



Oddělení HLA Laboratorní příručka Příloha 01 - Algoritmus vyšetření HLA při vyhledávání dárce HSC	
Výtisk č.: 02	13900_LP_15_01 Verze A3 Platnost od 1. 6. 2017

LABORATORNÍ PŘÍRUČKA

PŘÍLOHA 01


ALGORITMUS VYŠETŘENÍ HLA PŘI VYHLEDÁVÁNÍ DÁRCE HSC

Zpracovatel:	J. Nedvěďová	Podpis:	
Přezkoumal a schválil:	M. Vraná	Podpis:	
Garant dokumentu:	J. Nedvěďová	Podpis:	
Platnost od:	1. 6. 2017	Uvolněno pro systém:	1. 6. 2017
Výtisk č:	2	Počet stran:	8
Verze:	A3	Přijato do evidence:	1. 6. 2017

Oddělení HLA Laboratorní příručka Příloha 01 - Algoritmus vyšetření HLA při vyhledávání dárce HSC	
Výtisk č.: 02	13900_LP_15_01 Verze A3 Platnost od 1. 6. 2017

Obsah

1. PRIMÁRNÍ ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ A TYPIZACE HLA	3
2. PACIENT INDIKOVANÝ K HSCT OD HLA SHODNÉHO SOUROZENCE	4
2.1 Typizace pacienta	4
2.2 Typizace sourozenců	4
2.3 Konfirmace před HSCT	4
3. PACIENT INDIKOVANÝ K HSCT OD NEPŘÍBUZNÉHO DÁRCE	5
3.1 Typizace pacienta	5
3.3 Typizace vybraného nepříbuzného dárce.....	5
3.4 Konfirmace před HSCT	5
4. PACIENT INDIKOVANÝ K HAPLOIDENTICKÉ HSCT.....	6
4.1 Typizace pacienta	6
4.2 Typizace příbuzných dárců pro haploidentickou HSCT.....	6
4.3 Konfirmace před HSCT	6
5. POŽADAVKY NA NÁBĚRY PRO HSCT v ÚHKT / KDHO FN MOTOL.....	7
5.1 Při stanovení diagnózy potenciálně indikované k HSCT	7
5.2 Při indikaci pacienta k příbuzenské HSCT	7
5.3 Při indikaci pacienta k nepříbuzenské HSCT	7
6. POŽADAVKY NA VZORKY NEPŘÍBUZNÝCH DÁRCŮ Z REGISTRU	7
6.1 Dotestování vybraného dárce z registru	7
6.2 Konfirmace HLA a stanovení chimerismu - informativita dárce před HSCT	7
7. LITERATURA.....	8

Oddělení HLA Laboratorní příručka Příloha 01 - Algoritmus vyšetření HLA při vyhledávání dárce HSC	
Výtisk č.: 02	13900_LP_15_01 Verze A3 Platnost od 1. 6. 2017

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.

- Genotypizace pacienta v lokusech HLA-A, -B, -DRB1 na úrovni low resolution (LR). U dospělých pacientů z ÚHKT genotypizace také v lokusu HLA-DPB1 na úrovni medium/high resolution (MR/HR), u jiných pacientů na vyžádání klinického zadavatele.

Současně genotypizace HLA-A, -B, -DRB1 na úrovni low resolution všech dostupných sourozenců, rodičů a dětí.

- Určení míry genotypové shody HLA mezi pacientem a všemi pro něj testovanými dárči.
- Stanovení haplotypů, pokud jsou výsledky rodinné studie informativní.
- Genotypizace lokusu HLA-DPB1** u dárců dospělých pacientů ÚHKT na úrovni medium/high resolution, u jiných pacientů na vyžádání klinického zadavatele.

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 dárců 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 dárců dospělých pacientů ÚHKT, u dárců 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/cgi-bin/ipd/kir/donor_b_content.cgi) pro zařazení dárce do jedné ze tří kategorií dle vhodnosti dárce (Neutral, Better, Best), na výsledkovém protokolu uvedeno v Komentáři.

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

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

Oddělení HLA Laboratorní příručka Příloha 01 - Algoritmus vyšetření HLA při vyhledávání dárce HSC	
Výtisk č.: 02	13900_LP_15_01 Verze A3 Platnost od 1. 6. 2017

indikační komise ÚHKT pro dospělé pacienty ÚHKT a spolupracujících center a tzv. waiting list dětských pacientů KDHO FN Motol.

2. PACIENT INDIKOVANÝ K HSCT OD HLA SHODNÉHO SOUROZENCE

2.1 Typizace pacienta


- Genotypizace HLA-A, -B, -C, -DRB1 (high resolution) a -DQB1 (medium/high resolution) z nezávislého primárního vzorku (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 (high resolution) a -DQB1 (medium/high resolution) 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.
- Pokud je do laboratoře dodán z externího pracoviště výsledek typizace high resolution ve všech testovaných lokusech, provedeme konfirmaci výsledků minimálně na úrovni low resolution v lokusech HLA-A, -B a -DRB1.

2.2 Typizace sourozenců

- Genotypizace HLA-A, -B, -C, -DRB1 (high resolution) a -DQB1 (medium/high resolution) u vybraného sourozence shodného v lokusech HLA-A, -B, -DRB1 na úrovni low resolution a konfirmace výsledků z druhého nezávislého náběru. (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 dotypizování a konfirmace předchozích výsledků z jednoho primárního vzorku. Postup konfirmace je identický jako u pacienta (viz bod 2.1).
- Určení míry genotypové shody HLA mezi pacientem a všemi pro něj testovanými dárci.

2.3 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 minimálně low resolution lokusů HLA-A, -B, -DRB1.

Oddělení HLA Laboratorní příručka Příloha 01 - Algoritmus vyšetření HLA při vyhledávání dárce HSC	
Výtisk č.: 02	13900_LP_15_01 Verze A3 Platnost od 1. 6. 2017

3. PACIENT INDIKOVANÝ K HSCT OD NEPŘÍBUZNÉHO DÁRCE

3.1 Typizace pacienta

- Genotypizace pacienta dle postupu popsaném v kapitole 2.1.
- Genotypizace lokusu HLA-DPB1 u dospělých pacientů ÚHKT na úrovni medium/high resolution, u jiných pacientů na vyžádání klinického zadavatele.
- Odeslání výsledků do registru nepříbuzných dárců pro vyhledání nepříbuzného 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 transplantačnímu koordinátorovi a klinického zadavatelem je vybrán nejvhodnější dárce.
- Provádí se u dárců dospělých pacientů ÚHKT, u dárců jiných pacientů na vyžádání klinického zadavatele.

3.3 Typizace vybraného nepříbuzného dárce

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

3.4 Konfirmace 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 konfirmace minimálně low resolution lokusů HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1.
- Konfirmace výsledků nepříbuzných dárců HLA-A, -B, -DRB1 na úrovni low resolution z nezávislého náběru společného pro konfirmaci HLA a stanovení informativity pro monitorování chimerismu.

Oddělení HLA Laboratorní příručka Příloha 01 - Algoritmus vyšetření HLA při vyhledávání dárce HSC	
Výtisk č.: 02	13900_LP_15_01 Verze A3 Platnost od 1. 6. 2017

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 příbuzných dárců v lokusech HLA-A, -B, -DRB1 na úrovni low resolution.
- Určení míry genotypové shody HLA mezi pacientem a všemi pro něj testovanými dárči.
- Genotypizace lokusu HLA-DPB1 u dárců dospělých pacientů ÚHKT na úrovni medium/high resolution dle postupu popsaném v kapitole 1, u jiných pacientů na vyžádání klinického zadavatele.
- 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.

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 minimálně low resolution lokusů HLA-A, -B, -DRB1.

Oddělení HLA Laboratorní příručka Příloha 01 - Algoritmus vyšetření HLA při vyhledávání dárce HSC	
Výtisk č.: 02	13900_LP_15_01 Verze A3 Platnost od 1. 6. 2017

5. POŽADAVKY NA NÁBĚRY PRO HSCT v ÚHK / 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 EXTRÉMNÍ 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.

5.3 Při indikaci pacienta k nepříbuzenské 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.
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

Oddělení HLA Laboratorní příručka Příloha 01 - Algoritmus vyšetření HLA při vyhledávání dárce HSC	
Výtisk č.: 02	13900_LP_15_01 Verze A3 Platnost od 1. 6. 2017

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 Haagenson, M Ladner, E Trachtenberg, P Parham and JS Miller. Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood* (2010) 116:2411-9 (2)