiálu do laboratoře.
3. Nedostatečné nebo nečitelné popisy biologického materiálu odeslaného k laboratornímu vyšetření.
4. Neúplné vyplnění průvodky biologického materiálu.
5. Dodání kontaminovaného biologického materiálu.
6. Dodání nedostatečného množství biologického materiálu.

U jednotlivých vyšetření jsou popsány negativní faktory ovlivňující výsledek vyšetření.

6.1 Základní informace pro uživatele laboratorních služeb Genetické laboratoře

6.1.1 Cytogenetické metody

Cytogenetické vyšetření je provedeno po indikaci genetikem a řádném genetickém poradenství.

6.1.1.1 Chromozomální vyšetření

Slouží k určení karyotypu klasickými cytogenetickými metodami.

Vyšetření se provádí:

Z plodové vody/choriových klků

Důvodem odběru plodové vody je požadavek na chromozomální vyšetření buněk plodu (tzn. amniocytů) nebo vyšetření jednotlivých genů k vyloučení vývojových vad u plodu. Zároveň lze vyšetřit hladinu alfafetoproteinu v plodové vodě. Jedná se o invazivní vyšetření, kdy riziko komplikací se pohybuje okolo 0.5 - 1%. Proto musí být jasná indikace k provedení odběru plodové vody (amniocentéze). Plodová voda obsahuje kožní a slizniční buňky z povrchu plodu. Tyto buňky se v laboratorních podmínkách, v kultivačním mediu dále dělí a dalším zpracováním je možné z nich vyšetřit chromozomy plodu a jeho genetickou výbavu.

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

Amniocentéza se **provádí nejčastěji mezi 16. - 18. týdnem gravidity, lze ho však provést již od 14. týdne gravidity**. Odběr choriových klků se provádí mezi 9. - 13. týdnem gravidity.

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

Vlastní kultivace a zhodnocení preparátu se pohybuje mezi 9 – 16 dny, proto je důležitý termín provedení odběru. Je nutné počítat s dostatečnou lhůtou na 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 na ultrazvuku
- pozitivní screening I. trimestru
- další méně časté indikace

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 Phytohemaglutininem (PHA). Pod mikroskopem sledujeme počet a strukturu jednotlivých chromozomů. Odběr neprovádíme po transfúzi a provedené infuzi (u novorozence) a po alogenní transplantaci kostní dřeně z důvodů vlivu na výsledky vyšetření. Karyotyp by odpovídal karyotypu dárce, ne pacienta.

Indikace k vyšetření:

- abnormální fenotypické příznaky u pacienta
- problémy růstu a vývoje u pacienta
- mentální retardace pacienta nebo v rodině pacienta
- narození mrtvého plodu a úmrtí novorozence
- opakované spontánní potraty
- problémy s fertilitou
- pozitivní rodinná anamnéza chromozomálních přestaveb

Z potrácené tkáně

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 **médiem (nebo fyziologickým roztokem)**, a v co nejkratší době vzorek dopravit na vyšetření.

Indikace k vyšetření:

- stanovení karyotypu potráceného plodu
- vyloučení vrozené chromozomové aberace u plodu
- odběr se neprovádí po transfúzi, infuzi (u novorozence) – karyotyp, by odpovídal karyotypu dárce, ne pacienta

Ovlivnění výsledků vyšetření:

- kvalita provedení odběru a uchování biologického materiálu
- medikace pacienta s dlouhodobou léčbou
- životní styl (kouření, stres)

6.1.2 Molekulárně-cytogenetické metody

6.1.2.1 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.

Indikace k vyšetření:

- 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).
- Metoda FISH se dále používá při preimplantační genetické diagnostice. Vyšetření buněk odebraných z vyvíjejícího se embrya je tak možné odhalit sledované genetické abnormality (aneuploidie, nebalancované translokace) budoucího plodu. Po tomto vyšetření lze k transferu do dělohy vybrat pouze embrya s normálním nálezem. Podrobnější informace viz VD.GP 05 Laboratorní příručka PGT.

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 chromozómů

Podrobnosti metody FISH jsou uvedeny v SOP 11/SOPV.GP 103.

6.1.2.2 Vyšetření metodou array CGH

Flexibilní rozsah akreditace-laboratoř může modifikovat vyšetřované geny při zachování principu metody s upozorněním na uplatnění flexibility ve výsledkovém listu.

Array CGH (komparativní genomová hybridizace na čipu) je molekulárně cytogenetické vyšetření celého genomu. Primárně slouží k odhalení nebalancovaných aberací (ztrát a zisků sekvencí), jejichž umístění v genomu není předem známé. Hlavním principem je kompetice fluorescenčně značené referenční DNA se značenou DNA pacienta o komplementární sekvence rozprostřené na čipu. Intenzitu každého spotu poté zachytí speciální scanner, pomocí něhož můžeme analyzovat poměr obou fluorochromů. Metodou nelze prokázat balancované chromozomální odchylky, nízkofrekvenční mozaicismus a bodové mutace.

Indikace k vyšetření:

Metoda array CGH se používá v diagnostice postnatální, prenatální i preimplantační. Vyšetření je indikované u pacientů s podezřením na vrozenou vývojovou vadu s genetickou aberací, u kterých klasickými cytogenetickými a molekulárně genetickými metodami nebyly prokázány žádné změny genetické výbavy.

Postnatální diagnostika (normální karyotyp, normální molekulárně genetická vyšetření, např. vyloučení syndromu fragilního X) a bez vysvětlené příčiny:

- psychomotorická retardace / stigmatizace
- problémy růstu a vývoje
- mnohočetné vrozené vady
- zdánlivě balancovaná aberace, upřesnění nalezené aberace (marker chromozom, de novo aberace apod.)
- vyšetření obou rodičů současně s vyšetřením plodu, pokud jeho stáří překročilo 20. týden gravidity a nepřesáhlo ukončený 24. týden těhotenství
- vyšetření obou rodičů v případě čipového nálezu u plodu nebo dítěte k objasnění, zda se jedná o aberaci de novo nebo zděděnou nebo pro posouzení patogenity nálezu
- nelze vyšetřit karyotyp (nemožnost kultivace, nedostatek materiálu apod.)

Prenatální diagnostika:

Metoda array CGH je v současné době považována za metodu první volby v prenatálním vyšetření.

Ovlivnění výsledků vyšetření:

- kvalita provedení odběru biologického materiálu

6.1.3 Molekulárně-genetické metody

Molekulárně genetické vyšetření je provedeno po indikaci genetikem a řádném genetickém poradenství, nebo hematologem.

Izolace DNA je výchozí krok ke všem metodám molekulární genetiky.

Laboratoř provádí:

- izolaci DNA ze vzorku periferní krve, plodové vody a choriových klků
- izolaci DNA z kultivovaných buněk buněčných kultur
- izolaci DNA ze slizničních stěrů
- izolaci DNA z tkáně potracených plodů
- izolaci DNA z buněk trofoektodermu embryí
- izolace DNA z fetální krve

6.1.3.1 QF PCR vyšetření

Flexibilní rozsah akreditace-laboratoř může modifikovat vyšetřované geny při zachování principu metody s upozorněním na uplatnění flexibility ve výsledkovém listu.

Vyšetření metodou QF PCR slouží jako rychlá diagnostika aneuploidií a uniparentální dizomie autozomálních chromozómů a pohlavních chromozómů. Jedná se o analýzu specifických STR lokusů pomocí PCR techniky a následné fragmentační analýzy kapilární elektroforézou.

Detekce dědičných onemocnění zahrnuje především syndromy Down, Edward, Patau, Klinefelter, Turner, Jacob (supermale), triple X (superfemale) a polyploidie.

Vyšetření aneuploidií lze provádět z plodové vody, choriových klků, fetální krve a potracené tkáně plodu

Indikace k vyšetření:

- Pozitivní, atypický nebo hraniční screening I. a II. trimestru
- celkové genetické riziko nad 10 %.
- abnormální ultrazvukový nález.
- kombinace více rizikových faktorů.

Negativní faktory ovlivňující výsledky vyšetření:

- špatná kvalita primárního vzorku

6.1.3.2 Vyšetření mutací v CFTR genu pro cystickou fibrózu

Laboratoř provádí vyšetření 36 mutací CFTR genu a stanovení polymorfismu v intronu 8 (Tn varianty) pomocí kitu Devyser Core.

Vyšetřované mutace představují 91 % všech mutací CFTR genu v české populaci. Jejich vyloučením se snižuje pravděpodobnost nosičství mutace v CFTR genu na 1:278 (0,36%) 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 před plánovaným těhotenstvím, případně v průběhu těhotenství
- u dospělých mužů s poruchou plodnosti
- prenatalní diagnostika v případě partnerů heterozygotů pro mutaci v CFTR genu
- prekoncepční vyšetření
- dárci gamet

Negativní faktory ovlivňující výsledky vyšetření:

- špatná kvalita primárního vzorku

6.1.3.3 Vyšetření nejčastějších mikrodeleci AZF oblasti na Y chromozomu

Analýza AZF oblasti (azoospermický faktor) na dlouhém rameni Y chromozomu.

Jsou vyšetřovány oblasti AZFa, AZFv, 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 oligozoospermie.

Negativní faktory ovlivňující výsledky vyšetření:

- špatná kvalita primárního vzorku

6.1.3.4 Vyšetření na přítomnost trombofilních variant

Gen pro koagulační faktor V – varianta FV Leiden – G1691A (AGR506Thr)

Gen protrombin (koagulační faktor II) – varianta G20210A

Indikace k vyšetření:

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

Negativní faktory ovlivňující výsledky vyšetření:

- špatná kvalita primárního vzorku

6.1.3.5 Vyšetření mutace 35delG, W24X v genu pro connexin 26

Detekce prevalentních mutací v genu pro connexin 26 (GJB2). Vyšetřovaná mutace je nejčastější příčinou ztráty sluchu.

Vyšetřením je možné zachytit jak postižené jedince (homozygoty), tak slyšící přenašeče (heterozygoty).

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 zjištěna

Negativní faktory ovlivňující výsledky vyšetření:

- špatná kvalita primárního vzorku

6.1.3.6 DNA určování otcovství pomocí STR markerů

Multiplex PCR 16-ti STR markerů s následnou fragmentační analýzou, za použití kitu AmpFLSTR® Identifier® Kit.

S posudkem soudního znalce se musí vyšetřit domnělý otec, matka a dítě (popř. více domnělých otců, či více dětí).

Pokud je požadován posudek soudního znalce musí být vzorky odebrány **dle protokolárního odběru** (viz kap. 6.8.9).

Pokud posudek není požadován, lze provést analýzu jen otce a dítěte bez vyšetření matky, v tomto případě se **neprovádí protokolární odběr** (tyto analýzy provádíme pouze ve výjimečných případech s ohledem na zájmy nezletilého dítěte).

Vyšetření provádíme na základě objednávky žadatelů o vyšetření (soukromé osoby, soudy, státní zastupitelstva, popř. jiné orgány činné v trestním řízení).

6.1.3.7 DNA vyšetření predispozičních alel k celiakii

Flexibilní rozsah akreditace-laboratoř může modifikovat vyšetřované geny při zachování principu metody s upozorněním na uplatnění flexibility ve výsledkovém listu.

Vyšetření se provádí za účelem detekce HLA alel predispozičních k celiakii.

Vyšetřované alely se vyskytují u více než u 99% pacientů s celiakií a u 20% zdravých kontrol. Přítomnost predispozičních alel zvyšuje 50x riziko onemocnění celiakií oproti populaci.

Indikace k vyšetření:

- neprospívání u dětí
- zažívací potíže
- výskyt celiakie v rodině
- anemie neznámého původu

Negativní faktory ovlivňující výsledky vyšetření:

- špatná kvalita primárního vzorku

6.1.3.8 DNA vyšetření alely HLA-B27

Flexibilní rozsah akreditace-laboratoř může modifikovat vyšetřované geny při zachování principu metody s upozorněním na uplatnění flexibility ve výsledkovém listu.

Vyšetření se provádí za účelem detekce alely HLA- B27.

Alela HLA-B27 je asociována s ankylozující spondylitidou a spondyloartrózi. Zvýšený výskyt tohoto antigenu je spojován i s dalšími onemocněními, jako je Reiterův syndrom nebo uveitida.

Výskyt alely HLA-B27 je u bělochů asi 8%.

Výskyt alely B27 u pacientů s ankylozující spondylitidou je více než 95% (u bělošské populace).

Není vhodné použít tento test pro vyšetření asymptomatické populace pro detekci ankylozující spondylitidy, ale test ukazuje na zvýšenou pravděpodobnost výskytu u symptomatického pacienta. Test je také vhodný k vyloučení choroby u klinicky nejasného pacienta.

Indikace k vyšetření:

- vhodné pro pacienty s klinickými projevy ankylozující spondylitidy

Negativní faktory ovlivňující výsledky vyšetření:

- špatná kvalita primárního vzorku
- přítomnost alely B*27060 a B*2709, může vést k falešně pozitivnímu výsledku. Ačkoli se jedná o B27 alely, nejsou asociovány s chorobou, ale mají naopak protektivní vliv. Výskyt těchto alel v české populaci je velmi vzácný.

6.1.3.9 Vyšetření syndromu fragilního X chromozómu – FRAXA

PCR vyšetření ke stanovení počtu opakování CGG repetice v genu FMR1. Syndrom fragilního X chromozómu je nejčastější příčinou mentální retardace u chlapců, může být příčinou mentální retardace i u dívek. Nosičky premutace mohou trpět předčasným ovariálním selháním. U nosičů (mužů) premutace se může vyskytovat presenilní tremor.

Indikace k vyšetření:

- PMR, autismus v OA nebo v RA
- předčasné ováriální selhání
- presenilní tremor u mužů

Negativní faktory ovlivňující výsledky vyšetření:

- špatná kvalita primárního vzorku

6.1.3.10 Mutační analýza genů metodou Sangerova sekvenování

Flexibilní rozsah akreditace-laboratoř může modifikovat vyšetřované geny při zachování principu metody s upozorněním na uplatnění flexibility ve výsledkovém listu.

Detekce známé mutace v rodině nebo ověření nálezu ze sekvenování nové generace.

Negativní faktory ovlivňující výsledky vyšetření:

- špatná kvalita primárního vzorku

6.1.3.11 Mutační analýza genů metodou masivně paralelního sekvenování

Flexibilní rozsah akreditace-laboratoř může modifikovat vyšetřované geny při zachování principu metody s upozorněním na uplatnění flexibility ve výsledkovém listu.

6.1.3.11.1 Geny souvisejících s hereditárním karcinomem prsu a ovárií (HBOC), střeva a žaludku.

Hereditární syndrom nádoru prsu a/nebo ovárií je autozomálně dominantní syndrom s neúplnou penetrancí. Příčinou jsou kauzální (patogenní) mutace především v tumor supresorových genech BRCA1 nebo BRCA2. Kumulativní riziko pro vznik nádoru prsu u nosiček zárodečné mutace v genech BRCA1 a BRCA2 je odhadováno zhruba na 85 % do věku 70 let. Celoživotní riziko onemocnění nádorem vaječníků se u nosiček mutace v genu BRCA1 odhaduje na cca 40-60 % a u nosiček mutace v genu BRCA2 dosahuje toto riziko cca 27 %. Kromě genů BRCA1,2 jsou za vysoce rizikové v souvislosti s nádory prsu považovány geny TP53, STK11, CDH1, PTEN, PALB2, středně rizikové pak geny ATM, CHEK2, NBN. U nádorů ovárií jsou vysoce rizikové geny pro Lynchův syndrom (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2), dále geny BRIP1, RAD51C a RAD51D.

Kromě hereditárního syndromu nádoru prsu a/nebo ovárií byly genetické dispozice zjištěny i u nádorů střeva (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, APC) a žaludku (CDH1).

Mutační analýza/screening těchto genů umožňuje potvrzení genetického pozadí vzniku nádorového onemocnění u postižených jedinců a následné prediktivní testování jejich biologických příbuzných. Asymptomatictí nosiči mutace jsou zařazeni do dispenzarizačního programu, který slouží k včasnému zachytu možného nádorového onemocnění.

Indikace k vyšetření:

- Familiární výskyt
 - 3x diagnostikovaný karcinom prsu v jakémkoliv věku
 - 2x diagnostikovaný karcinom prsu, alespoň jeden případ pod 50 let, nebo oba do 60 let
 - Probandka s karcinomem prsu v jakémkoli věku s přímým příbuzným s nádorem spojeným s HBOC (především slinivka a prostata)
 - Karcinom ovárií v rodinné anamnéze
- Sporadický výskyt
 - Všechny epitelové karcinomy ovárií/vejcovodů a primární peritoneální karcinom bez ohledu na věk
 - Dva samostatné primární karcinomy prsu, první do 50 let, nebo oba do 60 let (bilaterální nebo ipsilaterální/synchronní nebo metachronní)
 - Unilaterální karcinom prsu do 45 let (do 50 let, pokud není známá rodinná anamnéza)
 - Probandka s karcinomem prsu a pankreatu v jakémkoliv věku
 - Mužský pacient s karcinomem prsu
 - Medulární a atypicky medulární karcinom prsu

- Karcinom prsu triple negativní (negativita estrogenových, progesteronových receptorů a HER2) do 60 let věku
- Výskyt patogenní varianty genu u příbuzných

Hereditární nepolypózní karcinom (HNPCC, Lynchův syndrom)

- Základní indikační kritéria (podrobně viz. Amsterdamská kritéria I, II; Bethesda kritéria)
- Opakovaný výskyt nádorů tlustého střeva a dělohy v rodině (dva a více případů v linii)
- Nádor kolorekta nebo nádor dělohy před 40 rokem věku
- Bethesda kritéria (<http://www.lynch.cz/Muir-Torre-syndrom/slovník/revidovana-kriteriia-Bethesda.php>)

Negativní faktory ovlivňující výsledky vyšetření:

- špatná kvalita primárního vzorku

6.1.3.11.2 Vyšetření přenašečství pro nejčastější recesivní monogenní onemocnění – Carrier screening

Carrier screening je prekoncepční test, jehož cílem je snížit riziko narození dítěte postiženého monogenním onemocněním. U budoucích rodičů jsou vyšetřovány geny spojené s nejčastějšími autozomálně recesivně dědičnými a X-vázanými onemocněními. Test odhalí tzv. skryté přenašeče, tedy jedince, kteří jsou zdraví, ale nesou jednu kopii genu zasaženou mutací. Pokud u autozomálně recesivního onemocnění nesou oba partneři mutaci v kauzálním genu, tj. oba jsou skrytí zdraví přenašeči predispozice pro stejné onemocnění, je u tohoto páru 25% riziko narození dítěte postiženého daným onemocněním. V případě X-vázaných onemocnění je skrytou přenašečkou pouze zdravá matka, která s rizikem 50% může předat mutovaný gen na pohlavním chromozómu X svému synovi, který pak bude postižený.

Nabízený test je tzv. „rozšířený“ **screening přenašečství** (Expanded Carrier Screening) a cílí na **nejčastěji se vyskytující vážné recesivní choroby ve všech světových etnikách**. Celkem je vyšetřeno 91 genů, spojených se **116 autozomálně recesivními a 14 X-vázanými chorobami**, pro seznam vyšetřovaných genů a onemocnění, viz [Carrier screening | Genetika Plzeň \(genetika-plzen.cz\)](#): „Carrier screening – Seznam vyšetřených onemocnění“. Do testu jsou zahrnuty i genové varianty, které mohou souviset s poruchami reprodukce, včetně vrozených trombofilních stavů, pro seznam variant, viz [Carrier screening | Genetika Plzeň \(genetika-plzen.cz\)](#).

Vyšetření je provedeno metodou sekvenování nové generace (NGS), které umožňuje současnou analýzu všech cílových genů zároveň. Neanalyzují se pouze nejčastější mutace, nýbrž celé kódující sekvence, a navíc je zahrnuta i detekce rozsáhlejších (exonových) zisků/ztrát (tzv. Copy Number Variations), čímž je dosaženo významného zvýšení míry detekce mutací (až na 99%) a tedy i snížení reziduálního rizika přenašečství.

Indikace k vyšetření:

- Páry před plánováním koncepce, bez genetické zátěže v rodinné anamnéze (v případě genetické zátěže v rodině může být test proveden jako doplňkový vedle primární analýzy zacílené na familiární onemocnění)

Negativní faktory ovlivňující výsledky vyšetření:

- nevhodný odběr primárního vzorku
- nevhodná metoda izolace DNA

6.1.3.12 Preimplantační genetické vyšetření chromozómových aberací (PGT-A, PGT-SR) metodou masivně paralelního sekvenování

Abnormální počet chromozómů (aneuploidie) embryí je nejčastější příčinou selhání procesu in vitro fertilizace (IVF) a ztráty těhotenství. Metoda NGS (sekvenování nové generace) umožňuje testování biopsií trofoektodermu embryí po procesu IVF a selekci embryí s normálním počtem chromozómů (euploidních) pro implantaci. Bioptované buňky jednotlivých embryí jsou podrobené celogenomové sekvenační analýze kitem VeriSeq (Illumina) a vyhodnocené na přítomnost nebalancovaných aberací u všech 24 chromozómů, tzv. preimplantační genetické testování aneuploidií (PGT-A) nebo nebalancovaných forem familiárních chromozómových přestaveb (PGT-SR). Embrya s normálním chromozómalním profilem jsou následně doporučena pro transfer do dělohy v rámci asistované reprodukce. Podrobnější informace viz VD.GP 05 Laboratorní příručka PGT.

Indikace k vyšetření:

Indikační kritéria pro PGT-SR:

- Nosičství tzv. balancované chromozómové přestavby (obvykle translokace) u jednoho nebo obou partnerů
- Přítomnost početních změn pohlavních chromozómů (gonozómů), včetně mosaikové formy, u jednoho nebo obou partnerů

Indikační kritéria pro PGT-A:

- vyšší maternální věk (> 35 let)
- opakované potrácení (2x a více)**
- porod nebo potrat plodu s chromozómovou abnormalitou**
- opakované selhání předchozích (celých) cyklů IVF (2x a více)**
- opakované selhání implantace po předchozích embryotransferech (2x a více)
- výrazně zhoršené parametry spermiogramu u partnera**
- použití spermií po TESE (odebrání spermií přímo z varlete) či MESA (odebrání spermií přímo z nadvarlete) pro IVF**
- stav po léčbě onkologického onemocnění pomocí chemoterapie či ozařování u jednoho nebo obou partnerů**

** indikace s možností úhrady vyšetření ZP

Negativní faktory ovlivňující výsledky vyšetření:

- špatná kvalita embryí
- špatná kvalita biptovaných buněk trofoblastu

6.1.3.13 Vyšetření delecí či duplikací metodou MLPA s následnou fragmentační analýzou

Flexibilní rozsah akreditace - laboratoř může modifikovat vyšetřované geny při zachování principu metody s upozorněním na uplatnění flexibility ve výsledkovém listu.

Metoda „Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification“ (MLPA) slouží k detekci

početních změn jako jsou delece a duplikace. Je to vysoce citlivá metoda, která je schopna zachytit změny jak v heterozygotní, tak v homozygotní podobě. Tuto metodu v současné době používáme k detekci delecí a duplikací genů SMN1, SMN2 a genů spojených s hereditárním karcinomem prsu a ovarií, střeva a žaludku.

Gen SMN1

Spinální muskulární atrofie (SMA) je po Duchennově svalové dystrofii druhé nejčastější neuromuskulární onemocnění (prevalence 1/8000). Zároveň je druhou nejčastější příčinou úmrtí kojenců na autozomálně recesivní chorobu. V 95 % případů SMA je genetickou příčinou delece genu SMN1. Jedinci, kteří nesou mutovanou variantu genu SMN1 nemají žádné projevy a jsou tudíž přenašeči. Pro projev onemocnění je nezbytná přítomnost obou mutovaných variant genu SMN1.

Indikace k vyšetření:

- Symptomatictí jedinci se suspektní diagnózou SMA
- Asymptomatictí jedinci s potvrzeným či podezřelým výskytem SMA v rodinné anamnéze
- Rodinní příbuzní prvního stupně či partneři přenašečů SMA
- Prenatální vyšetření plodu, pokud jsou oba rodiče přenašeči SMA
- Prekoncepční vyšetření
- Dárci gamet

Negativní faktory ovlivňující výsledky vyšetření:

- Špatná kvalita DNA

6.1.4 Metody reprodukční imunologie

Jsou zaměřeny na vyšetření buněčné odezvy v podobě protilátkových aktivit namířených proti pohlavním buňkám, spermii a povrchu oocytů, dále proti časným zárodkům.

Negativní faktory ovlivňující výsledky imunologických vyšetření:

- **Sérum:** Vyhnout se používání hemolytických, lipemických a ikterických sér. Krev odebírat a sérum uchovávat podle platných směrnic a metod.
- **Ovulační hlen:** Zpracování a uchování ovulačního hlenu podle daného pracovního postupu.
- **Ejakulát:** Dodržování předepsaných podmínek odběru a následné zpracování ejakulátu podle daného postupu.

6.1.4.1 Vyšetření protilátek proti fosfolipidům

Výskyt protilátek proti fosfolipidům a komplexům fosfolipid-protein (aPL) je spojován s klinickým obrazem antifosfolipidového syndromu (APS). APS zahrnuje i velmi početnou skupinu nemocí autoimunitního původu.

Přítomnost vysokých hladin protilátek proti fosfolipidům u těhotných žen je důvodem zvýšené péče o pacientku, neboť je nebezpečí samovolného potratu, nitroděložního úmrtí plodu nebo chorobného srážení krve (trombóza) se všemi nežádoucími účinky.

Vyšetřujeme:

- protilátky proti kardioplinu ve třídě IgG, IgM
- protilátky proti annexinu V ve třídě IgG, IgM
- protilátky proti beta2-glykoproteinu I ve třídě IgA, IgG
- protilátky proti fosfatidyl (ph)-serinu ve třídě IgG, IgM
- protilátky proti ph-inositolu ve třídě IgG, IgM
- protilátky proti ph-etanolamínu ve třídě IgG, IgM
- protilátky proti kyselině fosfatidové ve třídě IgG, IgM
- protilátky proti ph-D glycerinu ve třídě IgG, IgM

Indikace k vyšetření:

- primární sterilita u ženy
- opakované doposud nevysvětlené potrácení
- opakované doposud nevysvětlené neúspěchy při oplodnění ve zkumavce (IVF)
- pacientky se základním autoimunitním onemocněním
- pacientky s anamnézou preeklampsie-eklampsie

6.1.4.2 Vyšetření antizonálních protilátek

Protilátky zaměřené proti antigenům zona pellucida v séru mohou způsobovat u žen primární i sekundární sterilitu i tím, že nedojde ke splnutí spermie s vajíčkem. Jsou obrazem autoimunitní reaktivity k povrchu oocytu, k zoně pellucidě.

Indikace k vyšetření:

- primární sterilita u ženy
- opakované doposud nevysvětlené potrácení
- opakované doposud nevysvětlené neúspěchy při oplodnění ve zkumavce (IVF)
- pacientky se základním autoimunitním onemocněním
- pacientky s anamnézou preeklampsie - eklampsie

6.1.4.3 Vyšetření antispermatozoidálních protilátek

Protilátky proti spermii brání přirozené kapacitační a akrozomální reakci spermii, stávají se překážkou pro splnutí spermie s oocytem. Vlastní průnik spermii genitálním traktem ženy bývá narušen přítomnými protilátkami proti spermii jednak v ovulačním sekretu hrdla děložního, jednak přítomnými

ve vlastním ejakulátu. Také vzájemné vztahy mezi obalem vajíčka, zonou pellucidou a následné spojení s mužskou pohlavní buňkou může být těmito protilátkami ztíženo.

Protilátky proti spermiím vyšetřujeme v séru, ejakulátu a ovulačním hlenu.

Indikace k vyšetření:

- primární sterilita u ženy
- opakované doposud nevysvětlené potrácení
- opakované doposud nevysvětlené neúspěchy při oplodnění ve zkumavce (IVF)
- pacientky se základním autoimunitním onemocněním
- pacientky s anamnézou preeklampsie-eklampsie
- u mužů z páru pro sníženou plodnost
- ejakuláty před kryokonzervací spermií z důvodu závažného onemocnění, dlouhodobé např. služební pracovní cesty apod.
- u mužů - dárců spermií

6.1.4.4 Vyšetření intraakrozomálních enzymů

Intraakrozomální enzymy jsou velmi důležité v přímé reakci povrchu spermie s povrchem oocytu, zonou pellucidou. Jejich množství (%) dotváří i celkovou kvalitu ejakulátu.

Indikace k vyšetření:

- muži z páru pro sníženou plodnost
- ejakuláty před kryokonzervací spermií z důvodu závažného onemocnění, dlouhodobé např. služební pracovní cesty apod.
- u mužů - dárců spermií

6.1.4.5 Průnik spermií ovulačním hlenem penetrační metodou (Kremerův test)

Kremerův test patří mezi tradiční, osvědčené testy penetrační (test pronikání) a současně vyhledávací (screeningové). Úkolem je posoudit vzdálenost, kterou urazí spermie v ovulačním hlenu za jednotku času. Navíc sledujeme počet spermií s progresivním pohybem, posuzujeme charakter spermie a popřípadě změny na hlavičkách spermií. Kremerův test patří mezi nejpoužívanější testy v reprodukční imunologii, protože je přesnější a citlivější než např. klasický test po nechráněném pohlavním styku (postkoitální test).

Indikace k vyšetření:

- u všech žen s ovulací a jinak sníženou plodností
 - primární sterilita u ženy
 - opakované doposud nevysvětlené potrácení
 - opakované doposud nevysvětlené neúspěchy při oplodnění ve zkumavce (IVF)
 - pacientky se základním autoimunitním onemocněním

6.1.4.6 Vyšetření spermioqramu

Vyšetření spermií (spermioqram) – mikroskopické vyšetření ejakulátu (spermatu) na jehož základě se orientačně posuzuje plodnost muže.

Vyšetřované parametry jsou: objem, viskozita, přítomnost cizorodých součástí, koncentrace, pohyblivost a morfologie.

Kapacitace spermií (separace, Swim-up) – ejakulát se upraví na optimální množství spermií a oddělí se živé spermie od mrtvých. **Upravený vzorek lze použít k inseminaci AIH.**

Indikace k vyšetření:

- porucha plodnosti
- genetická indikace

Ovlivnění výsledků vyšetření reprodukční imunologie:

- před odběrem periferní krve omezit na 24 hodin příjem tuků
- nedodržení předepsané pohlavní abstinence

6.2 Identifikační označení primárního vzorku

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

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

Informace týkající se označení embryonálních vzorků viz VD.GP 05 Laboratorní příručka PGT.

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

Poznámka:

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

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

6.3 Průvodka na laboratorní vyšetření

Do laboratoře je přijímán materiál doprovázený průvodkou genetické laboratoře dle požadovaného vyšetření:

- cytogenetické
- molekulárně-genetické
- reprodukční imunologie
- reprodukční genetiky (PGT)

Průvodka musí obsahovat:

Povinné údaje:

- jednoznačná identifikaci pacienta
 - jméno a příjmení
 - rodné číslo (číslo pojištěnce)
 - datum narození
 - pohlaví
 - bydliště pacienta
- identifikaci žadatele o vyšetření – IČP lékaře, adresa a kontakt na žadatele (může být uvedeno na razítku žadatele)
- diagnóza
- druh primárního vzorku – vyšetřovaný materiál
- požadovaná vyšetření
- datum a čas odběru primárního vzorku, identifikace pracovníka provádějící odběr
- datum a čas přijetí vzorku laboratoří (je uváděn v záznamu o přijetí laboratoří)

Podle požadovaných vyšetření dále také například:

- váha, poslední menstruace apod.

Nepovinné údaje:

- telefon pacienta
- telefon nebo jiný kontakt pro sdělení urgentního výsledku
- identifikace pracovníka odebírající vzorek

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

6.4 Požadavky na urgentní vyšetření

Požadavky na vyšetření **STATIM (akutní vyšetření)** se do laboratoře dodávají na stejných průvodkách jako pro ostatní běžná vyšetření a jsou navíc označeny červeným slovem „**STATIM**“. Průvodka musí obsahovat stejné povinné údaje jako u běžného cytogenetického, molekulárně-genetického nebo imunologického vyšetření. Vzorek bude **přednostně** zpracován a odečten.

Secke reprodukční imunologie neprovádí STATIMOVÉ vyšetření.

Samostatnou přílohou jsou průvodky k laboratorním vyšetřením poskytovaných na Genetickém pracovišti a na našich stránkách www.genetika-plzen.cz.

6.5 Ústní požadavky na vyšetření

V době, kdy je biologický materiál či primární vzorek uchovávan v laboratoři pro požadované vyšetření, je možné přijmout ústní požadavek k dodatečnému dovyšetření. Požadavek je přijímán od lékaře nebo sestry, nikoli od pacientů (s výjimkou samoplátců). Externí žadatel je požádán o dodání nové průvodky na doordínované vyšetření.

6.6 Informace pro odběr biologického materiálu včetně minimálního množství

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

6.6.1 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:**

primární vzorek	odběrový systém	
plodová voda	zkumavka bez konzervační látky - Vacuette: žluté víčko	
choriové klky	zkumavka s Li- nebo s Na-heparinem - Vacuette: zelené víčko	
potracená tkáň	zkumavka s médiem Bio AMF (medium na požádání laboratoř dodá), nebo s fyziologickým roztokem	
bukální stěry	sterilní zkumavka s kartáčkem nebo sterilní nylonové výtěrky k PCR vyšetření	
periferní krev	na chromozomové vyšetření	zkumavka s Li- nebo s Na-heparinem - Vacuette: zelené víčko
	na molekulárně-genetické vyšetření	zkumavka s K3EDTA – Vacuette: fialové víčko zkumavka Streck cell-free DNA BCT (10 ml) pro metodu NIPT
	na imunologické vyšetření	zkumavka se separačním gelem – Vacuette (Z Serum Clot Activator): červené víčko
Biopsie trofoektodermu	informace viz VD.GP 05 Laboratorní příručka PGT	
ejakulát	sterilní kontejner s červeným víčkem	
ovulační hlen	sterilní skleněné kapiláry	

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

Pozor na záměnu biologického materiálu!

Nestandardní odběr je nutno specifikovat na průvodce.

6.6.2 Odběr plodové vody – amniocentéza

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

Těhotná leží na lůžku, břišní stěnu dezinfikujeme a poté ultrazvukovou sondou hledáme vhodné místo pro vpich jehlou (**průměr 0,53 mm** - menší než na odběr krve!), na kterou se nasadí sterilní vakuová zkumavka. Poloha hrotu při vpichu je neustále kontrolována ultrazvukem.

Specifika odběru:

Minimální odebrané množství potřebné pro vyšetření 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.

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

Pro odběr plodové vody na Genetickém pracovišti je nutné objednáni na naší ambulanci. Pokud se odběr neprovádí na našem pracovišti, je nutné zajistit transport do laboratoře co nejdříve, **nejpozději však do 24 hodin po odběru**.

6.6.3 Odběr choriových klků

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

Těhotná leží na lůžku, břišní stěnu dezinfikujeme a poté ultrazvukovou sondou hledáme vhodné místo pro vpich jehlou, na kterou se nasadí sterilní vakuová zkumavka. Poloha hrotu při vpichu je neustále kontrolována ultrazvukem.

Specifika odběru:

Minimální odebrané množství potřebné pro vyšetření je jeden choriový klk.

Odebraný vzorek je nutné co nejdříve po odběru dopravit do laboratoře (nejdéle do 24 hodin po odběru).

Při standardním odběru je provedena kultivace tkáně i vyšetření QF PCR. Pokud je získáno odběrem jen minimální množství, provádí se pouze vyšetření QF PCR a array CGH.

Po výkonu, pokud se těhotná cítí dobře, může s doprovodem odejít domů.

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

6.6.4 Odběr periferní krve

Odběr materiálu na cytogenetické ani molekulárně genetické vyšetření nevyžaduje žádnou speciální přípravu pacienta. **Pro odběr na imunologické vyšetření se doporučuje snížit příjem tuků na minimum.**

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 poté se na nástavec nasadí příslušná zkumavka. Místo vpichu se zakryje čtverečkem z buničiny, opatrně se přitlačí a vytáhne jehla a přelepíme náplast. Vyzveme pacienta, aby si tisknul místo vpichu (cca 2 - 5 minut) a po cca 20 minutách si náplast odstraní.

Specifika odběru:

Optimální množství je 5 ml krve, minimálně však **2 ml** (např. u malých dětí). Je však nutné odebrat předepsaný objem krve pro zachování **správného poměru** krve s antikoagulantem (do zkumavky na 5 ml skutečně odebírat 5 ml krve)! Ihned po odběru je potřeba zkumavku **jemně promíchat**, aby nevznikly sraženiny a **nechat krev stát při pokojové teplotě aspoň půl hodiny**. Do doby transportu do laboratoře uchovávat krev v lednici při teplotě 2 - 8 °C. Je nutné zabránit zmrznutí nebo přehřátí krve.

Transport odebrané krve pro cytogenetické vyšetření:

Krevní vzorky transportovat v termotašce bez chladicích vložek nebo termosce, při transportu zamezit silnému třepání s materiálem a zabránit zmrznutí nebo přehřátí krve, aby se zachovaly živé buňky. Zajistit dopravu co nejdříve, do 96 hodin od odběru.

Transport odebrané krve pro molekulárně-genetické vyšetření:

Do laboratoře je nutné vzorky doručit do 14 dnů od odběru.

Transport odebrané krve nebo alikvotu séra pro imunologické vyšetření:

Zajistit dopravu co nejdříve, do 48 hodin od odběru při teplotě 2 - 8°C.

6.6.5 Odběr potracené tkáně

Provádí vždy lékař - gynekolog ve zdravotnickém zařízení. Odebraný materiál za sterilních podmínek vloží do sterilní, označené zkumavky, či nádoby s médiem nebo fyziologickým roztokem a s řádně vyplněnou průvodkou dopraví do laboratoře.

Specifika odběru:

Odebraný vzorek je nutné co nejdříve po odběru dopravit do laboratoře (nejdéle do 96 hodin po odběru).

6.6.6 Biopsie trofoektodermu embryí

Informace k biopsii embryí, viz VD.GP 05 Laboratorní příručka PGT.

6.6.7 Odběr spermatu (ejakulátu)

Odběr ejakulátu je standardně prováděn masturbací (za pomoci erotických časopisů, videa nebo partnerky) ve speciální odběrové místnosti na genetické ambulanci.

Ejakulát má být odebírán po pohlavní abstinenci o délce 3 - 4 dnů a pečlivém dodržení hygieny. Odběr je proveden do sterilního kontejneru, který je označen štítkem se jménem, příjmením a rodným číslem pacienta.

Odběr ejakulátu v genetické ambulanci

Odběr ejakulátu je prováděn ve speciální odběrové místnosti na spermioqramy do označeného kontejneru (nádobku vydává sestra genetické ambulance). Před odběrem pacient podepisuje Poučení pro pacienty před odběrem ejakulátu v genetické ambulanci (F.GP 903).

Po získání ejakulátu zazvoní na sestru a vyčká jejího příchodu a osobně předá označený a uzavřený kontejner. Sestra překontroluje předání (kontrola identifikačních údajů na průvodce s údaji na kontejneru).

Odběr mimo Genetické pracoviště

Odběr ejakulátu mimo Genetické pracoviště je možný po neúspěšných pokusech na genetické ambulanci. V tomto případě pacient podepisuje Poučení pro pacienty před odběrem ejakulátu mimo Genetické pracoviště (F.GP 904) a ztvrzuje svým podpisem, že se seznámil s tímto poučením a na genetické pracoviště předal **pouze svůj** biologický materiál (ejakulát).

Pacient obdrží k odběru označený sterilní kontejner.

Ejakulát musí být dopraven na recepci ambulance **pouze osobně** do jedné hodiny po odběru při teplotě lidského těla, aby nedošlo k přehřívání nebo k zamrznutí.

Při předání biologického materiálu sestře genetické ambulance pacient potvrdí původ svého ejakulátu podpisem na Poučení pro pacienty před odběrem ejakulátu mimo Genetické pracoviště (F.GP 904).

Specifika odběru:

V případě odběru mimo genetickou ambulanci (domácí prostředí) je nutno biologický materiál **doručit do jedné hodiny** na Genetické pracoviště. Je nutno dodržet požadovanou teplotu transportu vzorku (cca teplota těla).

Požadovaná doba pohlavní abstinence musí být dodržena. V případě nedodržení podmínek odběru je nutno upozornit pracovníka genetické ambulance a odběr za standardních podmínek zopakovat.

Odběr není vhodné provádět při akutním onemocnění vyšetřovaného muže (např. antibiotická léčba).

Odebraný biologický materiál je nutno předat **osobně** sestře na recepci genetické ambulance (ejakulát **nelze přijmout** od jiné osoby).

6.6.8 Odběr slizničního stěru z dutiny ústní (bukální stěr)

Před odběrem bukálního stěru je nutné 15 min nepít, nejíst a nežvýkat. Odběr provádí sestra, kdy pacientovi vyčte sliznice dutiny ústní sterilním kartáčkem či výtěrkou (např. Dispolab) a výtěr vloží do označené zkumavky.

V rámci Genetického pracoviště je pacient předem objednan na naší ambulanci.

Specifika odběru:

Materiál je možno uchovávat v lednici při teplotě 2 – 8° C, poté je nutno skladovat v mrazáku při teplotě -18° až -22° C.

6.6.9 Protokolární odběr k DNA paternitní expertize s posudkem soudního znalce

Protokolární odběr probíhá za přítomnosti soudního znalce a jednoho svědka a 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 otisk pravého palce
- 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, otisky palců a dále prohlášení domnělého otce a matky:
 - prohlášení o správném označení odebraného vzorku
 - prohlášení o správnosti uvedené totožnosti
 - prohlášení 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 expertizy
 - souhlas či nesouhlas s uchováváním nespotřebovaných vzorků DNA v DNA bance Genetika Plzeň, s.r.o.

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.

Do protokolu se dále zaznamenává, kdo provedl odběr a kdo byl přítomen jako svědek, včetně všech podpisů zúčastněných.

Specifika odběru:

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

6.6.10 Odběr ovulačního sekretu (hlenu)

Před odběrem je nutný pohlavní styk pouze za použití kondomu od skončení poslední menstruace. Ovulační sekret odebíráme obvyklým lékařským postupem do sterilních kapilár pomocí vakuované stříkačky v gynekologické poloze v ambulanci reprodukční imunologie. Jeho množství závisí na aktuální hormonální hladině.

Specifika odběru:

Odebraný ovulační sekret je z ambulance Genetického pracoviště ihned předán do laboratoře ke zpracování.

6.7 Odběr primárního vzorku

Většina odběrů pro genetická vyšetření se provádí ambulantně.

Po invazivních odběrech pro prenatální vyšetření se nedoporučuje fyzická námaha a těhotné ženě je doporučen klidový režim. Před odběrem plodové vody/choriových klků podepisují pacientky, popř. zákonný zástupce, **Souhlas s provedením amniocentézy/choriových klků** (F.GP 917).

Specifika odběrů biologického materiálu před plánovaným genetickým vyšetřením jsou uvedena u konkrétních odběrů v kapitole 6.4. Při odběru biologického materiálu ke genetickému vyšetření podepisuje pacient souhlas případně nesouhlas s genetickým vyšetřením viz kap. 5.

6.8 Transport a manipulace s biologickým materiálem (se vzorky)

Informace k dopravě:

- za zajištění transportu a zajištění bezpečnosti přepravce (vhodný způsob balení a označení) vždy odpovídá lékař požadující vyšetření,
- doprava materiálu má být šetrná, rychlá a musí být dodržovány specifické podmínky – uvedené v rámci kapitoly (5.4), zejména dodržení času 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),
- průvodky musí být umístěny v samostatném obalu, např. v igelitovém sáčku tak, aby nemohlo při náhodném vylití biologického materiálu dojít k jejich potřísnění,
- při transportu je důležité chránit biologický materiál před extrémní teplotou a světlem,
- je nutné zabránit zmrznutí nebo přehřátí, aby se uchovala schopnost kultivace buněk a růstu in vitro,
- v případě, že nelze přepravit materiál ihned po odebrání uchováme jej v lednici při 2 – 8 °C.

Upozornění:

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

7. Příjem vzorků do laboratoře

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

Po provedené kontrole je vzorek a průvodka označena přiřazeným laboratorním číslem a je zapsána dle požadovaného vyšetření do záznamu o příjmu laboratoří s uvedením:

- data a času příjmu, požadavky, identifikace pracovníka, který vzorek přijal
- jméno, příjmení a rok narození pacienta
- laboratorní číslo na požadovaná vyšetření

Vždy je zajištěna dohledatelnost veškerých informací souvisejících s příjmem vzorku. Laboratorní číslo se přiřazuje nezaměnitelně jednotlivému biologickému materiálu dle interních pravidel laboratoře.

Označení požadavku:

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

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

Příjem biologického materiálu probíhá po celou pracovní dobu laboratoře.

V případě zjištěné neshody mezi průvodkou a materiálem, pracovník přijímající materiál postupuje dle kap. 7.2.

7.1 Důvody odmítnutí vzorků pro zpracování

Odmítnout lze:

- průvodku s biologickým materiálem, na které chybí nebo jsou nečitelné základní údaje (viz Průvodka na lab. vyšetření)
- průvodku nebo odběrovou nádobu znečištěnou biologickým materiálem
- nedostatečné množství biologického materiálu nutného pro zpracování (např. z důvodu rozlití či rozbití během transportu)
- 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 (kapitola 6.2)
- nádobu s biologickým materiálem, kde zjevně došlo k porušení doporučení „fáze před vyšetřením“ (výsledky vyšetření by byly negativně ovlivněny kvalitou materiálu – například nedodržení času pro zpracování spermiogramu, nevhodná odběrová nádoba)
- biologický materiál bez průvodky (bez uvedení požadavků oprávněné osoby)
- průvodku dospělého pacienta od zdravotnického subjektu s odborností pediatrie (pokud nemá zároveň odbornost lékařská genetika), průvodku muže od subjektu s odborností gynekologie, pokud není souvislost s diagnózou partnerky, průvodku ambulantního pacienta od subjektu s odborností lůžkového oddělení

7.2 Způsob řešení neshod na příjmu materiálu

- **Neúplnost údajů na průvodce** – ihned se komunikuje se žadatelem o vyšetření a zajistí se veškeré informace pro možnost zpracování materiálu a uvolnění výsledků.
- Pokud je **dodán materiál bez průvodky**, nebo není jednoznačně identifikovaný a jedná se o nenahraditelný vzorek (například potracená tkáň) laboratoř začne tento materiál vždy zpracovávat, ale výsledky nebudou uvolněny, dokud žadající lékař nebo osoba odebírající materiál nepřevzme odpovědnost za doplnění správných identifikačních údajů. Laborantka Genetického pracoviště doplní informace do záznamu o neshodě.
- V případě **chybějící dokumentace** je externí žadatel požádán o zaslání příslušné průvodky.

- V případě, že **vzorek nelze zpracovat** (znehodnocen, porušení fáze před vyšetřením, neoprávněný požadavek, nedostatečné množství) je zapsán do záznamu o neshodě. Pracovník laboratoře informuje telefonicky žadatele a požádá o nový odběr.

Výše uvedené neshody jsou pracovníkem laboratoře evidovány jako neshoda v příslušném záznamu.

8. Fáze po laboratorním vyšetření

8.1 Bezpečné odstraňování materiálů použitých při odběru

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

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

Skladování laboratorních vzorků a používaného materiálu probíhá v souladu dle ustanovení vyhlášky č. 306/2021 Sb. ve znění pozdějších předpisů.

8.2 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 uchovávan dle podmínek uvedených v jednotlivých standardních operačních postupech pro vyšetření a tak, aby nedošlo k jeho znehodnocení.

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

8.2.1 Skladování před a v průběhu vlastního vyšetření

V průběhu vyšetření až do doby vydání výsledků se část biologického materiálu skladuje v lednici nebo mrazáku. Bukální stěry před vlastním vyšetřením jsou uloženy 7 dní v lednici a v případě dalšího uchovávání jsou uloženy v mrazáku.

Konkrétní specifika jsou uváděna dle potřeby v standardních operačních postupech pro dané vyšetření.

8.2.2 Skladování po vyšetření

Materiál může být použit pro opakovanou kultivaci nebo dodatečná vyšetření.

8.2.2.1 Primární vzorky

primární vzorky	způsob a lhůta uchovávání
plodová voda	dále se neuchovává, vzorek je zpracován celý
periferní krev	po dobu zpracování, až do doby vydání výsledku cca 28 dnů v lednici (2 – 8 °C)
ovulační hlen	po dobu zpracování, až do doby vydání výsledku cca 28 dnů, v mrazáku, při -20 °C (-18° až -22° C)
ejakulát	po provedeném vyšetření je zlikvidován
choriové klky	dále se neuchovává, vzorek je zpracován celý
potracená tkáň	po dobu zpracování, až do doby vydání výsledku cca 28 dnů v lednici (2 – 8 °C)
bukální stěr	dále se neuchovává, vzorek je zpracován celý

Po vydání výsledků jsou primární vzorky likvidovány jako nebezpečný odpad a pro další možná dovyšetření je uchovávan zpracovaný vzorek po níže definovanou dobu.

8.2.2.2 Sekundární vzorky

sekundární vzorky	způsob a lhůta uchovávání
izolovaná DNA	uchovávána v mrazáku, při -20 °C (-18° až -22° C) se souhlasem pacienta, po dobu minimálně 5 let V případě nesouhlasu pacienta s uchováváním jeho DNA je skartován identifikační štítek a DNA je likvidována jako infekční odpad.
embryonální DNA po celogenomové amplifikaci	při < -15 °C se souhlasem pacienta, po dobu minimálně 5 let

sekundární vzorky	způsob a lhůta uchování
suspenze (suspenze kultivovaných lymfocytů)	v mrazáku, po dobu minimálně 1 měsíce
fluorescenční značený PCR amplifikát	na tmavém místě v lednici do vydání výsledků
sérum z periferní krve	v mrazáku, při -20 ° C (-18° až -22° C), po dobu 2 let

8.2.2.3 Trvalé preparáty

trvalé preparáty	způsob a lhůta uchování
patologické	10 let v histologických platech (sklad), při pokojové teplotě
normální	10 let v histologických platech (sklad), při pokojové teplotě

8.3 Dodatečná vyšetření a časový interval pro jejich požadování

Dodatečná vyšetření jsou limitována vlastností, množstvím a uchováním zpracovávaného biologického materiálu.

Dodatečná vyšetření nelze provést u ejakulátu a choriových klků.

U plodové vody je požadavek na dovyšetření možné žádat do doby vydání výsledků. V případě vzorku periferní krve je možné dodatečně požadovaná vyšetření provést z opakované kultivace.

Kvalita případného dalšího opakovaného vyšetření nebo dovyšetření může být ovlivněna dobou a metodou skladování, která je uvedena výše. Dodatečná vyšetření je možné požadovat telefonicky, ale externí žadatel vždy dodá průvodku k požadovanému dovyšetření. V případě, že pro konečné vydání výsledků je nutné dovyšetření nebo případný nový odběr biologického materiálu komunikuje s žadatelem o vyšetření vedoucí laboratoře nebo vedoucí úseku.

8.4 Opakování vyšetření stejného primárního vzorku

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

9. Vydávání výsledků a komunikace s laboratoři

9.1 Informace o formách vydávání výsledků

V laboratoři jsou výsledkové zprávy vydávány vždy v písemné podobě. Distribuce je zajištěna prostřednictvím:

- pošty
- svozová služba
- zabezpečeného úložiště (pouze pro spolupracující zdravotnická zařízení)
- osobně v rámci Genetického pracoviště

Dále je možné distribuovat výsledek vyšetření telefonicky v případě:

- nebezpečí z prodlení, řešení nějakého vzniklého problému, k zajištění potřebných chybějících informací apod.

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

Před vydáním jsou všechny výsledky kontrolovány dvěma pracovníky a podepsány oprávněným pracovníkem.

Interpretaci výsledků provádí vždy lékař (genetik nebo imunolog).

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

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

9.2 Změny výsledků a nálezů

Ke změně výsledků by nemělo docházet. Pokud by k němu došlo je zaznamenán datum a jméno osoby, která změnu dodatečně provedla. V případě, že laboratoř zjistí chybně vydaný nález, komunikuje s žadatelem vždy vedoucí Genetického pracoviště nebo vedoucí laboratoře nebo vedoucí sekce.

Žadateli o vyšetření (ošetřujícímu lékaři) je dodán nový výsledkový list se správnými výsledky.

9.3 Intervaly dodání vzorků k vydání výsledků

Vzorky jsou průběžně zpracovávány podle požadovaného vyšetření v pořadí, ve kterém jsou přijímány do laboratoře, s výjimkou urgentních vzorků, které jsou zpracovávány přednostně.

Doba požadovaného vyšetření od příjmu vzorku do vydání závěrečné zprávy pro nabízené diagnózy, při běžném provozu by neměla přesáhnout časové intervaly uvedené níže:

Sekce cytogenetiky (CG)

- chromozomální vyšetření plodové vody/choriových klků (karyotyp, FISH, aCGH): 14 dní
- chromozomální vyšetření periferní krve (karyotyp, FISH, aCGH): 28 dní
 - STATIM (karyotyp, FISH): 7 dní
 - STATIM (aCGH): 10 dní
- vyšetření potrácené tkáně (aCGH): 28 dní

Sekce reprodukční imunologie (RI)

- spermioqram: do 2 hodin
- kompletní imunologická vyšetření: 28 dní

Sekce reprodukční genetiky (RG)

- preimplantační genetické vyšetření metodou masivně paralelního sekvenování:

21 dní (u kumulačních cyklů se doba odezvy počítá od přijetí poslední sady vzorků do laboratoře; v případě dodatečného vyšetření přijetím požadavku na vyšetření uloženého vzorku)

Sekce molekulární genetiky (MG)

- **obecně:** 28 dní, pokud není níže stanoveno jinak
- **vyšetření plodové vody/choriových klků (QF PCR):** 4 dny
- **vyšetření potrácené tkáně (QF PCR):** 28 dní
- **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 Genetického pracoviště
- **mutační analýza genů metodou masivně paralelního sekvenování (Onkopanel):** 3 měsíce (závisí na kumulaci vzorků pro naplnění běhu k sekvenování)
- **vyšetření přenašečství pro nejčastější recesivní monogenní onemocnění – Carrier screening:** 30 dnů

9.4 Konzultační činnost laboratoře

Lékařům a žadatelům o genetická a imunologická vyšetření jsou poskytovány konzultace a návody v odborné oblasti související s laboratorními vyšetřeními. Kontakty jsou uvedeny v kap. 2.

9.5 Řešení stížností

Stížnost lékaře, pacienta a ostatních účastníků je podnětem pro zlepšení práce na Genetickém pracovišti a zabýváme se prošetřením každé uplatněné stížnosti.

Postup pro přijetí a vyřizování stížností je zveřejněn na webových stránkách <https://www.genetika-plzen.cz/postup-pro-vyrizovani-stiznosti-genetika-plzen>.

9.6 Obecné zásady laboratoře na ochranu osobních údajů

Laboratoř se zavazuje, že v souladu s ustanoveními NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (EU) 2016/679 ze dne 27. dubna 2016 o ochraně fyzických osob v souvislosti se zpracováním osobních údajů a o volném pohybu těchto údajů a o zrušení směrnice 95/46/ES (obecné nařízení o ochraně osobních údajů), zákona č. 110/2019 Sb., o zpracování osobních údajů, a ust. § 51 a násl. zákona č. 372/2011 Sb., o zdravotnických službách, v platném znění, bude odborně nakládat se všemi citlivými údaji a zachovávat bezvýhradně mlčenlivost o všech informacích týkajících se vyšetření a laboratorních výsledků pacienta v rozsahu platných právních předpisů.

Laboratoř nakládá s osobními a citlivými údaji pacientů tak, aby nemohlo dojít k jejich neoprávněnému přístupu, změně nebo zneužití.

Obecné zásady pro ochranu osobních údajů:

A. Organizační opatření:

- Osobní a citlivá data pacientů jsou vedena v listinné formě v příručních spisovných a v elektronické formě v programu Envis LIMS/IS Medicalc.
- Listinná forma záznamu je zabezpečena uzamčením vstupu do genetické laboratoře a řízením vstupu cizích osob. Pro zabezpečení dat v Envis LIMS/IS Medicalc mají pracovníci přidělena přístupová práva s ohledem na jejich kompetence.
- Pracovníci mají ve své pracovní náplni podepsanou mlčenlivost a jsou seznámeni prokazatelně s vnitřními předpisy, ve kterých jsou stanovena pravidla pro nakládání s osobními údaji.

B. Technická opatření:

- Technická opatření jsou stanovena na úrovni mechanického zabránění přístupu neoprávněných osob do míst, kde je uložena zdravotnická dokumentace. Jedná se o řízený vstup do genetické laboratoře.
- Zdravotnická dokumentace uložená v programu Envis LIMS/IS Medicalc je v době nepřítomnosti zdravotnického pracovníka chráněna heslem pro vstup do PC a systému Envis LIMS/IS Medicalc. Každý pracovník má přidělený rozsah oprávnění pro přístup do Envis LIMS/IS Medicalc.

10. Související dokumentace

10.1 Informované souhlasy

Souhlas vyšetřované/ho (zákonného zástupce) s genetickým laboratorním vyšetřením (F.GP 901)

Nesouhlas vyšetřované osoby (zákonného zástupce) s genetickým laboratorním vyšetřením – negativní revers (F.GP 902)

Poučení pro pacienty před odběrem ejakulátu v genetické ambulanci (F.GP 903)

Poučení pro pacienty před odběrem ejakulátu mimo Genetické pracoviště (F.GP 904)

Poučení a informovaný souhlas s PGT (F.GP 907)

Souhlas se skladování po PGT (F.GP 908)

Informovaný souhlas s genetickým testem NIPT kitem Panorama (F.GP 914)

Informovaný souhlas s invazivním prenatalním vyšetřením - amniocentéza, biopsie choriových klků (F.GP 917)

10.2 Průvodky

Žádanka o preimplantační genetické vyšetření (PGT) (F.GP 906)

Průvodka na cytogenetické vyšetření (F.GP 910)

Průvodka na molekulárně-genetické vyšetření (F.GP 911)

Průvodka na imunologické vyšetření (F.GP 912)

Screening vrozených vývojových vad (F.GP 913)

10.3 Další související dokumentace

VD.GP 05 Laboratorní příručka PGT

10.4 Přílohy

--