Genetika Plzeň, s.r.o.
Parková 1254/11a, Černice, 326 00 Plzeň
IČO: 26357623
Člen Skupiny Next Clinics

Laboratorní příručka

Platnost dokumentu:	**25. března 2026**
Datum vypracování:	3. března 2026
Datum schválení:	24. března 2026
Vypracoval:	Bc. Adéla Nováková
Schválil, podpis:	Mgr. Sabina Planetová
Garant dokumentu:	Mgr. Sabina Planetová
Verze:	**010**
Identifikace dokumentu:	**VD.GP 04**
Typ dokumentu:	**Veřejný**
Výtisk č.:	
Ostatní informace:	Nahrazuje verzi 009 platnou od 03.11.2025. Změny: Aktualizace odkazů; Změny v kap. 6.1.3.10, 6.1.4.2, 8.2.2.1, 8.3, 9.1, 9.3; Nová kap. 6.1.4.3.

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
   2.3 Řízení rizik ... 6
3. Terminologie, definice, zkratky ... 7
4. Zaměření laboratoře a spektrum nabízených služeb ... 8
   4.1 Seznam nabízených laboratorních vyšetření ... 8
   4.2 Smluvní laboratoře ... 8
5. Prohlášení o souhlasu ... 9
6. Manuál pro odběr primárních vzorků ... 10
   6.1 Základní informace pro uživatele laboratorních služeb Genetické laboratoře ... 10
      6.1.1 Cytogenetické metody ... 10
         6.1.1.1 Chromozomální vyšetření ... 10
      6.1.2 Molekulárně-cytogenetické metody ... 11
         6.1.2.1 FISH vyšetření ... 11
         6.1.2.2 Vyšetření metodou array CGH ... 12
      6.1.3 Molekulárně-genetické metody ... 13
         6.1.3.1 QF PCR vyšetření ... 13
         6.1.3.2 Vyšetření mutací v CFTR genu pro cystickou fibrózu ... 13
         6.1.3.3 Vyšetření nejčastějších mikrodelecí AZF oblasti na Y chromozomu ... 14
         6.1.3.4 Vyšetření na přítomnost trombofilních variant ... 14
         6.1.3.5 Vyšetření mutace 35delG, W24X v genu pro connexin 26 ... 14
         6.1.3.6 DNA určování otcovství pomocí STR markerů ... 14
         6.1.3.7 DNA vyšetření predispozičních alel k celiakii ... 15
         6.1.3.8 DNA vyšetření alely HLA-B27 ... 15
         6.1.3.9 Vyšetření syndromu fragilního X chromozomu – FRAXA ... 15
         6.1.3.10 Mutační analýza genů metodou Sangerova sekvenování ... 16
         6.1.3.11 Vyšetření mutace (c.657-661del5) genu NBN ... 16
         6.1.3.12 Vyšetření mutací zodpovědných za hemochromatózu ... 16
         6.1.3.13 Molekulárně-genetické vyšetření Gilbertova syndromu ... 16
         6.1.3.14 Vyšetření mutace zodpovědné za laktózovou intoleranci ... 17
         6.1.3.15 Neinvazivní prenatální vyšetření (NIPT) chromozomů pomocí masivně paralelního sekvenování 17
         6.1.3.16 Mutační analýza genů metodou masivně paralelního sekvenování ... 17
         6.1.3.17 Vyšetření delecí či duplikací metodou MLPA s následnou fragmentační analýzou 18
      6.1.4 Metody reprodukční genetiky ... 19
         6.1.4.1 Vyšetření přenašečství pro nejčastější recesivní monogenní onemocnění – Carrier screening 19
         6.1.4.2 Preimplantační genetické vyšetření chromozomových aberací (PGT-A, PGT-SR) metodou masivně paralelního sekvenování ... 19
         6.1.4.3 Vyšetření přítomnosti genů KIR a stanovení haplotypů KIR-A, KIR-B ... 20
      6.1.5 Metody reprodukční imunologie ... 21
         6.1.5.1 Vyšetření protilátek proti fosfolipidům ... 21
         6.1.5.2 Vyšetření antiovariálních a antizonálních protilátek ... 21
         6.1.5.3 Vyšetření antispermatozoidálních protilátek ... 21
         6.1.5.4 Vyšetření intraakrozomálních enzymů ... 22
         6.1.5.5 Průnik spermií ovulačním hlenem penetrační metodou (Kremerův test) ... 22

6.1.5.6 Vyšetření spermiogramu ... 22
6.1.5.7 Vyšetření oxidačního stresu spermií ... 23
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 ... 25
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) ... 28
6.7 Odběr primárního vzorku ... 28
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 ... 32
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, na kterých jsou uživatelé laboratorních služeb informováni o změnách a aktualizacích.

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 Next Clinics 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:	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:	+420 377 241 529, +420 377 452 322

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

Detašované pracoviště:	**Detašované pracoviště Plzeň, Rejskova**
Adresa pracoviště:	Rejskova 855/10, 326 00 Plzeň
Vedoucí pracoviště:	Mgr. Michaela Nečesánková, Ph.D.

Genetickou laboratoř tvoří 4 samostatné odborné sekce:

- **Sekce cytogenetiky**
  Vedoucí sekce: Mgr. Sabina Planetová
  +420 604 106 586
  sabina.planetova@next-clinics.com

- **Sekce reprodukční imunologie**
  Vedoucí sekce: Prof. MUDr. Zdeňka Ulčová-Gallová, DrSc.
  +420 720 973 820
  zdenka.ulcova-gallova@next-clinics.com

- **Sekce reprodukční genetiky**
  Vedoucí sekce: RNDr. Martina Hrubá, Ph.D.
  +420 605 179 548
  martina.hruba@next-clinics.com

- **Sekce molekulární genetiky**
  Vedoucí sekce: Mgr. Michaela Nečesánková, Ph.D.
  731 433 571, 731 433 596
  michaela.necesankova@next-clinics.com

Soudní znalec: Ing. Ivana Vobrubová
+420 601 083 734
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 ed. 3:2033 - Zdravotnické laboratoře – Požadavky na kvalitu a kompetence pod číslem 8034. Rozsah akreditace je veden a aktualizován na webových stránkách v Seznamu činností v rámci flexibilního rozsahu akreditace.

Dále má povolení činnosti diagnostické laboratoře od Státního ústavu pro kontrolu léčiv.

2.3 Řízení rizik

Zbytková rizika, která mohou mít dopad na péči o pacienta, jsou sdělována klinickým žadatelům prostřednictvím:

- komentář na výsledkovém listu, např z důvodu kvality vzorku,
- telefonicky, např. z důvodu nedodání kompletní dokumentace se vzorkem,
- telefonicky/písemně, např. z důvodu nedodržení nebo výrazného prodloužení doby odezvy,
- telefonicky/písemně/na webových stránkách, např. z důvodu výpadku provozu laboratoře.

3. Terminologie, definice, zkratky

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

4. Zaměření laboratoře a spektrum nabízených služeb

Genetická laboratoř je členěna na 4 samostatné odborné sekce:

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

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

- plodové vody
- periferní krve (včetně séra)
- fetální krve
- slizničního stěru z dutiny ústní (bukálního stěru)
- potracené tkáně
- choriových klků
- blastomer
- ejakulátu
- ovulačního hlenu (sekretu)
- buněk trofoektodermu

Přehled prováděných vyšetření je uveden v kap. 6.1 tohoto dokumentu.

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

Konkrétní seznam nabízených laboratorních vyšetření včetně základních informací je uveden v kap. 6.1.

4.2 Smluvní laboratoře

Genetická laboratoř spolupracuje s akreditovanými laboratořemi ve smyslu výpomoci v kritických situacích, ke konzultacím a k vyšetřením, která naše laboratoř neprovádí. Jedná se především o laboratoře:

- Bioptická laboratoř s.r.o.
- Centrum lékařské genetiky s.r.o.
- FertiCare SE
- NL – BioLAB s.r.o.
- REPROMEDA s.r.o.
- UK Lékařská fakulta v Plzni – Biomedicínské centrum
- Ústav biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN Motol
- Všeobecná fakultní nemocnice v Praze

Dopravu zajišťuje odesílající laboratoř. Výsledek vyšetření je uveden na výsledkovém listu smluvní laboratoře nebo na výsledkovém listu Genetické laboratoře, kde je jasně uvedeno, která laboratorní vyšetření byla provedena smluvní laboratoři.

5. Prohlášení o souhlasu

Pacient je vždy seznámen s účelem, povahou a důsledkem prováděného vyšetření. Svým podpisem stvrzuje, že souhlasí s odběrem, genetickým vyšetřením a případným uchováváním 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 ztvrzuje, 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 žádající užívá vlastní souhlas s PGT) – podrobněji viz VD.GP 05 Laboratorní příručka PGT
- Informovaný souhlas s genetickým testem NIPT kitem Panorama (F.GP 914)
- Informovaný souhlas s invazivním prenatálním vyšetřením – amniocentéza, biopsie choriových klků (F.GP 917)

Souhlasy najdete na webových stránkách Dokumenty ke stažení.

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**.

Žádající 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 alfa-fetoproteinu 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 stimulujeme 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 potracené tkáně

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

Indikace k vyšetření:

- stanovení karyotypu potraceného plodu
- vyloučení vrozené chromozomové aberace u plodu
- odběr se neprovádí po transfuzi, 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 rozborem. V některých případech může FISH analýza nahradit běžný cytogenetický rozbor (selhání kultivace, časový stres).
- Metoda FISH se dále používá u některých případů preimplantační genetické diagnostiky. Vyšetřením 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 chromozomů neznámého původu

- **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

6.1.2.2 Vyšetření metodou array CGH

Array CGH (komparativní genomová hybridizace na čipu) je molekulárně cytogenetické vyšetření celého genomu. Primárně slouží k odhalení nebalancovaných aberací (ztrát a zisků sekvencí), jejichž přítomnost v genomu není předem známá. 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 bodové mutace, balancované chromosomální aberace, nízkofrekvenční mozaika, uniparentální disomie a triploidie/polyploidie.

Kombinovaný čip oligonukleotidových a SNP sond umožňuje zároveň detekovat místa v genomu s úplnou nebo parciální ztrátou heterozygozity.

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. U prenatálních vyšetření je, po metodě QF PCR, metodou první volby.

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, kvalita DNA

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

Vyšetření metodou QF PCR slouží jako rychlá diagnostika aneuploidií a uniparentální dizomie autozomálních chromozomů a pohlavních chromozomů. 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 68 mutací CFTR genu a stanovení polymorfismu v intronu 8 (Tn varianty) pomocí kitu Devyser Core nebo Devyser 68.

Vyšetřované mutace představují 96 % všech mutací CTFR genu v české populaci. Jejich vyloučením se snižuje pravděpodobnost nosičství mutace v CFTR genu na 1:847 (0,118 %).

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
- prenatální 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 mikrodelecí 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 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 plánovaných 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® Identifiler® 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

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 predispozičnách 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

Vyšetření se provádí za účelem detekce alely HLA- B27.

Alela HLA-B27 je asociována s ankylozující spondylitidou a spondyloarthropatií. 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 chromozomu – FRAXA

PCR vyšetření ke stanovení počtu opakování CGG repetice v genu FMR1. Syndrom fragilního X chromozomu 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 ovariální selhání
- presenilní tremor u mužů

Negativní faktory ovlivňující výsledky vyšetření:

- špatná kvalita primárního vzorku

6.1.3.10 Mutační analýza genů metodou Sangerova sekvenování

Detekce známé mutace v rodině nebo ověření nálezu ze sekvenování nové generace, genotypizace HLA-C s určením KIR-vazebných epitopů C1/C2.

Negativní faktory ovlivňující výsledky vyšetření:

- špatná kvalita primárního vzorku

6.1.3.11 Vyšetření mutace (c.657-661del5) genu NBN

Vyšetření se provádí za účelem detekce mutace (c.657-661del5) v genu NBN.

Tato mutace v homozygotním stavu je zodpovědná za Nijmegen breakage syndrome (NBS). NBS je vzácné autozomálně recesivní onemocnění, častěji se vyskytující u slovanské populace. Jedná se o syndrom instability chromozomů s mikrocefalií, růstovou retardací, imunodeficiencí a predispozicí k malignitám.

Pacienti s NBS jsou hypersenzitivní vůči ionizačnímu záření.

Frekvence nosičů této mutace u slovanské populace je uváděna 1:100-150.

Indikace k vyšetření:

- vhodné pro pacienty s klinickými projevy mikrocefalie, instability chromozomů, růstové retardace, zvýšené četnosti malignit v rodinné anamnéze
- vhodné je testování u pracovníků na rizikových pracovištích (RTG)

Negativní faktory ovlivňující výsledky vyšetření:

- špatná kvalita primárního vzorku

6.1.3.12 Vyšetření mutací zodpovědných za hemochromatózu

Hemochromatóza je porucha ukládání železa, která má za následek jeho ukládání v parenchymálních buňkách. Jak onemocnění postupuje, vede to k rozsáhlému poškození tkáně, diabetu mellitu, cirhóze jater, hepatocelulárnímu karcinomu, srdečnímu selhání, artritidě a pigmentaci. První příznaky se často objevují mezi 40. a 50. rokem. Jedná se o autozomálně recesivní poruchu.

Detekujeme nejčastější mutace 845G>A (C282Y) a 187C>G (H63D) v lidském genu HFE pomocí alelově specifické PCR. Test je schopen zachytit jak asymptomatické přenašeče (heterozygoty), tak postižené jedince (homozygoty).

Indikace k vyšetření:

- fibróza až cirhóza jater
- kardiomyopatie
- pankreopatie
- diabetes
- artropatie
- pigmentace kůže

Negativní faktory ovlivňující výsledky vyšetření:

- špatná kvalita primárního vzorku

6.1.3.13 Molekulárně-genetické vyšetření Gilbertova syndromu

Gilbertův syndrom je způsoben poruchou činnosti UDP-glukuronyltransferázy 1A1, sníženou na 20-30 % u postižených homozygotů. Projevuje se nejčastěji mírnou hyperbilirubinemií bez známek jaterního onemocnění či hyperhemolýzy. Onemocnění je považováno za málo závažné. Nejčastěji (nad 90 % případů) je příčinou navýšení počtu TA opakování v promotorovém TATA boxu UGT1A1 genu z 6 na 7.

Analýza se provádí pomocí PCR s fluorescenčně značenými primery s následnou detekcí na kapilární elektroforéze. V případě nalezení homozygotního výsledku 7TA/7TA potvrzujeme Gilbertův syndrom, v ostatních případech se nelze spolehlivě vyjádřit.

Indikace k vyšetření:

- izolovaná mírná hyperbilirubinemie (podezření na Gilbertův syndrom)
- u příbuzných s prokázaným Gilbertovým syndromem
- před nasazením irinotecanu

Negativní faktory ovlivňující výsledky vyšetření:

- špatná kvalita primárního vzorku

6.1.3.14 Vyšetření mutace zodpovědné za laktózovou intoleranci

Jako u všech savců, je i u člověka schopnost trávit laktózu největší v kojeneckém věku a s přibývajícím věkem klesá. Dospělý člověk ve srovnání s kojencem produkuje pouze desetinu laktázy a většina lidí ve věku 60 let už laktózu vůbec nestráví. Odhadem 75 – 80 % světové populace je v dospělosti intolerantní na laktózu. Nejčastějšími příznaky jsou poruchy trávení laktózy, plynatost, abdominální distenze a průjem. Laktózová intolerance se liší u etnických skupin, přičemž u evropské populace se pohybuje okolo 30 %. Vyšetřuje se varianta -13910T v promotorové oblasti genu LCT.

Test je schopen zachytit jak asymptomatické přenašeče (heterozygoty), tak postižené jedince (homozygoty).

Indikace k vyšetření:

- gastrointestinální obtíže po konzumaci potravin s obsahem laktózy
- odlišení primárního typu deficitu laktázy od sekundárního typu
- patologický laktózový toleranční test nebo pozitivní H2 dechový test
- osteoporóza

Negativní faktory ovlivňující výsledky vyšetření:

- špatná kvalita primárního vzorku

6.1.3.15 Neinvazivní prenatální vyšetření (NIPT) chromozomů pomocí masivně paralelního sekvenování

Neinvazivní prenatální vyšetření (NIPT) je vyšetření nejčastějších aneuploidií plodu z krve matky. Využívá se volná DNA (směs volné DNA matky a plodu) izolovaná z plazmy. Používáme test Panorama (firma Natera), založený na cíleném SNP sekvenování, který mu umožní odlišit volnou DNA plodu a volnou DNA matky. Panorama test vykazuje vysokou senzitivitu pro trizomie chromozomu 21 (99,9 %), 13 (99 %),18 (96,4 %) a pohlavních chromozomů (99 %), i pro monozomii chromozomu X (92,9 %). Zároveň umí detekovat syndrom mizejícího dvojčete a triploidii.

Indikace k vyšetření:

1. Zvýšené genetické riziko výskytu chromozomální aberace pro plod (chromozomy 21,18, 13, X, Y)
2. Normální ultrazvukový nález při pozitivním /hraničním/atypickém screeningu
3. Zvýšené riziko komplikací při provedení invazivní diagnostiky (CVS/AMC) při zvýšeném genetickém riziku
4. Vyšší věk těhotné (nad 38 let)
5. Těhotenství po IVF, dysfertilitě nebo léčené sterilitě

Negativní faktory ovlivňující výsledky vyšetření:

- špatná kvalita primárního vzorku

6.1.3.16 Mutační analýza genů metodou masivně paralelního sekvenování

6.1.3.16.1 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. Asymptomatičtí nosiči mutace jsou zařazeni do dispenzarizačního programu, který slouží k včasnému záchytu 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 ovarií/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)
  - Unilaterární 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 kriteria I, II; Bethesda kriteria)
- 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/slovnik/revidovana-kriteria-Bethesda.php)

Negativní faktory ovlivňující výsledky vyšetření:

- špatná kvalita primárního vzorku

6.1.3.17 Vyšetření delecí či duplikací metodou MLPA s následnou fragmentační analýzou

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 ovárií, 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:

- symptomatičtí jedinci se suspektní diagnózou SMA
- asymptomatičtí 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 genetiky

6.1.4.1 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 chromozomu 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.** Pro seznam vyšetřovaných genů a onemocnění, viz Carrier screening – Seznam vyšetřených onemocnění. Do testu jsou zahrnuty i genové varianty, které mohou souviset s poruchami reprodukce, včetně vrozených trombofilních stavů, viz Seznam vyšetřených genových variant.

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

6.1.4.2 Preimplantační genetické vyšetření chromozomových aberací (PGT-A, PGT-SR) metodou masivně paralelního sekvenování

Abnormální počet chromozomů (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 chromozomů (euploidních) pro implantaci. Bioptované buňky jednotlivých embryí jsou podrobené celogenomové sekvenační analýze kitem VeriSeq (Illumina) a vyhodnocené na přítomnost nebalancovaných aberací u všech 24 chromozomů, tzv. preimplantační genetické testování aneuploidií (PGT-A) nebo nebalancovaných forem familiárních chromozomových přestaveb (PGT-SR). Embrya s normálním chromozomálním 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 chromozomové přestavby (obvykle translokace) u jednoho nebo obou partnerů
- Přítomnost početních změn pohlavních chromozomů (gonozomů), 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 chromozomovou 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

Negativní faktory ovlivňující výsledky vyšetření:

- špatná kvalita embryí
- špatná kvalita bioptovaných buněk trofoblastu
- nevhodně zvolené odběrové médium
- nevhodná metoda/proces biopsie

6.1.4.3 Vyšetření přítomnosti genů KIR a stanovení haplotypů KIR-A, KIR-B

Vyšetření přítomnosti genů KIR a stanovení KIR haplotypů je doplňkové vyšetření v oblasti reprodukční genetiky. Umožňuje u ženy odhalit nepříznivou kombinaci haplotypů AA, která může být příčinou opakovaných selhání implantace po IVF, opakovaných časných spontánních potratů, příp. intrauterrní růstové retardace či preeklampsie. V případě nálezu kombinace haplotypů AA u partnerky následuje vyšetření genu HLA-C partnera, popř. dárců gamet, s cílem určit KIR-vazebné epitopy C1/C2 (sekvenováním dle Sangera, viz 6.1.3.10).

Vyšetření je prováděno metodou alelově specifické PCR. Tato metoda je založena na přesné shodě 3´ konců obou primerů se sekvencí templátové DNA, která je charakteristická pro určitý/é KIR gen/y (resp. jejich alelu/y). Pokud v průběhu PCR dochází ke vzniku produktu, znamená to přítomnost dané sekvenční varianty (odpovídající určité alele KIR genu/ genů) ve vyšetřovaném vzorku. Podle přítomnosti KIR genů (resp. jejich alel) je u vyšetřované osoby - pacientky se suspektní poruchou placentace - určena výsledná kombinace KIR haplotypů (A/A, A/B, B/B).

Indikace k vyšetření:

- opakované potrácení
- opakované selhání implantace po předchozích embryotransferech

Negativní faktory ovlivňující výsledky vyšetření:

- nevhodný odběr primárního vzorku
- nevhodná metoda izolace DNA

6.1.5 Metody reprodukční imunologie

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

Negativní faktory ovlivňující výsledky imunologických vyšetření:

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

6.1.5.1 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 kardiolopinu ve třídě IgG, IgM
- protilátky proti annexinu V ve třídě IgG, IgM
- protilátky proti beta2-glykoproteinu I ve třídě IgA, IgG
- protilátky proti fosfatidylserinu ve třídě IgG, IgM
- protilátky proti fosfatidylinositolu ve třídě IgG, IgM
- protilátky proti fosfatidylethanolaminu ve třídě IgG, IgM
- protilátky proti kyselině fosfatidové 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

6.1.5.2 Vyšetření antiovariálních a antizonálních protilátek

Protilátky zaměřené proti antigenům ovária a zona pellucida v séru mohou způsobovat u žen primární i sekundární sterilitu i tím, že nedojde ke splynutí 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

6.1.5.3 Vyšetření antispermatozoidálních protilátek

Protilátky proti spermiím brání přirozené kapacitační a akrozomální reakci spermií, stávají se překážkou pro splynutí spermie s oocytem. Vlastní průnik spermií genitálním traktem ženy bývá narušen přítomnými protilátkami proti spermiím 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

6.1.5.4 Vyšetření intraakrozomálních enzymů

Intraakrozomální enzymy jsou velmi důležité v přímě 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

6.1.5.5 Průnik spermií ovulačním hlenem penetrační metodou (Kremerův test)

Kremerův test patří mezi tradiční, osvědčené testy penetrační (test pronikání) a současně vyhledávácí (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

6.1.5.6 Vyšetření spermiogramu

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

Vyšetřované parametry jsou: objem, pH, přítomnost agregace a aglutinace, doba zkapalnění, viskozita, přítomnost kulatých buněk, koncentrace, celkový počet, pohyblivost a morfologie spermií.

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

6.1.5.7 Vyšetření oxidačního stresu spermií

Vyšetření oxidačního stresu spermií – test MiOXSYS je kvalitativní elektrochemický test, který měří staticky oxidačně-redukční potenciál ve spermiích a seminální plazmě Je výrazem rovnováhy mezi celkovou oxidační a redukční aktivitou vyšetřovaného prostředí.

Zvýšená hodnota znamená riziko patologického vývoje spermií. Vedle viditelného dopadu na tvarové odchylky či sníženou pohyblivost spermií dopadá oxidační poškození i na strukturu DNA se všemi důsledky pro plodnost a vývoj plodu.

Indikace k vyšetření:

- mužská neplodnost
- varikokéla, infekce, zánět
- neúspěšné výsledky při asistované reprodukcí např. opakující se ztráta těhotenství

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 rodném čísle 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 vždy průvodkou v tištěné podobě.

Vzory průvodek jsou uloženy na webových stránkách laboratoře v sekci Dokumenty ke stažení, viz také kap. 10.2 tohoto dokumentu).

Pro vyžádání vyšetření z ambulancí Genetika Plzeň je vhodné využít elektronické průvodky generované ze systému Medicalc; průvodku je však vždy nutné vytisknout a přiložit ke vzorku. Elektronickou průvodku je možné použít pro všechna vyšetření s výjimkou 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

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 a molekulárně-genetického vyšetření. Vzorek bude **přednostně** zpracován a odečten.

Sekce reprodukční imunologie a sekce reprodukční genetiky neprovádí STATIMOVÉ vyšetření.

Samostatnou přílohou jsou průvodky k laboratorním vyšetřením poskytovaných na Genetickém pracovišti a na našich stránkách Dokumenty ke stažení.

6.5 Ústní požadavky na vyšetření

V době, kdy je biologický materiál či primární vzorek uchováván 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 doordinované 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 mediem 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

primární vzorek	odběrový systém	
		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 nádobky 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 objednání 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 objednání 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 odstranil.

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 ºC. Je nutné zabránit zmrznutí nebo přehřátí krve.

Specifika odběru pro metodu NIPT:

Odběr vzorků se provádí do dvou Streck cell-free DNA BCT zkumavek. Po odběru je nutné plné zkumavky 10x obrátit o 180° a skladovat při pokojové teplotě. Vzorek musí do laboratoře Genetiky Plzeň dorazit nepoškozený nejpozději 45 hodin po odběru. 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 (kromě NIPT 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 nádobky s mediem 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 dnech 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 spermiogramy 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 vytře sliznice dutiny ústní sterilním kartáčkem či výtěrkou (např. Dispolab) a výtěr vloží do označené zkumavky.

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

Specifika odběru:

Materiál je možno uchovávat v lednici při teplotě 2 – 8º C, poté je nutno skladovat v mrazáku při teplotě -18º až -22º 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 ºC) 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, zejména dodržen 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),
- 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 ºC.

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 vypsat 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 tohoto dokumentu.

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 (kap. 6.2 tohoto dokumentu).
- 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, doručení zkumavek pro vyšetření NIPT déle než 48 hodin od odběru).
- 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 žádající lékař nebo osoba odebírající materiál nepřevezmou 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 uchováván 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 (EDTA)	po dobu zpracování, až do doby vydání výsledku cca 28 dnů v lednici (2 – 8 °C); poté v mrazáku, při méně než -15 ° C (optimální -18° až -22° C)
periferní krev (v heparinu) pro cytogenetiku	po dobu zpracování, až do doby vydání výsledku cca 28 dnů v lednici (2 – 8 °C); poté je vzorek zlikvidován
periferní krev pro NIPT	dále se neuchovává, vzorek je zpracován celý
ovulační hlen	po dobu zpracování, až do doby vydání výsledku cca 28 dnů, v mrazáku při méně než -15 °C (optimální -18 až -22 °C)
ejakulát	po provedeném vyšetření je zlikvidován
choriové klky	dále se neuchovává, vzorek je zpracován celý
potracená tkáň	dále se neuchovává, vzorek je zpracován celý
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 uchováván 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 ºC (-18 až -22 ºC) 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 méně než -15 ºC (optimální -18 až -22 ºC) se souhlasem pacienta, po dobu minimálně 5 let
suspenze (suspenze kultivovaných lymfocytů)	v mrazáku při méně než -15 ºC (optimální -18 až -22 ºC), po dobu minimálně 1 měsíce
fluorescenčně značený PCR amplifikát	na tmavém místě v lednici do vydání výsledků
sérum z periferní krve	v mrazáku při méně než -15 ºC (optimální -18 až -22 ºC), po dobu 2 let

8.2.2.3 Trvalé preparáty

trvalé preparáty	způsob a lhůta uchovávání
patologické	10 let v histologických platech (sklad), při pokojené 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 volné DNA (vyšetření NIPT).

U plodových vod požadavek na dovyšetření zajišťujeme tím, že plodové vody s indikací USG nálezu kultivujeme pro izolaci DNA, kterou následně po dobu 5 let uchováváme. Ostatní kultivované plodové vody uchováváme v lednici po dobu 9 týdnů od odběru. Kvalita případného dalšího opakovaného vyšetření nebo dovyšetření může být ovlivněna dobou 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 sekce.

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 laboratoří

9.1 Informace o formách vydávání výsledků

Výsledky jsou sdělovány:

a) v tištěné formě – výsledky se vytisknou v laboratoři a předají na recepci GP, která zajistí dle žadatele dodání:
   - osobně v rámci Genetického pracoviště a Natalart
   - poštou
   - svozovou službou

b) elektronicky
   - vložením výsledků do systému Medicalc (v rámci Genetického pracoviště)
   - prostřednictvím zabezpečeného úložiště aplikací Safety4Transfer

c) telefonicky

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 kontrolované 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 potracené tkáně (aCGH):** 28 dní

- **Sekce molekulární genetiky** (MG)
  - **obecně:** 28 dní, pokud není níže stanoveno jinak
  - **vyšetření plodové vody/choriových klků (QF PCR):** 4 dny
  - **vyšetření potracené 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): 112 dní (závisí na kumulaci vzorků pro naplnění běhu k sekvenování)
- **neinvazivní prenatální testování** (NIPT): do 3 týdnů (dle kolektování vzorků)

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) viz také VD.GP 05 Laboratorní příručka PGT
- **vyšetření přenašečství pro nejčastější recesivní monogenní onemocnění – Carrier screening**: 90 dní, analýza omezená na max. 3 geny 30 dní
- **vyšetření přítomnosti genů KIR a stanovení haplotypů KIR-A, KIR-B:** 21 dní

Sekce reprodukční imunologie (RI)

- **spermiogram:** do 2 hodin
- **kompletní imunologická vyšetření:** 28 dní

9.4 Konzultační činnost laboratoře

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

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 Postup pro vyřizování stížností.

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 spisovnách 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 prenatálním 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)

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

10.3 Další související dokumentace

VD.GP 05 Laboratorní příručka PGT

10.4 Přílohy

--