



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

Zpracovatel:	J. Nedvěďová		
Přezkoumal a schválil:	M. Vraná		
Garant dokumentu:	J. Nedvěďová		
Platnost od:	19.1.2023		Hana Feixová
Výtisk č.:	2	Počet stran:	7
Verze:	A6	Přijato do evidence:	19.1.2023

Seznam změn a revizí řízeného dokumentu

Platnost od:	Verze	Obsah změny/ revize	Schválení revize
01.11.2015	A1	Vydání dokumentu	Ing. M. Vraná
01.03.2016	A2	Aktualizace obsahu – NRL nahrazena laboratoř	Ing. M. Vraná
01.03.2016	A2	Změna rozlišení typizace lokusu HLA-DQB1 z high resolution na low resolution, Příloha 01 verze A2	Ing. M. Vraná
30.06.2016	A2	Beze změn	Ing. M. Vraná
01.06.2017	A2	Vytvoření obsahu, doplnění genotypizace KIR a DPB1 lokusu, odstranění metod používaných pro typizaci, odstranění HLA-C lokusu z primární typizace pacienta pro určení základní shody, Příloha 01 verze A3	Ing. M. Vraná
30.06.2018	A3	Doplnění postupů C a D do související dokumentace, bod 10.1.3 odstranění primárního materiálu a DNA – nehty, Změna garanta dokumentu.	Ing. M. Vraná
28.06.2019	A3	Pravidelná revize – beze změn	Ing. M. Vraná
30.06.2020	A3	Pravidelná revize – beze změn.	Ing. M. Vraná
01.03.2021	A4	Změna loga UHKT a verze u tohoto dokumentu a jeho přílohy. Příloha 01 – verze A4	Ing. M. Vraná
01.06.2022	A5	Oprava celého textu str. 2-6 (primární zpracování vzorků, změna odkazu pro KIR str. 1, přesun testování DPB1 lokusu mezi běžně testované lokusy a doplnění o testování DQA1 u dospělých pacientů a jejich dárců. Doplnění provedení rodinných studií. Oprava testovaných lokusů na LR u konfirmací, ...).	Ing. M. Vraná
19.01.2023	A6	Doplnění odkazu na transplantační protokol str. 2.	Ing. M. Vraná

Dokument zobrazený na [portále SMK](#) je aktuálně platnou verzí, po vytištění slouží pouze pro informativní účely.

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

31.5.2024	Revize – beze změn.	Ing. M. Vraná
-----------	---------------------	---------------

Veškeré transplantace probíhají v souladu s Clinical Protocol – Guidelines for HSCT donor search, odsouhlaseným klinickými pracovníky (MUDr. Jan Vydra, Ph.D.; Prof. Petr Sedláček, MD, Ph.D.). Tento dokument 13900_F_23_01 Transplantační protokol je uložen ve složce U:\DokumentaceLaboratori\HLA\3_SOP\SOP 05\Formuláře.

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 dárců 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 dárců je provedena predikce imunogenicity neshod mezi pacientem a dárcem 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).

Dokument zobrazený na [portále SMK](#) je aktuálně platnou verzí, po vytištění slouží pouze pro informativní účely.

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

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.

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 konfirmace předchozích výsledků z jednoho primárního vzorku. Postup konfirmace je identický jako u pacienta (viz bod 2.1).
- Genotypizace lokusu HLA-DQA1 se provádí pouze u dárců dospělých pacientů ÚHK, u jiných dárců na vyžádání klinického zadavatele.
- 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 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 ÚHK, 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 transplantacnímu koordinátorovi a klinickým zadavatelem je vybrán nejvhodnější dárce.

3.3 Typizace vybraného nepříbuzného dárce

- Ověření a upřesnění výsledku typizace z registru nepříbuzných dárců lokusů HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, -DPB1 na high resolution (HR). Genotypizace lokusu HLA-DQA1 u nepříbuzných dárců dospělých pacientů ÚHK, 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 ÚHK 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 všech lokusů minimálně na low resolution (LR), standardně ale na high resolution (HR).
- 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 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)

ROZDĚLOVNÍK

Číslo výtisku	Uložení
1	Portál SMK
2.	WEB ÚHKT