

--	--	--	--

1 PRIMÁRNÍ ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ A TYPIZACE HLA

- Izolace DNA ze dvou nezávislých primárních vzorků při diagnóze u všech pacientů potenciálně indikovaných k HSCT.
Současně izolace DNA z primárních vzorků všech dostupných sourozenců, rodičů a případně dětí pacienta, kteří mohou být potenciálními dárci HSCT.
- Genotypizace pacienta v lokusech HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, -DPB1 na úrovni high resolution (HR). U dospělých pacientů z ÚHKT genotypizace také v lokusu HLA-DQA1, u jiných pacientů na vyžádání klinického zadavatele.
- Současně genotypizace HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 a -DPB1 na úrovni low/high resolution (LR/HR) u všech dostupných sourozenců, rodičů a dětí, kteří mohou být potenciálními dárci HSCT. Genotypizace lokusu HLA-DQA1 u darců dospělých pacientů ÚHKT, u jiných pacientů na vyžádání klinického zadavatele.
- Určení míry genotypové shody HLA mezi pacientem a všemi pro něj testovanými dárci.
- Genotypizace rodičů dětských pacientů pro určení haplotypů (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, -DPB1) na úrovni low resolution (LR).
- Stanovení haplotypů, pokud jsou výsledky rodinné studie informativní.


Predikce imunogenicity lokusu HLA-DPB1

Stejně jako u ostatních lokusů je z hlediska výběru vhodného dárce nejlepší shoda v lokusu HLA-DPB1. V případě tohoto lokusu mají různé typy neshod odlišný vliv a některé z nich jsou tolerovatelné (1). Dle HLA-DPB1 genotypu pacienta a jeho příbuzných darců je provedena predikce imunogenicity neshod mezi pacientem a dárce v HLA-DPB1 lokusu. Ta je vyhodnocena pomocí databáze DPB1 T-Cell Epitope Algorithms Version 2.0 (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/dpb.html>) a dárce je zařazen do jedné ze tří kategorií dle vlivu neshody (Non-Permissive GvH, Non-Permissive HvG, Permissive), na výsledkovém protokolu uvedeno v Komentáři.

KIR genotypizace u darců dospělých pacientů ÚHKT, u darců jiných pacientů na vyžádání klinického zadavatele.

Predikce vhodnosti dárce dle přítomných KIR genotypů

Určité KIR genotypy se podílejí na ochraně před relapsem a zlepšeném přežití pacienta (2). Po určení přítomnosti jednotlivých KIR lokusů použití online kalkulátoru Prospective Donor KIR Typings (http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/donor_b_content.html) pro zařazení dárce do jedné ze tří kategorií dle vhodnosti dárce (Neutral, Better, Best), na výsledkovém protokolu uvedeno v Komentáři.

Laboratorní příručka Příloha 01 - Algoritmus vyšetření HLA při vyhledávání dárce HSC	 Ustav hematologie a krevní transfuze
Oddělení HLA	13900_LP_15_01

DALŠÍ TYPIZACE PROBÍHÁ AŽ PO INDIKACI PACIENTA K HSCT!!!

- Indikace k HSCT transplantačním centrem – tabulka vedena transplantačním koordinátorem ÚHKT v elektronické verzi na sdíleném disku M, komentovaná na pravidelných zasedáních interní indikační komise ÚHKT pro dospělé pacienty ÚHKT a spolupracujících center a tzv. waiting list dětských pacientů KDHO FN Motol.

Poznámka: Pokud nejsou dostupní žádní příbuzní (sourozenci, rodiče, děti), typizace není provedena, dokud není pacient indikován k HSCT.

2 PACIENT INDIKOVANÝ K HSCT OD HLA SHODNÉHO SOUROZENCE

2.1 Typizace pacienta

- **Konfirmace výsledku z nezávislého primárního vzorku v lokusech HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 a -DPB1 minimálně na úrovni low resolution (LR), standardně ale na high resolution (HR).** (Pokud byly do laboratoře již dodány dva nezávislé náběry a vyizolována DNA v dostatečné kvalitě, provádí se genotypizace z těchto náběrů a není třeba dodávat do laboratoře nový vzorek.)
- Pokud byla provedena typizace HLA všech testovaných lokusů na jiném pracovišti, provádí se genotypizace HLA-A, -B, -C, -DRB1, **-DQB1 a -DPB1 na úrovni high resolution (HR)** a konfirmace předchozích výsledků z jednoho primárního vzorku. V takovém případě je možné vydat výsledek na úrovni high resolution pouze v případě, že jsou známy výsledky předchozí typizace a jsou v souladu s naší typizací. Není-li splněn některý z těchto bodů, je třeba vyžádat nezávislý primární vzorek a ověřit získané výsledky. Pokud předchozí výsledky nejsou známy či nebyl dodán druhý nezávislý vzorek pro konfirmaci je možno vydat výsledky pouze na úrovni low resolution.
- **Genotypizace lokusu HLA-DQA1 (high resolution) se provádí pouze u dospělých pacientů ÚHKT, u jiných pacientů na vyžádání klinického zadavatele.**
- Pokud je do laboratoře dodán z externího pracoviště výsledek typizace high resolution ve všech testovaných lokusech, provedeme konfirmaci výsledků na úrovni **high resolution (v urgentních případech je minimální požadavek typizace na low resolution).**
- **U dětského pacienta je provedena rodinná studie pacienta a příbuzných dárců (otec, matka, sourozenci) pro stanovení paternálních a maternálních haplotypů, pokud jsou výsledky rodinné studie informativní.**
- **Pokud jsou k dispozici rodiče dospělého pacienta, ověřujeme haploidentickou shodu se sourozencem provedením rodinné studie.**

2.2 Typizace sourozenců

- **Konfirmace výsledků z druhého nezávislého náběru v lokusech HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 a -DPB1 minimálně na low resolution** u vybraného sourozence shodného na úrovni low/**high** resolution. (Pokud byly do laboratoře již dodány dva nezávislé náběry a **byla** vyizolována DNA v dostatečné kvalitě, provádí se genotypizace z těchto náběrů a není třeba dodávat do laboratoře nový vzorek.)

- Pokud byla provedena typizace HLA všech testovaných lokusů na jiném pracovišti, provádí se dotypizování a confirmace předchozích výsledků z jednoho primárního vzorku. Postup confirmace je identický jako u pacienta (viz bod 2.1).
- Genotypizace lokusu HLA-DQA1 se provádí pouze u dárců dospělých pacientů ÚHKT, u jiných dárců na vyžádání klinického zadavatele.
- Určení míry genotypové shody HLA mezi pacientem a všemi pro něj testovanými dárci.

2.3 Confirmace před HSCT

- Pokud genotypizace pacienta nebo dárce indikovaného k HSCT neproběhla ze dvou vzájemně nezávislých primárních vzorků, je třeba před HSCT vyžádat nezávislý primární vzorek. Z tohoto nezávislého vzorku je provedena confirmace všech lokusů minimálně na low resolution.

3 PACIENT INDIKOVANÝ K HSCT OD NEPŘÍBUZNÉHO DÁRCE

3.1 Typizace pacienta

- Genotypizace pacienta dle postupu popsaném v kapitole 2.1.
- Genotypizace lokusu HLA-DQA1 (high resolution) u dospělých pacientů ÚHKT, u jiných pacientů na vyžádání klinického zadavatele.
- Odeslání výsledků do registru nepřibuzných dárců pro vyhledání nepřibuzného dárce.

3.2 Predikce imunogenicity neshod v HLA-DPB1 lokusu

- Dle genotypu pacienta a výsledků dárců v lokusu HLA-DPB1 (pokud jsou dostupné) z dodaných výpisů z registru je provedena predikce imunogenicity v DPB1 lokusu dle postupu popsaném v kapitole 1.
- Výsledky jsou odeslány transplantacnímu koordinátorovi a klinickým zadavatelem je vybrán nejvhodnější dárce.

3.3 Typizace vybraného nepřibuzného dárce

- Ověření a upřesnění výsledku typizace z registru nepřibuzných dárců lokusů HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, -DPB1 na high resolution (HR). Genotypizace lokusu HLA-DQA1 u nepřibuzných dárců dospělých pacientů ÚHKT, u jiných pacientů na vyžádání klinického zadavatele.
- Určení míry genotypové shody HLA mezi pacientem a všemi pro něj testovanými dárci.
- KIR genotypizace u dárců dospělých pacientů ÚHKT dle postupu popsaném v kapitole 1, u dárců jiných pacientů na vyžádání klinického zadavatele.

3.4 Confirmace před HSCT

- Pokud genotypizace pacienta indikovaného k HSCT neproběhla podle kapitoly 2.1 ze dvou vzájemně nezávislých primárních vzorků, je třeba před HSCT vyžádat nezávislý primární vzorek. Z tohoto nezávislého vzorku je provedena confirmace všech lokusů minimálně na low resolution (LR), standardně ale na high resolution (HR).

Dokument zobrazený na www.uhkt.cz je aktuálně platnou verzí, po vtištění slouží pouze pro informativní účely.

- Konfirmace výsledků nepříbuzných dárců **všech lokusů minimálně** na úrovni low resolution z nezávislého náběru společného pro konfirmaci HLA a stanovení informativity pro monitorování chimerismu.

4 PACIENT INDIKOVANÝ K HAPLOIDENTICKÉ HSCT

4.1 Typizace pacienta

- Genotypizace pacienta dle postupu popsaném v kapitole 2.1.

4.2 Typizace příbuzných dárců pro haploidentickou HSCT

- Genotypizace všech dostupných sourozenců, rodičů a dětí, kteří mohou být potenciálními dárci HSCT v lokusech HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, -DPB1 minimálně na úrovni low resolution (LR). U dospělých pacientů z ÚHKT genotypizace také v lokusu HLA-DQA1, u jiných pacientů na vyžádání klinického zadavatele.
- Určení míry genotypové shody HLA mezi pacientem a všemi pro něj testovanými dárci (ve většině případů provedeno již v prvním kroku typizace pacienta a příbuzných dárců).
- KIR genotypizace u dárců dospělých pacientů ÚHKT dle postupu popsaném v kapitole 1, u dárců jiných pacientů na vyžádání klinického zadavatele.
- Po rozhodnutí indikační komise dotestování a konfirmace vybraného příbuzného dárce dle postupu v kap. 2.2.
- U potenciálně haploidentických sourozenců, kteří byli vybráni jako vhodní dárci je třeba provést ověření haploidentické shody vyšetřením jejich rodičů a stanovením haplotypů

4.3 Konfirmace před HSCT

- Pokud genotypizace pacienta nebo dárce indikovaného k HSCT neproběhla ze dvou vzájemně nezávislých primárních vzorků, je třeba před HSCT vyžádat nezávislý primární vzorek. Z tohoto nezávislého vzorku je provedena konfirmace **všech lokusů na high resolution (u dárců, pokud byla z prvního náběru provedena typizace na HR, postačí provést konfirmaci na low resolution)**.

5 POŽADAVKY NA NÁBĚRY PRO HSCT v ÚHKT / KDHO FN MOTOL

5.1 Při stanovení diagnózy potenciálně indikované k HSCT

- První náběr pacienta: 1x 2-10 ml periferní krve v EDTA
Periferní krev se odebírá v množství 2 ml do protisrážlivého roztoku EDTA, případně ACD. Je nutné dostatečné množství jaderných buněk v krvi při náběru (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 náběru.

- **Druhý NEZÁVISLÝ náběr pacienta: 1x 2-10 ml periferní krve v EDTA**
Druhý den nebo při následující návštěvě. POUZE V PŘÍPADĚ, ŽE HROZÍ EXTRÉMNI SNÍŽENÍ POČTU JADERNÝCH BUNĚK V KRVI, LZE PROVÉST DRUHÝ NÁBĚR VE STEJNÝ DEN S NOVOU IDENTIFIKACÍ PACIENTA A S JASNÝM ROZLIŠENÍM NÁBĚROVÝCH ZKUMAVEK.
Požadavky na odebíraný materiál stejné jako u prvního náběru.
- **Náběr sourozenců a dalších přímých příbuzných** (rodiče a děti pacienta – pokud jsou dostupní):
1x 2 ml periferní krve v EDTA
Požadavky na nabíraný materiál stejné jako u pacienta.

5.2 Při indikaci pacienta k příbuzenské HSCT

- **Druhý NEZÁVISLÝ náběr vybraného příbuzného dárce: 1x 2 ml periferní krve v EDTA**
Požadavky na odebíraný materiál stejné jako u pacienta.
- **Není požadován žádný další náběr pacienta**
V případě, že byly provedeny dva nezávislé náběry pacienta při stanovení diagnózy a izolovaná DNA má dostatečnou koncentraci a kvalitu, je typizace provedena z těchto DNA.

5.3 Při indikaci pacienta k nepříbuzenské HSCT

- **Konfirmační NEZÁVISLÝ náběr vybraného nepříbuzného dárce: 1x 2 ml periferní krve v EDTA**
Požadavky na odebíraný materiál stejné jako u pacienta.
- **Není požadován žádný další náběr pacienta**
V případě, že byly provedeny dva nezávislé náběry pacienta při stanovení diagnózy a izolovaná DNA má dostatečnou koncentraci a kvalitu, je typizace provedena z těchto DNA.
Dodání vzorků nepříbuzných dárců řeší transplantační koordinátor.

6 POŽADAVKY NA VZORKY NEPŘÍBUZNÝCH DÁRCŮ Z REGISTRU

6.1 Dotestování vybraného dárce z registru

1x 2 ml periferní krve v EDTA


6.2 Konfirmace HLA a stanovení chimerismu – informativita dárce před HSCT

1x 10 ml periferní krve v EDTA

jeden společný vzorek se dvěma žádankami současně s materiálem k převodu

7 LITERATURA

- Crivello P, Zito L, Sizzano F, et al. The Impact of Amino Acid Variability on Alloreactivity Defines a Functional Distance Predictive of Permissive HLA-DPB1 Mismatches in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Biol Blood Marrow Transplant (2015) 21:233-41 (1)
- S Cooley, DJ Weisdorf, LA Guethlein, JP Klein, T Wang, CT Le, SGE Marsh, D Geraghty, S Spellman, MD Haagenon, M Ladner, E Trachtenberg, P Parham and JS Miller. Donor selection for natural killer

Laboratorní příručka Příloha 01 - Algoritmus vyšetření HLA při vyhledávání dárce HSC	 Ustav hematologie a krevní transfuze
Oddělení HLA	13900_LP_15_01

cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. Blood (2010) 116:2411-9 (2)

ROZDĚLOVNÍK

Číslo výtisku	Uložení
1	Portál SMK
2.	WEB ÚHKT