

<b>FertiCare SE</b> provozovna Bělehradská 14, Karlovy Vary 360 01 <b>Laboratoř lékařské genetiky</b>	Druh dokumentu:  <b>LP</b>
<b>Název:</b>  <b>Laboratorní příručka</b>	
Celkový počet stran: 28	

# LABORATORNÍ PŘÍRUČKA

Zpracoval:  <b>RNDr. Michaela Česáková</b> <i>Vedoucí laboratoře</i>	Uvolnil pro SK:  <b>Nikola Stropnická, DiS.</b> <i>Manažer kvality</i>	Vydání:  13.
Schválil:  <b>MUDr. Marcel Hasch</b> <i>Odborný garant</i>	Platnost od:  2.1.2019	Výtisk č.:

<b>FertiCare SE</b> provozovna Bělehradská 14, Karlovy Vary 360 01 <b>Laboratoř lékařské genetiky</b>	Vydání: 13.
<b>Laboratorní příručka</b>	Platnost od: 2.1.2019

## OBSAH

<b>1. Úvod.....</b>	<b>3</b>
<b>2. Základní informace o laboratoři.....</b>	<b>3</b>
2.1 Identifikace laboratoře.....	4
<b>3. Zaměření laboratoře a spektrum nabízených služeb.....</b>	<b>5</b>
3.1 Přehled prováděných vyšetření.....	6
3.2 Seznam nabízených laboratorních vyšetření .....	6
3.3 Smluvní laboratoř .....	7
<b>4. Prohlášení o souhlasu.....</b>	<b>7</b>
<b>5. Preanalytická fáze .....</b>	<b>8</b>
5.1 Indikace k vyšetření .....	8
5.1.1 Cytogenetické metody .....	8
5.1.2 Molekulárně cytogenetické metody .....	9
5.1.3 Molekulárně genetické metody .....	10
5.2 Manuál pro odběr primárních vzorků.....	15
5.2.1 Identifikační označení primárního vzorku.....	15
5.2.2 Žádanka o laboratorní vyšetření .....	15
5.2.3 Požadavky na urgentní vyšetření.....	16
5.2.4 Ústní požadavky na vyšetření.....	16
5.2.5 Informace předávané pacientům před odběrem primárního vzorku .....	16
5.2.6 Informace pro odběr biologického materiálu .....	16
5.2.6.1 Plodová voda .....	17
5.2.6.2 Periferní a pupečnicková krev .....	17
5.2.6.3 Tkáň plodu.....	18
5.2.6.4 Slizniční stěr z dutiny ústní .....	18
5.2.6.5 Biopsie a fixace blastomery.....	19
5.2.6.6 Odběr trofektodermu (TE).....	20
5.2.6.7 Odběr ejakulátu .....	21
5.3 Transport a manipulace s biologickým materiálem (se vzorky).....	21
5.4 Příjem vzorku do laboratoře .....	23
5.4.1 Možné neshody při příjmu materiálu .....	24
5.4.2 Způsob řešení neshod při příjmu materiálu .....	24
<b>6. Fáze po vyšetření.....</b>	<b>25</b>
6.1 Bezpečné odstraňování materiálů použitých při vyšetření .....	25
6.2 Manipulace a skladování biologického materiálu .....	25
6.2.1 Skladování před a v průběhu vlastního vyšetření.....	25
6.2.2 Skladování po vyšetření .....	25
6.3 Dodatečná vyšetření a časový interval pro jejich požadování.....	26
6.4 Opakování vyšetření stejného primárního vzorku.....	26
<b>7. Vydávání výsledků a komunikace s laboratoří.....</b>	<b>26</b>
7.1 Informace o formách vydávání výsledků .....	26
7.2 Změny výsledků a nálezů .....	27
7.3 Intervaly od dodání materiálu k vydání výsledků .....	27
7.4 Konzultační činnost laboratoře.....	27
7.5 Způsob řešení stížností .....	27
<b>8. Přílohy .....</b>	<b>28</b>

<b>FertiCare SE</b> provozovna Bělehradská 14, Karlovy Vary 360 01 <b>Laboratoř lékařské genetiky</b>	Vydání: 13.
<b>Laboratorní příručka</b>	Platnost od: 2.1.2019

## 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 laboratoři 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 dostupný formulář pro informovaný souhlas a žádanky o laboratorní vyšetření.

Soubor nabízených metod laboratorního vyšetření je vytvořen a inovován dle požadavků zákazníků (lékařů a zdravotnických zařízení) s přihlédnutím k odbornému vývoji v oblasti klinické genetiky.

Laboratorní příručka je součástí řízené dokumentace laboratoře, je pravidelně aktualizována a žadatelům o vyšetření je dostupná na webových stránkách laboratoře – [www.genetikakv.cz](http://www.genetikakv.cz). Žadatelé o vyšetření jsou informováni o změnách a aktualizacích. V tištěné podobě je k dispozici u manažera kvality Laboratoře lékařské genetiky.

## 2. Základní informace o laboratoři

Laboratoř je vnitřně členěna na cytogenetickou a molekulárně genetickou laboratoř.

Činnost Laboratoře lékařské genetiky je odsouhlasena Krajským úřadem pro Karlovarský kraj, odborem zdravotnictví včetně schválení personálního a přístrojového vybavení.

Společnost má se všemi zdravotními pojišťovnami uzavřenou smlouvu o úhradě poskytnuté zdravotní péče. Úhradu provádějí zdravotní pojišťovny podle příslušnosti pacienta. Pro samoplátce je stanoven ceník.

Klientům je po dohodě umožněna prohlídka laboratorního zařízení a jsou poskytovány informace o organizaci provozu Laboratoře lékařské genetiky.

Zákazníkům jsou poskytovány konzultace v odborné oblasti související s prováděnými laboratorními vyšetřeními.

<b>FertiCare SE</b> provozovna Bělehradská 14, Karlovy Vary 360 01 <b>Laboratoř lékařské genetiky</b>	Vydání: 13.
<b>Laboratorní příručka</b>	Platnost od: 2.1.2019

## 2.1 Identifikace laboratoře

### **Základní identifikace a kontaktní údaje:**

Název organizace: FertiCare SE, provozovna Karlovy Vary

Adresa: Bělehradská 14, 360 01 Karlovy Vary  
Statutární zástupce: Dr. med. Petr Uher – člen představenstva

Laboratoř: **Laboratoř lékařské genetiky**  
**www.genetikav.cz**

Odborný garant: MUDr. Marcel Hasch

Vedoucí laboratoře: RNDr. Michaela Česáková  
 Telefon: 353 433 950  
 353 433 967  
 Fax: 353 433 952  
 Mobil: 776 233 479  
 E-mail: [info@feticare.cz](mailto:info@feticare.cz)  
[m.cesakova@feticare.cz](mailto:m.cesakova@feticare.cz)

Manažer kvality: Nikola Stropnická, DiS.  
 Telefon: 353 433 968  
 Mobil: 724 933 265  
 E-mail: [n.stropnicka@feticare.cz](mailto:n.stropnicka@feticare.cz)

Metrolog: Martina Chodová, DiS.  
 Telefon: 353 433 968  
 E-mail: [m.chodova@feticare.cz](mailto:m.chodova@feticare.cz)

Umístění laboratoře: Bělehradská 14, 360 01 Karlovy Vary, 4. patro  
Provozní doba laboratoře: Po - Pá 7,00 – 15,00  
Příjem materiálu: po celou pracovní dobu, jindy dle dohody

<b>FertiCare SE</b> provozovna Bělehradská 14, Karlovy Vary 360 01 <b>Laboratoř lékařské genetiky</b>	Vydání: 13.
<b>Laboratorní příručka</b>	Platnost od: 2.1.2019

## 2.1 Zkratky

AZF - azoospermia factor  
 BMI - body mass index  
 CFTR - gen Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator  
 CGH - komparativní genomové hybridizace  
 CNV - copy number variation – variace v počtu kopií  
 DNA - deoxyribonukleová kyselina  
 IVF - in vitro fertilizace  
 EDTA - kyselina ethylendiamintetraoctová  
 FISH - fluorescenční in situ hybridizace  
 FSH - folikuly stimulující hormon  
 KCl - chlorid sodný  
 LIS - laboratorní informační systém  
 MESA - mikrochirurgická epidemální aspirace spermií  
 NT - nuchální translucence  
 PBS - phosphate buffered saline – fosfátový pufr  
 PHA - phytohaemagglutinin  
 PID - preimplantační diagnostika  
 PGD - preimplantační genetická diagnostika translokací  
 PGS - preimplantační genetický screening  
 STS - sequence tagged site – místo se sekvenční adresou  
 TE - trofektoderm  
 TESE - testikulární extrakce spermatické tkáně  
 UZ - ultrazvuk

## 3. Zaměření laboratoře a spektrum nabízených služeb

Naše laboratoř provádí specializovaná cytogenetická, molekulárně genetická a jiná vyšetření z těchto primárních materiálů:

- plodová voda
- pupečnicková krev
- periferní krev
- slizniční stěr z dutiny ústní
- tkáň plodu
- blastomera, trofektoderm
- ejakulát

<b>FertiCare SE</b> provozovna Bělehradská 14, Karlovy Vary 360 01 <b>Laboratoř lékařské genetiky</b>	Vydání: 13.
<b>Laboratorní příručka</b>	Platnost od: 2.1.2019

### **3.1 Přehled prováděných vyšetření**

- vyšetření karyotypu klasickými cytogenetickými metodami
- chromozomální vyšetření metodou FISH, včetně PID (preimplantační diagnostika)
- molekulárně genetické vyšetření aneuploidií chromozomů 13, 18, 21, X, Y
- molekulárně genetické vyšetření genu pro cystickou fibrózu (CFTR)
- molekulárně genetické vyšetření dědičnosti sklonu ke kardiovaskulárním onemocněním (vyšetření trombofilních stavů, kardiovaskulárních dispozic)
- molekulárně genetické vyšetření mikrodelecí Y chromozomu (AZF faktor)
- molekulárně genetické vyšetření celiakie
- molekulárně genetické vyšetření laktóзовé a glukóзовé intolerance
- molekulárně genetické vyšetření hemochromatózy
- molekulárně genetické vyšetření metabolismu warfarinu
- molekulárně genetické vyšetření spinální muskulární atrofie
- molekulárně genetické vyšetření hereditární hluchoty
- vyšetření počtu kopií CNV metodou komparativní genomové hybridizace na čipu (array CGH), včetně PID
- vyšetření fragmentace DNA spermií
- izolace DNA a zprostředkování vyšetření ve specializovaných centrech molekulární genetiky

### **3.2 Seznam nabízených laboratorních vyšetření**

#### **Vyšetření akreditovaná u ČIA dle ČSN EN ISO 15 189:**

1. SOP - 01 Cytogenetické vyšetření karyotypu z biologického materiálu
2. SOP - 02 Vyšetření aneuploidií, mikrodelecí a strukturálních změn chromozomů metodou FISH
3. SOP - 03 A - Molekulárně genetické vyšetření 29 mutací CFTR genu metodou Elucigene CF29v.2  
B - Dovyšetření slovanské mutace CFTRdele2,3 (21kb) pomocí alelicky specifické PCR reakce a analýzy v agarozovém gelu
4. SOP - 04 Molekulárně genetické vyšetření trombofilních mutací pomocí Real-time PCR
5. SOP - 05 Molekulárně genetické vyšetření mikrodelecí chromozomu Y pomocí alelicky specifické PCR reakce a následné elektroforézy v agarozovém gelu
6. SOP - 06 Molekulárně genetické vyšetření 34 mutací a jednoho polymorfismu CFTR genu metodou CF StripAssay
7. SOP - 09 Molekulárně genetické vyšetření mikrodelecí chromozomu Y pomocí kitu YChromStrip
8. SOP - 15 Vyšetření počtu kopií CNV metodou komparativní genomové hybridizace na čipu (array CGH)

<b>FertiCare SE</b> provozovna Bělehradská 14, Karlovy Vary 360 01 <b>Laboratoř lékařské genetiky</b>	Vydání: 13.
<b>Laboratorní příručka</b>	Platnost od: 2.1.2019

#### Neakreditovaná vyšetření:

9. SOP - 07 Molekulárně genetické vyšetření celiakie pomocí Real-time PCR
10. SOP - 08 Molekulárně genetické vyšetření celiakie kitem CeliacStrip
11. SOP - 10 Molekulárně genetické vyšetření kardiovaskulárních dispozic metodou StripAssay
12. SOP - 11 Molekulárně genetické vyšetření cukrové intolerance metodou StripAssay
13. SOP - 12 Cytogenetické vyšetření karyotypu z tkáně plodu
14. SOP - 13 Molekulárně genetické vyšetření polymorfismů VKORC1 a CYP2C9
15. SOP - 14 Molekulárně genetické vyšetření hemochromatózy
16. SOP - 16 Vyšetření fragmentace DNA spermií pomocí kitu Halosperm®
17. SOP - 17 Vyšetření metodou MLPA
18. SOP - 18 Vyšetření aneuploidií chromosomů 13, 18, 21, X a Y pomocí STR analýzy metodou QF PCR

### **3.3 Smluvní laboratoř**

Laboratoř spolupracuje se smluvní laboratoří Genetika Plzeň s.r.o. a Biomedicínským centrem. Dopravu do nich zajišťuje odesílající Laboratoř lékařské genetiky. Genetika Plzeň s.r.o. biologický materiál zpracuje a vydá výsledkový list, který je zaslán do Laboratoře lékařské genetiky. Patologické výsledky jsou laboratoři sděleny telefonicky. V případě konzultace vydává výsledkový list Laboratoř lékařské genetiky. Ve výsledkovém listu je jasně uvedeno, která laboratorní vyšetření byla provedena smluvní laboratoří. Biomedicínské centrum provádí skenování čipů pro vyšetření metodou array-CGH. Vyhodnocení výsledků provádí odpovědný pracovník Laboratoře lékařské genetiky dle platné SOP.

## **4. Prohlášení o souhlasu**

Některé odběry pro laboratorní vyšetření patří mezi invazivní a lékař odebírající materiál je povinen informovat pacienty a pořídit písemný doklad o této skutečnosti. Pacient je vždy seznámen s účelem, povahou a důsledkem prováděného vyšetření. Svým podpisem stvrzuje, že souhlasí s odběrem a případným uchováním odebraného genetického materiálu (je vždy uvedeno v informovaném souhlasu s DNA vyšetřením).

V případě nesouhlasu pacienta s uchováním DNA je po vyšetření vzorek zlikvidován jako biologický materiál.

Odesílající lékař svým podpisem na žádance stvrzuje, že pacient informovaný souhlas podepsal, ať už je k žádance přiložen, či zůstává uložen v kartě pacienta. **Laboratoř má k dispozici vlastní formulář informovaného souhlasu, akceptuje i jiné formuláře obsahující náležitosti uvedené výše.**

**Samostatnou přílohou této příručky je formulář pro informovaný souhlas:**

- Souhlas vyšetřované/ho (zákonného zástupce) s genetickým laboratorním vyšetřením

<b>FertiCare SE</b> provozovna Bělehradská 14, Karlovy Vary 360 01 <b>Laboratoř lékařské genetiky</b>	Vydání: 13.
<b>Laboratorní příručka</b>	Platnost od: 2.1.2019

## 5. Preanalytická fáze

K zajištění preanalytické fáze vyšetření je možno využít smluvního partnera Laboratoře lékařské genetiky, kterým je Sang Lab - klinická laboratoř, s.r.o., jehož pracovníci jsou seznámeni se zněním této Laboratorní příručky.

### 5.1 Indikace k vyšetření

#### 5.1.1 Cytogenetické metody

##### **Chromozomální vyšetření**

Slouží k určení karyotypu klasickými cytogenetickými metodami.

Vyšetření se provádí z **periferní nebo fetální krve, plodové vody či potracené tkáně plodu.**

Důvodem odběru je určení karyotypu vyšetřovaného pacienta (plodu). Při cytogenetickém vyšetření karyotypu z krve jsou kultivovány T-lymfocyty. Dělení buněk je stimulováno rostlinným lektinem Phytohemaglutininem (PHA). Při cytogenetickém vyšetření karyotypu z plodové vody či tkáně jsou kultivovány buňky plodu. Pod mikroskopem je sledován počet a struktura jednotlivých chromozomů. Odběr krve se neprovádí po transfúzi a přijmuté infuzi (u novorozence) z důvodů vlivu na výsledky vyšetření. Karyotyp by odpovídal karyotypu dárce, ne pacienta.

##### Indikace k vyšetření karyotypu:

- 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
- screeningové vyšetření dárců oocytů a spermií

##### Indikace k vyšetření karyotypu plodu:

- narození mrtvého plodu a úmrtí novorozence v předchozí graviditě
- opakované spontánní potraty u matky
- pozitivní biochemický screening mateřského séra
- věk matky nad 35 let
- pozitivní rodinná anamnéza chromozomálních přestaveb
- patologický UZ nález



<b>FertiCare SE</b> provozovna Bělehradská 14, Karlovy Vary 360 01 <b>Laboratoř lékařské genetiky</b>	Vydání: 13.
<b>Laboratorní příručka</b>	Platnost od: 2.1.2019

## 5.1.2 Molekulárně cytogenetické metody

### 5.1.2.1. FISH vyšetření

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

Metoda FISH se používá k upřesnění a doplnění chromozomálního vyšetření, popř. verifikaci nálezu zjištěného běžným cytogenetickým rozbořem. FISH vyšetření se používá rovněž při preimplantační genetické diagnostice (PID). Analýzou jedné nebo dvou buněk (blastomer) odebraných z vyvíjejícího se embrya je tak možné odhalit sledované genetické abnormality (aneuploidie, translokace) budoucího plodu. Po tomto vyšetření lze k transferu do dělohy vybrat pouze embrya s normálním nálezem.

Indikace k PID vyšetření:

PGD (preimplantační genetická diagnostika translokací)

- páry, kdy jeden z partnerů je nositelem chromozomální přestavby, jejíž nebalancované formy vedou k časným potratům, či vývoji postiženého plodu.

PGS (preimplantační genetický screening nejčastějších aneuploidií)

- v dnešní době je toto vyšetření prováděno spíše metodou array-CGH, indikace viz kapitola 5.1.2.2.

Sexing (volba pohlaví)

- X-vázaná onemocnění (Duchennova/Beckerova muskulární dystrofie, hemofilie), pokud není dostupné cílené PCR vyšetření

Vyšetření metodou PID předchází podrobná genetická konzultace obou partnerů, jejímž vyústěním je podepsaný informovaný souhlas, který dokumentuje, že pár dostatečně porozuměl problematice a mohl se svobodně rozhodnout, zda proceduru podstoupí.

PID se nedoporučuje, pokud má žena nízký počet folikulů, špatnou kvalitu embryí, BMI nad 30, věk nad 45 let či bazální FSH větší než 15 IU/l.

Přínos PGS je stále diskutován. ESHRE organizuje studii napříč IVF centry s cílem zjistit, zda PGS objektivně zvyšuje úspěšnost IVF cyklu.

### 5.1.2.2. Vyšetření array CGH

Array CGH (komparativní genomová hybridizace na čipu, aCGH) je molekulárně cytogenetické vyšetření celého genomu. Slouží k odhalení nebalancovaných aberací (ztrát a zisků sekvencí), jejichž umístění v genomu není předem známé. Metoda se používá v diagnostice postnatální, prenatalní 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.

Indikace k postnatální diagnostice (při normálním karyotypu, ev. dalších molekulárně genetických vyšetřeních, např. po vyloučení syndromu fragilního X):

- psychomotorická retardace/stigmatizace
- problémy růstu a vývoje
- mnohočetné vrozené vady
- zdánlivě balancovaná aberace, upřesnění nalezené aberace (marker chromozom, *de novo* aberace apod.)

<b>FertiCare SE</b> provozovna Bělehradská 14, Karlovy Vary 360 01 <b>Laboratoř lékařské genetiky</b>	Vydání: 13.
<b>Laboratorní příručka</b>	Platnost od: 2.1.2019

- vyšetření obou rodičů současně s vyšetřením plodu, pokud jeho stáří překročilo 20. týden 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.)

Indikace k prenatalní diagnostice (při normálním karyotypu):

- abnormální ultrazvukový nález
- významně vyšší NT nad 3 mm
- nosičství chromozomální přestavby a to i zděděné od rodiče (vyloučení *de novo* mikroleceí nebo mikroduplikací v místech zlomů)
- nelze vyšetřit karyotyp (nemožnost kultivace, nedostatek materiálu, nedostatečné lhůta pro provedení do ukončeného 24. týdnu těhotenství apod.)

Indikace k preimplantační diagnostice:

- vyšší věk ženy – nad 35 let v době očekávaného porodu
- opakované neúspěchy předchozích cyklů asistované reprodukce – min. 2x
- opakované potrácení po vyloučení ostatních možných příčin – min. 2x
- početní gonozomové aberace (např. 47,XXX, 47,XYY) a malé gonozomové mozaiky detekované z periferní krve – nad 10 %
- andrologický faktor (např. těžká oligo-asteno-teratospermie) nebo použití spermií získaných metodou MESA/TESE v asistované reprodukci
- porod nebo potrat dítěte (plodu) s chromozomovou aneuploidií
- chemoterapie nebo radioterapie u jednoho či obou partnerů v anamnéze
- strukturní chromozomové aberace (balancované či Robertsonské translokace, ev. závažné inverze)

### 5.1.3 Molekulárně genetické metody

Laboratoř provádí:

- izolaci DNA ze vzorku periferní a fetální krve
- izolaci DNA z kultivovaných/nativních buněk plodu
- izolaci DNA ze slizničních stěrů

Izolace DNA je výchozí krok ke všem metodám molekulární genetiky.

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

Metody:

**a) Vyšetření nejčastějších aneuploidií (chrom. 13, 18, 21, X, Y)**

Jde o metodu, sloužící jako doplněk ke klasickým cytogenetickým chromozomálním analýzám prenatalní diagnostiky. Hlavní výhodou je možnost provedení během 24 hodin. Díky rychlé diagnostice lze rozhodnout o probíhající těhotenství v brzké době a v případě rozhodnutí o ukončení těhotenství použít méně traumatickou metodu. U negativního výsledku těchto chromozomových aneuploidií, zjištěného metodou QF-PCR, je zbytkové riziko výskytu jiných chromozomových poruch nízké.

<b>FertiCare SE</b> provozovna Bělehradská 14, Karlovy Vary 360 01 <b>Laboratoř lékařské genetiky</b>	Vydání: 13.
<b>Laboratorní příručka</b>	Platnost od: 2.1.2019

Indikace k vyšetření:

- narození mrtvého plodu a úmrtí novorozence v předchozí graviditě
- opakované spontánní potraty u matky
- pozitivní biochemický screening mateřského séra
- věk matky nad 35 let
- pozitivní rodinná anamnéza chromozomálních přestaveb
- patologický UZ nález

**b) Vyšetření mutací v CFTR genu pro cystickou fibrózu**

Laboratoř provádí detekci 34 mutací a stanovení polymorfismu v intronu 8 (Tn variatna) CFTR genu pomocí kitu StripAssay (ViennaLab). Kit je zaměřen na středoevropskou populaci, zahrnuje slovanskou mutaci CFTRdele2,3 (21 kb) a rozliší heterozygotní od homozygotní formy u všech vyšetřovaných mutací.

Vyšetřované mutace zachytí více než 93 % všech mutací CFTR genu v české populaci.

Indikace k vyšetření:

- u pacienta s příznaky cystické fibrózy
- u příbuzných pacienta s cystickou fibrózou a detekovanými mutacemi v CFTR genu
- 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
- screeningové vyšetření dárců oocytů a spermií

**c) Vyšetření na přítomnost trombofilních variant a polymorfismů asociovaných s kardiovaskulárními onemocněními**

- gen pro koagulační faktor V – varianta FV Leiden – G1691A (AGR506Thr)
- gen pro protrombin (koagulační faktor II) – varianta G20210A
- gen pro methylenetetrahydrofolát reduktázu (MTHFR) – varianta C677T a varianta A1298C
- gen pro inhibitor plazminogenového aktivátoru (PAI-1) – mutace 4G/5G
- Endothelilal Nitric Oxide Synthase (eNOS -786 T>C, eNOS G894T)
- Lymphotoxin Alpha (LTA 804 C>A )
- Angiotensin - Converting Enzyme (ACE inzerce/delece 287bp)
- Human Platelet Antigen 1 (HPA1 L33P (1a/b) )
- β-fibrinogen (-455 G>A )
- Apolipoprotein B (ApoB R3500Q )
- Apolipoprotein E (ApoE varianty E2/E3/E4)

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 v II. nebo III. trimestru těhotenství bez objasněné příčiny
- indikace klinickým hematologem

<b>FertiCare SE</b> provozovna Bělehradská 14, Karlovy Vary 360 01 <b>Laboratoř lékařské genetiky</b>	Vydání: 13.
<b>Laboratorní příručka</b>	Platnost od: 2.1.2019

**d) Vyšetření nejčastějších mikrodelecí AZF oblasti na Y chromozomu**

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

Vyšetřovány jsou oblasti AZFa, AZFb, AZFc. Z každé oblasti jsou vyšetřovány min. 2 STS lokusy. Uvedený postup zachytí cca 90 % delecí v AZF oblastech.

Indikace k vyšetření:

- porucha plodnosti u mužů – azoospermie nebo těžká oligospermie

**e) Vyšetření k vyloučení celiakie**

Vyšetřovány jsou alely DQA1\*05, DQB1\*02, DQB1\*0302, DRB1\*04. Nepřítomnost těchto alel vyloučí diagnózu celiakie. Přítomnost alel neznámá přítomnost onemocnění celiakii. Celiakie (také glutenová enteropatie nebo celiakální sprue) je u geneticky predisponovaných jedinců vyvolána po požití potravy obsahující gluten (lepek). Projevuje se chronickým zánětem tenkého střeva spojeným se zvýšenou propustností střevní stěny. Celiakie má množství klinických příznaků a může být i asymptomatická. Typickými symptomy provázejícími toto onemocnění jsou bolesti břicha, průjemy, nadýmání, zvracení.

Indikace k vyšetření:

- neprospívání u dětí
- gastrointestinální symptomy, únava, hubnutí u dospělých
- intolerance glutenu (lepku)
- pozitivní rodinná anamnéza
- neplodnost, opakované potraty
- exantém
- sideropenická anémie
- osteoporóza nepřiměřená věku
- jiná autoimunitní onemocnění

**f) Vyšetření laktózové intolerance**

Vyšetření 2 polymorfismů LCT genu (laktózová intolerance). Laktózová intolerance je způsobena částečnou nebo úplnou neschopností organismu produkovat enzym laktáza, který laktózu (mléčný cukr) ve střevech rozkládá. Pokud je laktázy nedostatek, mléčný cukr se ve střevech nestráví a jeho přebytkem se pak živí přirozené střevní bakterie, které při jeho zpracování produkují plyny (CO<sub>2</sub> či H<sub>2</sub>) a další látky, které dráždí tlusté střevo a tím způsobují nadýmání, střevní koliky, průjemy a zvracení. Méně častými projevy jsou atopické ekzémy, nechutenství, pálení žáhy, pocit plnosti a bolesti břicha.

Indikace k vyšetření:

- vleklé gastrointestinální potíže, nesnášenlivost mléčného cukru
- neprospívání u dětí

<b>FertiCare SE</b> provozovna Bělehradská 14, Karlovy Vary 360 01 <b>Laboratoř lékařské genetiky</b>	Vydání: 13.
<b>Laboratorní příručka</b>	Platnost od: 2.1.2019

**g) Vyšetření hemochromatózy**

Vyšetření mutací C282Y, H63D a S65C v genu HFE způsobujících hemochromatózu.

Hemochromatóza je autosomálně recesivní porucha metabolismu železa. Je charakterizována progresivní akumulací železa v různých orgánech (játra, srdce, pankreas), vedoucí k cirhóze jater, diabetu, artritidě, kardiomyopatii a předčasné smrti. Pacienti s hemochromatózou absorbují pouze o několik málo miligramů více, než je fyziologicky potřebné, a proto se hemochromatóza klinicky manifestuje často až po 40. roce života, kdy je v těle nashromážděno o 20 - 40 g železa více, než tělo potřebuje. Tato akumulace železa však začíná již od narození.

Indikace k vyšetření:

- zvýšené hodnoty Fe v séru
- diabetes mellitus
- fibróza až cirhóza jater
- kardiomyopatie
- artropatie
- hepatomegalie
- abnormální pigmentace kůže
- hemochromatóza v RA

**h) Vyšetření polymorfismů VKORC a CYP2C9**

Vyšetření polymorfismů genů VKORC a CYP2C9 spojovaných se sníženým metabolismem warfarinu. Analýza polymorfismů umožňuje rychlejší stanovení správné dávky kumarinových antikoagulačních léčiv, předchází nežádoucím účinkům z nesprávného dávkování.

Indikace k vyšetření:

- před zahájením podávání antikoagulačních léčiv (Warfarin, Coumadin)

**i) Vyšetření spinální muskulární atrofie**

Vyšetření exonů 7 a 8 v genech SMN1, SMN2. Spinální muskulární atrofie (SMA) je závažné neurodegenerativní onemocnění charakterizované degenerací motorických neuronů v předních rožích míchy. SMA je druhým nejčastějším autozomálně recesivním onemocněním s incidencí 1/10 000 novorozenců a s frekvencí přenašečů až 1/40.

Indikace k vyšetření

- u pacientů se SMA
- u příbuzných pacientů se SMA
- u příbuzných přenašečů delece exonu 7 SMN1 genu
- u dárců oocytů, spermatu

<b>FertiCare SE</b> provozovna Bělehradská 14, Karlovy Vary 360 01 <b>Laboratoř lékařské genetiky</b>	Vydání: 13.
<b>Laboratorní příručka</b>	Platnost od: 2.1.2019

**j) Vyšetření hereditární hluchoty**

Vyšetření genu GJB2 (a dále GJB3, GJB6, POU3F4, WFS1). Až 80 % geneticky podmíněných nesyndromových ztrát sluchu se dědí autosomálně recesivně. Ve více než polovině případů autozomálně recesivní ztráty sluchu jsou příčinou mutace v genu GJB2, lokalizovaném na chromozomu 13 (13q12), kódujícím Connexin 26. Connexiny jsou membránové proteiny, které propojují buňky vnitřního ucha, zajišťují výměnu iontů, případně malých molekul, a umožňují tak mezibuněčnou komunikaci sluchového aparátu. V evropské populaci je nejčastější mutace 35delG v genu GJB2. s frekvencí přenašečů 1/49.

Indikace k vyšetření

- zjištění příčiny vrozené prelingvální ztráty sluchu
- u slyšících příbuzných v rodinách, kde byla již mutace zjištěna
- vyšetření partnera přenašeče mutace před plánovaným těhotenstvím
- ověření přítomnosti mutace u partnerů v příbuzenském svazku
- u dárců oocytů, spermatu

**k) Vyšetření fragmentace DNA spermií**

Vyšetření, které stanoví podíl spermií s porušenou DNA. Integrita DNA je hodnota nezávislá na hodnotách spermogramu. Spermie s fragmentovanou DNA negativně ovlivňují fertilitu. Porucha integrity DNA spermií může být způsobena řadou faktorů např. oxidativním stresem nebo prodělanými chorobami.

Indikace k vyšetření:

- špatné hodnoty spermogramu
- špatný vývoj, nízká efektivita fertilizace a vysoký podíl fragmentovaných embryí při IVF

**Volba metody:**

Pokud má laboratoř pro dané vyšetření k dispozici více metod, o metodě vyšetření standardně rozhoduje vedoucí laboratoře.

FertiCare SE provozovna Bělehradská 14, Karlovy Vary 360 01 <b>Laboratoř lékařské genetiky</b>	Vydání: 13.
Laboratorní příručka	Platnost od: 2.1.2019

## **5.2 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 nejen pro pracovníky laboratoře, ale i pro pracovníky odpovědné za odběry a transport primárních vzorků. Pracovník odebírající primární vzorky vždy ručí za jejich odběr a transport. Svým podpisem na žádance pro dané vyšetření stvrzuje, že primární vzorek byl odebrán dle pokynů této Laboratorní příručky.

### **5.2.1 Identifikační označení primárního vzorku**

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

- jména a příjmení pacienta
- rodného čísla pacienta (pokud je to možné), případně jiný kód (např. datum, rok narození apod.)

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

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 žádanky a materiálu odpovídá žadatel o vyšetření. Vždy musí zajistit nezaměnitelnost materiálu a dokumentace.

### **5.2.2 Žádanka o laboratorní vyšetření**

Do laboratoře jsou přijímány vzorky pouze s doprovodnou žádankou na vyšetření.

Žádanka musí povinně obsahovat následující údaje:

- jméno, příjmení, číslo pojištěnce (rodné číslo) nebo datum narození (novorozenci, cizinci) a zdravotní pojišťovnu pacienta
- pohlaví pacienta
- týden těhotenství u vyšetření plodové vody a tkáně plodu
- jméno, odbornost a podpis lékaře indikujícího vyšetření
- razítko s IČP, adresou pracoviště a kontaktní telefon
- druh primárního vzorku
- indikované vyšetření
- diagnózu a klinickou indikaci k vyšetření
- datum a čas odběru vzorku

Laboratoř pak doplní:

- datum a čas přijetí vzorku do laboratoře a podpis přijímajícího pracovníka laboratoře

Nepovinné údaje:

- bydliště pacienta

Žádanku o laboratorní vyšetření provází **vždy** podepsaný informovaný souhlas pacienta s vyšetřením a dalším uchováváním DNA. Informovaný souhlas pacienta je vysvětlen pacientovi ošetřujícím lékařem. Pacient musí být seznámen s právem na ochranu osobních dat v souvislosti s prováděným testem.

FertiCare SE provozovna Bělehradská 14, Karlovy Vary 360 01 <b>Laboratoř lékařské genetiky</b>	Vydání: 13.
Laboratorní příručka	Platnost od: 2.1.2019

Samostatnou přílohou Laboratorní příručky Laboratoře lékařské genetiky jsou žádanky k laboratornímu vyšetření.

### 5.2.3 Požadavky na urgentní vyšetření

Laboratoř vyšetření STATIM neprovádí, po domluvě s vedoucí laboratoře lze zajistit přednostní zpracování vzorku.

### 5.2.4 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. Externí žadatel je požádán o dodání nové žádanky na doordínované vyšetření. Interní žadatel doplní požadavek na původní žádanku.

### 5.2.5 Informace předávané pacientům před odběrem primárního vzorku (informované souhlasy)

Většina odběrů pro genetická vyšetření se provádí ambulantně.

Po odběrech pro prenatální vyšetření se nedoporučuje fyzická námaha a těhotná žena má nárok na 7- denní pracovní neschopnost.

Odběry biologického materiálu před plánovaným genetickým vyšetřením nevyžadují speciální přípravu pacienta, základní informace jsou uvedeny u konkrétních odběrů.

Žádný z odběrů není potřeba provádět nalačno, jídlo ani pití neovlivňují výsledky vyšetření.

Před odběrem plodové vody podepisují pacientky (příp. zákonný zástupce) **Souhlas s provedením amniocentézy/odběru choriových klků**. Formulář je k dispozici v genetické ambulanci IRMG.

Při odběru biologického materiálu k DNA vyšetření podepisuje pacient **Souhlas vyšetřované/ho (zákonného zástupce) s genetickým laboratorním vyšetřením**.

Formulář je součástí příloh Laboratorní příručky (volně přístupný ke stažení).

### 5.2.6 Informace pro odběr biologického materiálu

V této kapitole jsou uvedeny požadavky a pokyny pro odběr zpracovávaných biologických materiálů – doporučené odběrové nádoby, minimální odebrané množství a požadavky na transport a případně zvláštní načasování odběru. Viz tabulka str. 20.

#### **Odběrové nádoby**

Materiál musí být dodán do laboratoře ve sterilních odběrových nádobách nebo zkumavkách.

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

Pozor na záměnu biologického materiálu!

Nestandardní odběr je nutno specifikovat na žádance.



<b>FertiCare SE</b> provozovna Bělehradská 14, Karlovy Vary 360 01 <b>Laboratoř lékařské genetiky</b>	Vydání: 13.
<b>Laboratorní příručka</b>	Platnost od: 2.1.2019

### 5.2.6.1 Plodová voda

#### Požadavky na primární vzorky

##### Odběr plodové vody - amniocentéza:

Odběr plodové vody provádí za sterilních podmínek zkušený lékař - gynekolog ve zdravotnickém zařízení. Odběr probíhá punkcí přes stěnu břišní pod kontrolou ultrazvuku tak, aby nedošlo k poranění plodu. Těhotná leží na lůžku, břišní stěnu dezinfikujeme (např. Cutasept, Braunoderm) a poté ultrazvukovou sondou hledáme vhodné místo pro vpich (pozor, průměr jehly 0,53 mm – menší než na odběr krve). Nepoužívat dezinfekce s obsahem **jodu**, které by mohly být příčinou neúspěšné kultivace. Poloha hrotu při vpichu je neustále kontrolována ultrazvukem. Při standardním odběru je odsáto cca 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 může těhotná s doprovodem odejít domů, pokud se cítí dobře.

##### Druh odběrové nádoby a přídavných látek:

Sterilní plastová zkumavka s dobře těsnícím víčkem bez přídavných látek (Vacurette - žluté víčko). Standardně se odebírá 20 ml do tří zkumavek. Minimální množství plodové vody je 10 ml.

##### Transport a skladování:

Pokud se odběr plodové vody neprovádí v genetické ambulanci centra, je nutné zajistit transport do laboratoře co nejdříve, nejpozději do 24 hod. od odběru. Po odběru vzorku plodové vody je třeba zkumavku promíchat přetočením 8 až 10 krát a nechat vychladnout min. 30 min. při pokojové teplotě. Do a během transportu je zapotřebí uchovávat vzorky při teplotě 2 - 8 °C. Je nutné zabránit zmrznutí nebo přehřátí vzorku, aby nedošlo k lyzi buněk.

### 5.2.6.2 Periferní a pupečnicková krev

#### Požadavky na primární vzorky

##### Odběr periferní krve:

Krev vyšetřované osoby je odebrána v odběrové místnosti nebo v ordinaci lékaře indikujícího vyšetření. Odebírá se krev z periferní žíly. Odběr materiálu na cytogenetické i molekulárně genetické vyšetření nevyžaduje žádnou speciální přípravu pacienta. Krev se odebírá z periferní žíly v loketní jamce. Paže se volně položí, dezinfikuje se místo vpichu (např. Cutasept, Braunoderm) – **nesmí** se používat dezinfekce s obsahem **jodu**, které by mohly být příčinou neúspěšné kultivace. Po stabilizování polohy provedeme vpich jehlou s nasazeným nástavcem a poté se na nástavec nasadí příslušná zkumavka označená jménem pacienta a rodným číslem nebo alespoň datem narození. Místo vpichu se zakryje čtverečkem z buničiny, opatrně se přitlačí, vytáhne se jehla a přelepí náplastí. Vyzveme pacienta, aby si tisknul místo vpichu (cca 2 - 5 minut) a po cca 20 minutách si náplast odstraní.

##### Odběr fetální krve:

Provádí vždy zkušený lékař - gynekolog ve zdravotnickém zařízení. Odběr se provádí pod kontrolou ultrazvuku. Postup je obdobný jako při odběru plodové vody. Odebírá se cca 1 - 2 ml fetální krve z pupečnicku přes stěnu břišní. Odebraný vzorek musí být řádně označen a je třeba ho v co nejkratší době dopravit do laboratoře.

<b>FertiCare SE</b> provozovna Bělehradská 14, Karlovy Vary 360 01 <b>Laboratoř lékařské genetiky</b>	Vydání: 13.
<b>Laboratorní příručka</b>	Platnost od: 2.1.2019

Druh odběrové nádoby a přídavných látek:

**a) Cytogenetická vyšetření (karyotyp, FISH)**

Sterilní plastová zkumavka s dobře těsnícím šroubovatelným víčkem s náplní **Heparinu** (Vacuette - zelené víčko). Minimální množství periferní krve 4 ml, fetální krve se odebírá 1 – 2 ml.

**b) Molekulárně genetická vyšetření (array CGH, trombofilní stavy, CFTR, AZF faktor, celiakie, ...)**

Sterilní plastová zkumavka s dobře těsnícím šroubovatelným víčkem s náplní **EDTA** (Vacuette - fialové víčko). Minimální množství periferní krve 2 ml, fetální krve se odebírá 1 – 2 ml.

Transport a skladování:

Po odběru vzorku periferní krve je třeba zkumavku promíchat přetočením 8 až 10 krát a nechat vychladnout min. 30 min. při pokojové teplotě. Do a během transportu je zapotřebí uchovávat vzorky při teplotě 2 - 8 °C. Je nutné zabránit zmrznutí nebo přehřátí krve, aby nedošlo k lyzi buněk. Transport do laboratoře je nutno zajistit nejlépe v den odběru, u heparinových zkumavek maximálně do 5 dnů od odběru, EDTA zkumavky do týdne od odběru.

5.2.6.3 Tkáň plodu

Požadavky na primární vzorky:

Odběr tkáně plodu:

K vyšetření je nutné dodat sterilně odebranou tkáň o velikosti minimálně 1 cm<sup>3</sup>, která se vloží do sterilní zkumavky s fyziologickým roztokem. Vzorek **NESMÍ** přijít do kontaktu s formalinem.

Druh odběrové nádoby a přídavných látek:

Sterilní plastová zkumavka s dobře těsnícím víčkem bez přídavných látek. Vzorek se odebírá do fyziologického roztoku.

Transport a skladování:

Odebraný vzorek musí být řádně označen a je třeba ho v co nejkratší době dopravit do laboratoře. Do a během transportu je zapotřebí uchovávat vzorky při teplotě 2 - 8 °C. Je nutné zabránit zmrznutí nebo přehřátí vzorku, aby nedošlo k lyzi buněk.

5.2.6.4 Slizniční stěr z dutiny ústní

Požadavky na primární vzorky:

Bukání stěr ze sliznice je proveden sterilní výtěrkou k tomu určenou. Odběr provádí sestra, kdy pacientovi **DŮKLADNĚ** vytře sliznice dutiny ústní sterilním kartáčkem či výtěrkou (např. Dispolab) a výtěr vloží do označené zkumavky. Kvůli nižší výtěžnosti při izolaci DNA z bukálního stěru je vhodné odebrat k vyšetření dvě výtěrky.

Druh odběrové nádoby a přídavných látek:

Sterilní zkumavka s kartáčkem nebo sterilní nylonové výtěrky k PCR vyšetření.

Transport a skladování:

Materiál je možno uchovávat v lednici při teplotě 2 - 8 °C po dobu 7 dní, poté je nutno skladovat v mrazáku při teplotě -20 °C až -26 °C. Transport do laboratoře je nutno zajistit do týdne.

<b>FertiCare SE</b> provozovna Bělehradská 14, Karlovy Vary 360 01 <b>Laboratoř lékařské genetiky</b>	Vydání: 13.
<b>Laboratorní příručka</b>	Platnost od: 2.1.2019

#### 5.2.6.5 Biopsie a fixace blastomery

(provádí embryologická laboratoř, konkrétní detaily postupu se mohou v různých laboratořích odlišovat)

##### Princip:

Fixace biologického materiálu je nezbytná k následné analýze aneuploidií nebo translokací metodou fluorescenční in situ hybridizace (FISH). Nejprve je odebraný materiál (polární tělísko a blastomery) umístěn do hypotonického roztoku, jenž zapříčiní osmotickou nerovnováhu mezi blastomery a okolím, kdy blastomera začne přijímat velké množství vody, které v některých případech způsobí prasknutí cytoplasmatické membrány a vylití obsahu do okolí. Mimo to hypotonický roztok rozvolňuje vlákna DNA a tudíž dekondukuje chromatin. Dalším působením fixativu, jímž je kyselina octová a methanol v poměru (1:3), dojde ke kompletnímu odstranění zbytků cytoplasmy, které interferují s DNA značenou sondou, jelikož ji na sebe nespecificky váží a vznikají tak artefakty. Fixativ má rovněž za následek denaturaci DNA, což je změna stavu DNA z dvouvláknového na jednovláknový a také permanentní uchycení vlákna na sklo (konkrétně methanolem).

Vystavení DNA fixativu po příliš dlouhou dobu však způsobuje nekvalitní hybridizaci značené sondy, jelikož jsou při excesivním působení fixativu odstraněny spolu s cytoplasmatickými proteiny i proteiny vázící se na DNA, které jsou však nezbytné pro správné navázání sondy a tudíž úspěšnou hybridizaci.

Mezi odstraněním cytoplasmy a délkou fixace musí být nalezena rovnováha.

##### Vlastní provedení:

a) Na inverzní mikroskop umístíme bioptační misku a vyhledáme v kapce blastomery. Do pipety nasajeme malé množství hypotonického roztoku (KCl - 0,075M roztok ) z Petriho misky. Pipetu ponoříme do kapky s blastomery pod stálou kontrolou v inverzním mikroskopu a u blastomery vypustíme malé množství roztoku do okolí, poté necháme kapilární elevací nasát blastomery do pipety.

b) Z krabičky si vezmeme zkontrolované podložní sklo a umístíme ho na inverzní mikroskop. Zaostríme na okraj skla, abychom měli správnou rovinu, a sklo umístíme tak, aby kapka s blastomery ležela v dolních 2/3 skla a další kapky umístíme viz obrázek 1.

Nováková		
1 n+	●	●
2 n+	1	2
3 frg	●	●
4 kond	3	4

Obr. 1

c) Po nalezení roviny a umístění skla do správné pozice, za současného stálého držení pipety s nasátou blastomery položíme hrot pipety na sklo a vyfoukneme malé množství tekutiny. V momentě kdy vidíme, že v kapce je již přítomna blastomera, přestaneme tekutinu vypouštět.

Diamantovým popisovačem vyznačíme okolo kapky jemně hranice, aby bylo po zaschnutí tekutiny možno lokalizovat místo, kde byla blastomera, a kruh označíme příslušným číslem blastomery. Necháme tekutinu kompletně zaschnout.

<b>FertiCare SE</b> provozovna Bělehradská 14, Karlovy Vary 360 01 <b>Laboratoř lékařské genetiky</b>	Vydání: 13.
<b>Laboratorní příručka</b>	Platnost od: 2.1.2019

- d) Začneme k blastomeře přikapávat fixaci, blastomera se začne „nafukovat“ a její povrch „zezlátne“. Můžeme vidět, jak s každým přikápnutím odplovává cytoplazma, která se jeví jako černý proud artefaktů. Jádro je v tu dobu viditelné jako zářící ploška.
- e) Když již neodplouvá žádná cytoplazma, můžeme ukončit fixaci. V momentě, kdy již nepřikapáváme, se jádro přilepí na sklo v místě, kde se momentálně nachází a tato pozice je konečná.
- f) Vezmeme diamantový popisovač a opatrně okolo jádra uděláme jemný kroužek, jenž slouží k zaznamenání jeho pozice.
- g) Sklo sundáme z inverzního mikroskopu a vizuálně nalezneme malý kruh, uvnitř kterého je jádro a ze spodu skla vyryjeme kroužek okolo tohoto kruhu a dále číslo blastomery. Viz obr. 1.
- h) Na sklo umístíme stejným způsobem 4 - 6 jader. Sklo nakonec popíšeme tužkou jménem pacientky, počtem jader.
- i) Sklo nebo skla jsou umístěna do plastové krabičky a zalepena - zabrání se tím rozbití skla nebo jeho jinému znehodnocení. Skla se nesmí v plastové krabičce hýbat.

#### Transport a skladování:

Za transport odpovídá indikující pracoviště. Skla musí být do laboratoře dopravena nejpozději v den biopsie před skončením pracovní doby.

Vzorek doprovází Transportní protokol (samostatná příloha LP – F 30/xx je volně přístupný ke stažení). Vhodný je rovněž protokol o fixaci, kde jsou zaznamenány informace o kvalitě, biopsii a fixaci jednotlivých blastomer. Číslování blastomer musí být nezaměnitelné tak, aby bylo zaručeno jednoznačné přiřazení odpovídajícímu embryu.

Datum biopsie indikující lékař vždy předem konzultuje s vedoucí laboratoře, aby byla zajištěna přítomnost kvalifikovaných pracovníků pro provedení vyšetření (včetně sobot a nedělí).

Pokud není možno sladit den biopsie s přítomností kvalifikovaných pracovníků v Laboratoři lékařské genetiky, kontaktuje vedoucí laboratoře ve spolupráci s indikujícím lékařem vedoucí spolupracující akreditované laboratoře (Genetika Plzeň s.r.o.), která zajišťuje zastupitelnost vyšetření.

#### 5.2.6.6 Odběr trofektodermu (TE)

##### Princip a vlastní provedení:

Princip odběru TE je podobný jako u biopsie blastomer. Bioptační misky na odběr TE jsou shodné s biopsií blastomer v den 3. Stejně tak plnění pipetek pryskyřicí a jejich nastavení je shodné. Rozdíl je zejména ve dni, kdy se biopsie TE provádí - 5. den (někdy je možné i 6.) kultivace, kdy jsou již zřetelně rozlišené buňky embryoblastu a trofektodermu. Ideální načasování biopsie je ihned po vytvoření hernie na povrchu embrya. Pokud tomu tak není, přistupuje se k odběru ve stádiu expandované blastocysty, kdy se používá otevřená zona pellucida po asistovaném hatchingu nebo se pomocí laseru o malém pulsu udělá malý otvor na protější straně od embryoblastu. Otvorem se pak vsune bioptační pipeta (o průměru 15  $\mu$ m) a jemným nasáváním se zkolabuje blastocysta. Poté se odebere 5 - 8 buněk TE.

Embryo se po biopsii TE opláchne v kultivačním médiu a vitrifikuje. Odebraný TE se přenese pomocí 120  $\mu$ m pipetky do mikrozkuřavky s malým množstvím PBS (3  $\mu$ l). Mikrozkuřavky s PBS dodá Laboratoř lékařské genetiky. Každá mikrozkuřavka musí být jednoznačně označena číslem daného embrya tak, aby se zabránilo možné záměně.

<b>FertiCare SE</b> provozovna Bělehradská 14, Karlovy Vary 360 01 <b>Laboratoř lékařské genetiky</b>	Vydání: 13.
<b>Laboratorní příručka</b>	Platnost od: 2.1.2019

Transport a skladování:

Za transport odpovídá indikující pracoviště. Odebraný TE je před transportem do genetické laboratoře třeba uchovávat v mrazáku při min. -20 °C. Samotný transport mikrozkupek by měl probíhat v namraženém stojánku, aby se zabránilo nadměrnému zahřátí vzorku a tím lyzi buněk. Vzorek doprovází Žádanka o laboratorní vyšetření s uvedeným počtem bioptovaných embryí.

Datum transportu bioptovaného TE indikující lékař vždy předem konzultuje s vedoucí laboratoře, aby byla zajištěna přítomnost kvalifikovaných pracovníků pro převzetí a uchování bioptovaného materiálu pro následné vyšetření.

5.2.6.7 Odběr ejakulátu

Požadavky na primární vzorky:

Odběru předchází třídní pohlavní abstinence. Spermie se získávají masturbací a ejakulací spermatu do vhodné sterilní nádoby (kelímku) v hygienických podmínkách. Je třeba pečlivě umýt ruce a penis a smýt mýdlo. V embryologické laboratoři je poté vyšetřen nativní spermioqram a vzorek je následně upraven gradientovou centrifugací.

Druh odběrové nádoby a přídavných látek:

Sterilní odběrová nádoba.

Transport a skladování:

Materiál je třeba dopravit do laboratoře v den odběru. V jiném případě je nutná kryokonzervace spermií. Vyšetření se pak provádí v den rozmrazení vzorku.

### **5.3 Transport a manipulace s biologickým materiálem (se vzorky)**

***Informace k dopravě:***

- doprava materiálu má být šetrná, rychlá a musí být dodržovány specifické podmínky uvedené v rámci kapitoly 5.3, zejména dodržení času a podmínek transportu. Viz tabulka.
- s materiálem se nesmí během přepravy prudce manipulovat, aby nedošlo k mechanickému poškození – vhodná přeprava v transportních boxech (určených přímo pro přepravu vzorků)
- žádanky 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 v den odebrání, uložíme jej 30 min. po odběru do lednice (2 – 8 °C)
- skla s fixovanými blastomery je nutno dopravit do laboratoře v den biopsie
- vzorky TE se přepravují zmrazené, po domluvě s laboratoří (nesmí rozmraznout)

**Upozornění:**

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

<b>FertiCare SE</b> provozovna Bělehradská 14, Karlovy Vary 360 01 <b>Laboratoř lékařské genetiky</b>	Vydání: 13.
<b>Laboratorní příručka</b>	Platnost od: 2.1.2019

### TABULKA

Preanalytická fáze vyšetření – přehled

Wyšetření	Primární vzorek	Odběrový systém	Množství	Teplota transportu	Doba doručení	Doba odezvy laboratoře od doručení
<b>Vždy nutný informovaný souhlas pacienta</b>	periferní krev	Heparin Vacuette zelená (cytogenetická vyš. - karyotyp, FISH)	4 ml	2 - 8 °C	max. 5 dnů	2 - 4 týdny
	fetální krev		1 - 2 ml			
	periferní krev	EDTA Vacuette fialová (molekulárně genetická vyš.)	2 ml		týden	
	fetální krev		1 - 2 ml			
	bukální stěr	sterilní výtěrka	2x	2 - 25 °C		
	plodová voda	Vacuette žlutá	20 ml	2 - 8 °C	max. 24 hod.	
	tkáň plodu	fyzilogický roztok	min. 1 cm <sup>3</sup>			
	ejakulát	sterilní zkumavka	1 ml	2 - 25 °C	den odběru či rozmražení	
	blastomera (pouze FISH)	podložní sklo s fixovanými buňkami			den biopsie	
	trofektoderm	mikrozkumavky s PBS		-20 °C	do 14 dnů	

**Při odběru periferní krve a plodové vody nepoužívat dezinfekci s obsahem jódu.**

**Po odběru:**

1. 8 - 10x převrátit
2. Nechat vychladnout 30 min při pokojové teplotě
3. Uložit do lednice

<b>FertiCare SE</b> provozovna Bělehradská 14, Karlovy Vary 360 01 <b>Laboratoř lékařské genetiky</b>	Vydání: 13.
<b>Laboratorní příručka</b>	Platnost od: 2.1.2019

## **5.4 Příjem vzorku do laboratoře**

Příjem primárních vzorků probíhá po celou pracovní dobu laboratoře, po domluvě i jindy. Všichni pracovníci laboratoře jsou oprávněni přijímat vzorky. Podložní sklíčka s fixovanými blastomerami jsou předávána pouze na základě domluvy s vedoucí laboratoře. Po převzetí biologického materiálu pracovník provede kontrolu vhodnosti odběrového systému vzhledem k požadovanému vyšetření, kontrolu správnosti identifikace, množství materiálu a vizuální kontrolu nepoškozenosti a čistoty odběrové nádoby (viz kapitola 5.2.1). Zkontroluje, zda připojená žádanka obsahuje veškeré potřebné údaje k provedení požadovaného vyšetření (viz kapitola 5.2.2).

Pracovník uvede na žádanku své jméno (parafa nebo iniciály), datum a čas. Tím stvrzuje, že biologický materiál je přijat ke zpracování.

Vznikne-li nejistota ohledně identifikace primárního vzorku a jedná-li se o nenahraditelný nebo kritický primární vzorek, vedoucí laboratoře zhodnotí, zda může přistoupit k jeho zpracování, ale výsledky se nesmí uvolnit, dokud indikující lékař nepřevzme odpovědnost za identifikaci vzorku.

Po provedené kontrole je vzorek a žádanka označena přiřazeným laboratorním číslem a je zapsána do LIS s uvedením:

- laboratorního čísla na požadovaná vyšetření
- čísla karty
- jména, příjmení, rodného čísla pacienta (příp. data narození u cizinců), pojišťovny
- odbornosti žadatele o vyšetření
- data a času odběru vzorku
- data a času příjmu, požadavku, podpisu pracovníka, který vzorek přijal

Shoda údajů v LIS, na žádance a primárním vzorku je překontrolována dalším pracovníkem.

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

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

<b>FertiCare SE</b> provozovna Bělehradská 14, Karlovy Vary 360 01 <b>Laboratoř lékařské genetiky</b>	Vydání: 13.
<b>Laboratorní příručka</b>	Platnost od: 2.1.2019

#### 5.4.1 Možné neshody při příjmu materiálu

- ✗ žádanka s biologickým materiálem, kde chybí nebo jsou nečitelné základní údaje (viz žádanka o laboratorní vyšetření)
- ✗ žádanka nebo odběrová nádoba znečištěná biologickým materiálem
- ✗ nedostatečné množství biologického materiálu nutného pro zpracování (např. z důvodu rozlití či rozbití během transportu)
- ✗ nádoba 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 5.2.1)
- ✗ nádoba s biologickým materiálem, kde zjevně došlo k porušení podmínek pro odběr nebo transport biologického materiálu (výsledky vyšetření by byly negativně ovlivněny kvalitou materiálu - například nedodržení času transportu do laboratoře, nevhodná transportní teplota, nevhodná odběrová nádoba)
- ✗ biologický materiál bez žádanky (bez uvedení požadavků oprávněné osoby)
- ✗ žádanka muže od subjektu s odborností gynekologie, pokud není souvislost s diagnózou partnerky
- ✗ žádanka dospělého pacienta od zdravotnického subjektu s odborností pediatrie (pokud nemá zároveň odbornost lékařská genetiky)
- ✗ žádanka ambulantního pacienta od subjektu s odborností lůžkového oddělení

#### 5.4.2 Způsob řešení neshod při příjmu materiálu

- Neúplnost údajů na žadance - ihned se komunikuje s žadatelem o vyšetření a zajistí se veškeré informace pro možnost zpracování materiálu a uvolnění výsledků.
- Pokud je dodán materiál bez žádanky, nebo není jednoznačně identifikovaný a jedná se o nenahraditelný vzorek, laboratoř začne tento materiál vždy zpracovávat, ale výsledky nebudou uvolněny, dokud žadající lékař nebo osoba odebírající materiál nepřevzme odpovědnost za doplnění správných identifikačních údajů. V případě chybějící dokumentace je externí žadatel požádán o zaslání příslušné žádanky.
- Neshody při příjmu materiálu se zapisují do Knihy neshod s uvedením data, identifikace pacienta, pracovníka laboratoře a neshody, rovněž komu byla neshoda hlášena.
- Nedodržení transportních podmínek (vč. doby dodání) je zaznamenáno v LIS a uvedeno ve výsledkovém listě.
- V případě, že vzorek nelze zpracovat (znehodnocen, neoprávněný požadavek, nedostatečné množství), pracovník laboratoře informuje telefonicky žadatele a požádá o nový odběr. O situaci je veden záznam v Knize neshod. Vzorek je vždy zaevidován i v LIS.



FertiCare SE provozovna Bělehradská 14, Karlovy Vary 360 01 <b>Laboratoř lékařské genetiky</b>	Vydání: 13.
Laboratorní příručka	Platnost od: 2.1.2019

## 6. Fáze po vyšetření

### 6.1 Bezpečné odstraňování materiálů použitých při vyšetření

Materiál použitý při vyšetření 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. 306/2012 Sb. ve znění pozdějších předpisů.

### 6.2 Manipulace a skladování biologického materiálu

V průběhu zpracování je materiál uchováván dle podmínek uvedených v jednotlivých SOP pro vyšetření a tak, aby nedošlo k jeho znehodnocení.

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

#### 6.2.1 Skladování před a v průběhu vlastního vyšetření

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

Konkrétní specifika jsou uváděna v SOP pro dané vyšetření.

#### 6.2.2 Skladování po vyšetření

Materiál může být použit pro opakovanou kultivaci nebo dodatečná vyšetření.

##### Primární vzorky:

- *periferní krev* - odběrové zkumavky s heparinem mohou být uchovány po dobu cca jednoho týdne, odběrové zkumavky s EDTA mohou být uchovány cca měsíc.

Po vydání výsledků jsou primární vzorky likvidovány jako nebezpečný odpad a pro další možná dovyšetření je uchováván zpracovaný vzorek po níže definovanou dobu. Při likvidaci vždy odpovědný pracovník znovu kontroluje shodu jména a čísla na zkumavce s příslušnou laboratorní knihou.

##### Sekundární vzorky:

*izolovaná DNA* je se souhlasem pacienta dále uchovávána v mrazáku po neomezenou dobu

- *suspenze (suspenze kultivovaných buněk)* – se uchovává v mrazáku, po dobu minimálně 1 roku, suspenze s patologickým nálezem uchováváme neomezeně
- *fluorescenčně značený PCR amplifikát* je uchováván na tmavém místě v lednici do vydání výsledků
- *trvalé preparáty (skla)* - jsou uchovávány 1 - 30 let při pokojové teplotě
- *FISH preparáty (skla)* - uchovávány v lednici, po dobu max. 1 roku (dle intenzity signálu)

<b>FertiCare SE</b> provozovna Bělehradská 14, Karlovy Vary 360 01 <b>Laboratoř lékařské genetiky</b>	Vydání: 13.
<b>Laboratorní příručka</b>	Platnost od: 2.1.2019

### **6.3 Dodatečná vyšetření a časový interval pro jejich požadování**

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

Kvalita případného dalšího opakovaného vyšetření nebo dovyšetření může být ovlivněna dobou a metodou skladování, která je uvedena výše. Dodatečná vyšetření je možné požadovat telefonicky. V rámci společnosti není požadována nová žádanka na dodatečné vyšetření, externí žadatel vždy dodá žádanku k požadovanému dovyšetření, interní žadatel doplní požadavek do původní žádanky.

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

Doindikovaná vyšetření zaznamená pracovník laboratoře do LIS k danému vzorku a uvede:

- datum a druh požadovaného vyšetření
- identifikaci pracovníka přijímajícího požadavek

### **6.4 Opakování vyšetření stejného primárního vzorku**

Je-li potřeba opakovat vyšetření kvůli verifikaci výsledku, z důvodu nedostatečné kvality vyšetření, neúspěchu vyšetření, nebo podezření na nesprávně vydané výsledky, takové vyšetření provede laboratoř na vlastní náklady. V případě, že již primární vzorek není k dispozici, komunikuje se žadatelem o potřebě zopakovat vyšetření vždy vedoucí laboratoře.

## **7. Vydávání výsledků a komunikace s laboratoří**

### **7.1 Informace o formách vydávání výsledků**

Laboratoř používá v současné době jeden způsob vydávání výsledků, a tím je tisk výsledkových listů přes laboratorní informační systém LIS Envis.

Výsledky musí být čitelné a bez přepisů.

Před vydáním jsou všechny výsledky kontrolovány dvěma pracovníky a schváleny vedoucím laboratoře.

Zprávu s normálním výsledkem v podobě zapsaného výsledku dle nomenklatury ISCN 2016, s krátkým komentářem, předává laboratoř indikujícímu lékaři. Výsledky uvolňuje vedoucí laboratoře.

Zprávu s patologickým nálezem od indikujícího lékaře společnosti předává laboratoř do genetické ambulance klinickému genetikovi, který sestaví pro indikujícího lékaře genetickou zprávu s klinicko-genetickým doporučením. Interpretaci výsledků z externích zařízení provádí odborný garant Laboratoře lékařské genetiky.

Zprávu s pozitivním nálezem vydá laboratoř indikujícímu lékaři bez klinicko-genetické interpretace pouze na základě písemné žádosti.

Komunikace telefonem je užívána jen v případě nebezpečí z prodlení, řešení naléhavého problému, k zajištění potřebných chybějících informací apod. Telefonicky hlásí výsledky pouze vedoucí laboratoře, vždy se přesvědčí, že výsledky sděluje oprávněné osobě. O hlášení je veden záznam v LIS.

<b>FertiCare SE</b> provozovna Bělehradská 14, Karlovy Vary 360 01 <b>Laboratoř lékařské genetiky</b>	Vydání: 13.
<b>Laboratorní příručka</b>	Platnost od: 2.1.2019

## **7.2 Změny výsledků a nálezů**

Ke změně výsledků by nemělo docházet.

V případě, že laboratoř zjistí chybně vydaný nález, komunikuje s žadatelem vždy vedoucí laboratoře. Žadateli o vyšetření (ošetřujícímu lékaři) je dodán nový opravný výsledkový list se správnými výsledky. Případ je evidován jako neshoda.

## **7.3 Intervaly od dodání materiálu k vydání výsledků**

Vzorky jsou průběžně zpracovávány podle požadovaného vyšetření v pořadí, ve kterém jsou přijímány do laboratoře. Po domluvě s vedoucí laboratoře lze v odůvodněných případech zajistit přednostní zpracování vzorku.

Doba pro provedení požadovaného vyšetření od příjmu vzorku do vydání závěrečné zprávy při běžném provozu je 2 - 4 týdny (viz tabulka str. 20).

Vzorky fetálních buněk (aminocentéza, kordocentéza, aborty) jsou zpracovány přednostně. Skla s blastomery jsou zpracována ihned po dodání do laboratoře, výsledek je dodán do 2 dnů - před plánovaným transferem.

## **7.4 Konzultační činnost laboratoře**

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

## **7.5 Způsob řešení stížností**

Stížnost lékaře, pacienta a ostatních účastníků je podnětem pro zlepšení práce laboratoře. Každá uplatněná stížnost je prošetřena.

Stížnost lze podávat na:

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

Způsob podání stížnosti:

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

Termíny pro vyřízení stížnosti:

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

FertiCare SE provozovna Bělehradská 14, Karlovy Vary 360 01 <b>Laboratoř lékařské genetiky</b>	Vydání: 13.
Laboratorní příručka	Platnost od: 2.1.2019

## 8. Přílohy

### Samostatné přílohy volně ke stažení:

- Souhlas vyšetřované/ho (zákonného zástupce) s genetickým laboratorním vyšetřením
- Žádanka o cytogenetické vyšetření
- Žádanka o molekulárně genetické vyšetření
- Protokol o transportu biologického materiálu