

## **V. Stanovení HLA (SOP 05)**

### **Požadavky na odběry**

#### **•Odběr krve do EDTA**

Periferní krev se odebírá v množství 2 ml do protisrážlivého roztoku EDTA případně ACD. Je nutné dostatečné množství jaderných buněk v krvi při odběru (min.  $1,5 \times 10^9/l$  leukocytů, při nižším počtu leukocytů je třeba odebrat větší množství krve, cca 10 ml).

**Krev v EDTA je možno skladovat při 2-8°C až 10 dní.**

*Každá zkumavka musí být náležitě označena identifikačními údaji vyšetřované osoby, datem a časem odběru.*

### **Dodání vzorků**

#### **•Uchování a přeprava:**

maximálně 12 hod při pokojové teplotě do 22°C. V případě, že transport probíhá z objektivních důvodů déle než 12 hod. nebo za teploty vyšší než 22 °C, je nutné primární vzorky zasílat v chladícím boxu nejdéle do 48 hod.

Vzorky s řádně vyplněnou žádankou musí být dodány do NRL pro DNA diagnostiku, budova C, přízemí (zvonek: HLA příjem vzorků)

**Příjem vzorků na genotypizaci není nutno objednávat. Pro provedení genotypizace je požadována indikace k HSCT.**

Bez této indikace bude provedena pouze izolace DNA. Požadovaná genotypizace bude z této DNA provedena bezprostředně po indikaci k HSCT na základě informace z indikačního semináře ÚHKT (u dospělých pacientů). Pro indikace k HSCT pro dětské pacienty je v kompetenci hlavního transplantologa transplantační jednotky KDHO Motol.

Informace lze získat na telefonu **221 977 397** (interní linky ÚHKT **397** a **484**, případně **307**).

**Ke každému provedenému odběru je třeba dodat řádně vyplněný Protokol o převzetí primárního vzorku C\_F\_17A/05 (žádanka).**

Tento je možné najít na internetových stránkách [www.uhkt.cz](http://www.uhkt.cz) (strana <http://www.uhkt.cz/nrl/nrl-dna/lekari>). V něm musí být náležitě identifikován lékař oprávněný indikovat vyšetření (včetně adresy klinického žadatele a jeho telefonního, ev. faxového spojení). Protokol o převzetí vzorku C\_F\_17A/05 musí obsahovat jednoznačnou identifikaci vyšetřované osoby, včetně čísla zdravotní pojišťovny a číselného označení diagnózy, a údaj o datu a času odběru primárního vzorku.

**Vyšetření nelze provést u pacientů po transplantaci hematopoetických kmenových buněk nebo po infuzi dárcovských lymfocytů.**

DNA vyizolovaná z primárních vzorků je v NRL pro DNA diagnostiku značena a uchována dle platných interních předpisů. Doba jejího uchování je neomezená. Tuto DNA lze po kontrole kvality (provedené interně) použít pro další genotypizaci HLA vyžádanou zadavatelem. Požadavky na taková vyšetření jsou přijímána na novém Protokolu o převzetí primárního vzorku C\_F\_17A/05 (žádanka), na základě rozhodnutí interní indikační komise,

případně telefonicky od hlavních zadavatelů (transplantologů ÚHKT a KDHO Motol, transplantačního koordinátora a koordinátorů registru nepříbuzných dárců )

## Postup při odběrech na HLA vyšetření pro alloHSCT

### 1. při diangoze/indikaci k HSCT

a. 1. odběr pacienta: **1x krev do EDTA (2 ml)**

b. 2. nezávislý odběr pacienta: **1x krev do EDTA (2ml)**

•*Oba odběry mohou být v případě potřeby provedeny v jeden den, ale s označením času odběru na zkumavce i protokolu, respektive jasným odlišením obou odběrů (pravá ruka, levá ruka,...).*

c. Současně vždy odběr **přímých** pokrevních příbuzných:  
(sourozenci, rodiče, případně děti pacienta)

**1x krev do EDTA (2 ml)**

**- odběr lze po dohodě provést mimo transplantační centra, v místě bydliště příbuzných, musí být dodrženy výše uvedené podmínky odběru a dodání vzorků, organizace takových odběrů je v kompetenci ošetřujícího lékaře daného pacienta**

Z odběrů je provedena izolace DNA a po indikaci k HSCT komplexní HLA analýza. Standardně je v tomto kroku u pacienta, jeho rodičů a všech sourozenců provedena genotypizace HLA-A, -B, -DRB1 na úrovni určení alelických skupin (low resolution) a stanovení haplotypů. Při nejasnostech v určení haplotypů je provedena i genotypizace na úrovni určení jednotlivých alel (high resolution).

Ze všech vyšetření v tomto kroku je vydán souhrnný výsledek včetně určení HLA haplotypů pacienta, definování HLA shody s vyšetřenými příbuznými, případně doporučení pro další postup.

**Poznámka:** Výsledky vyšetření jednotlivých vyšetřených osob jsou vydávány na Protokolu o výsledku laboratorních zkoušek C\_F\_17B/05.

Tyto výsledky jsou zaslány zadavateli a ostatním kompetentním osobám účastnícím se procesu vyhledávání dárců dle rozdělovníku.

Kompetentními osobami v procesu vyhledávání dárců jsou:

Dr. Vítek – hlavní transplantolog ÚHKT

Doc. Sedláček – hlavní transplantolog KDHO FN Motol

Pi Waldmannová – transplantační koordinátor ÚHKT

Pi Černá – transplantační koordinátor I.interní kliniky VFN

Pi Hrabětová - transplantační koordinátor FN Královské Vinohrady

Dr. Ivašková, ( vz.Ing.Kupková )– pražský registr nepříbuzných dárců (+ komunikace se zahraničními registry)

Dr. Pittrová – plzeňský registr nepříbuzných dárců

Souhrnný výsledek typizace pacienta a pro něj typizovaných dárců je vydáván jako příloha k Protokolu o výsledku laboratorních zkoušek C\_F\_17B/05 a není veden v akreditovaném režimu.

## 2. po určení shody/neshody s přímými pokrevními příbuznými

### a. Nalezen HLA shodný příbuzný dárce → odběry pro konfirmační vyšetření

*Pacient bez odběru*

–vyšetření je provedeno z DNA z dříve dodaného 2. nezávislého odběru pacienta (viz výše)

*Vybraný dárce druhý náběr krve do EDTA* (pokud nebylo provedeno dříve)

Konfirmace je provedena genotypizací na úrovni určení alelických skupin (low resolution) v lokusech HLA-A,-B,-C,-DRB1,-DQB1.

### b. Nenalezen vhodný dárce:

→ **hledání v širší rodině (nutná součinnost s oddělením HLA analýzy)**

–*Dle dohody na indikačním semináři na základě klinického stavu pacienta a jeho HLA feno/genotypu*

*Vybrání dárce 1x krev do EDTA (2 ml)*

U dárce je provedena genotypizace HLA-A, -B, -DRB1 na úrovni určení alelických skupin (low resolution), u dárce shodných s pacientem pokračuje typizace jako u dárce nepřibuzných.

→ **nebo indikace k nepřibuzenské alloH SCT**

– *Doplnění vyšetření HLA genotypu na úrovni high resolution z dříve dodaných vzorků pacienta provádí NRL na základě rozhodnutí z indikačního semináře.*

–

*Nahlédnutí do registru, výběr a objednání nepřibuzných dárce pro konfirmační vyšetření provádí transplantační koordinátor v součinnosti s Dr. Vítkem/ Doc. Sedláčkem na základě výsledků HLA genotypizace pacienta dodaných z NRL.*

## 3. Po nalezení alternativního dárce

### a. Nalezen dárce v širší rodině → odběry pro konfirmační vyšetření:

*Pacient bez odběru*

–vyšetření je provedeno z DNA z dříve dodaného 2. nezávislého odběru pacienta (viz výše)

*Vybraný dárce druhý náběr krve do EDTA* (pokud nebylo provedeno dříve)

### b. Nalezen vhodný nepřibuzný dárce dle výpisu z registru → odběry pro konfirmační vyšetření:

*Pacient bez odběru*

–vyšetření je provedeno z DNA z dříve dodaného 2. nezávislého odběru pacienta (viz výše)

*Dárce: organizuje transplantační koordinátor ÚHKT –pí. Waldmannová*

U pacienta i vybraného dárce je provedena v rámci konfirmačního vyšetření genotypizace lokusů HLA-A, -B, -Cw, -DRB1 a -DQB1 na úrovni určení jednotlivých alel (high resolution). Platí pro dárce v širší rodině i pro nepřibuzné dárce.

**Kontakt:**

RNDr. Marie Dobrovolná – vedoucí oddělení HLA analýzy:

•telefon: 2219773484,

•e-mail: [marie.dobrovolna@uhkt.cz](mailto:marie.dobrovolna@uhkt.cz)

Příjem vzorků a objednávání vyšetření:

•telefon: 221977397

•E-mail: [306-hla@uhkt.cz](mailto:306-hla@uhkt.cz)

# Vzor řádně vyplněné žádanky

C\_F\_17A/05s

Ústav hematologie a krevní transfuze  
Národní referenční laboratoř pro DNA diagnostiku  
Oddělení HLA analýzy

VEDOUCÍ LABORATOŘE: RNDr. Marie Dobrovolná  
U Nemocnice 1, 128 20 Praha 2  
Tel: 221977-397,-484, fax: 221977371, e-mail:marie.dobrovolna@uhkt.cz

## Protokol o převzetí primárního vzorku

Požadované vyšetření: **HLA genotypizace**

### ZADAVATEL (razítko a podpis)

Jméno a adresa: IČP: Odbornost:  
Tel./fax/mail:

### VYŠETŘOVANÝ MATERIÁL

Vyšetřovaný jedinec: **VIČKOVÁ Markéta**  
Diagnóza: **Z523** Rodné číslo: **715508/1598** Pojišťovna: **211**  
 Pacient  Potencionální dárcce: Jeho příjemce( jméno+r.č.)**Novák Ivo(6801021453)**  
Příbuzenský vztah: **sestřenice**  ze strany matky  
 ze strany otce  
Číslo materiálu zadavatele:  
Odebraný materiál:  periferní krev v EDTA  jiný.....

**Datum a čas odběru: 15. 3. 2006 7:50**

Předcházející typizace (vč. rodinné studie):  ne  ano – **přiložte čitelnou kopii výsledků**

#### Požadované vyšetření:

low resolution HLA II. třídy: -DRB1; -DQB1  high resolution HLA II. třídy: -DRB1; -DQB1  
 low resolution HLA I. třídy: -A; -B; -C  high resolution HLA I. třídy: -A; -B; -C  
 izolace DNA  jiné/zdůvodnění:.....

#### Indikace vyšetření:

příbuzenská alloHSCT  nepříbuzenská alloHSCT  
 confirmace před alloHSCT  potenciální alloHSCT  
 jiná.....

**Poznámka: Odběr primárního vzorku byl proveden s informovaným souhlasem pacienta a podle pokynů Příručky pro odběr primárního vzorku.**

Při převzetí v NRL:

Číslo NRL materiálu:

Datum a čas dodání do laboratoře:

Materiál převzal a přezkoumal dle Směrnic o přezkoumání objednávek: