

FN Ostrava	Příručka pro odběr vzorků HLA, DNA laboratoř	Strana: 1/3
-		Revize: 01

PŘÍRUČKA PRO ODBĚR PRIMÁRNÍHO VZORKU

HLA, DNA laboratoř

1 Požadavky na odběry

1.1 Molekulárně biologická vyšetření (genotypizace HLA systému, krevních skupinových systémů, mutace a polymorfismy trombofilie)

Metoda: PCR-SSP, PCR-SSPfl

Odběr vzorku:

nesrážlivá krev (EDTA, citrát sodný, ACD-A), minimální objem **2 ml** (- při počtu leukocytů nad $1,5 \times 10^9 / l$) **nebo 4 ml** (při počtu leukocytů $< 1,5 \times 10^9 / l$). Vzorek tkáně v uchovávacím roztoku.

Děti adekvátně menší objem - min. **0,5 ml** (při počtu leukocytů nad $1,5 \times 10^9 / l$) nebo **1 ml** (při počtu leukocytů $< 1,5 \times 10^9 / l$).

1.2 JAK2 Val617Phe mutace

Metoda: AS-PCR, Real-Time PCR (konfirmační vyšetření)

Odběr vzorku příjemce: nesrážlivá krev (EDTA, citrát sodný, ACD-A), minimální objem **5 ml** (- při počtu leukocytů nad $1,5 \times 10^9 / l$) **nebo 7 ml** (při počtu leukocytů $< 1,5 \times 10^9 / l$).

1.3 Typizace HLA antigenů I. třídy

Metoda: sérologické určení HLA antigenů I. třídy metodou lymfocytotoxického testu.

Odběr vzorku:

nesrážlivá krev (EDTA, Na heparin, ACD-A), minimální objem **5 ml** (- při počtu leukocytů nad $3,0 \times 10^9 / l$) **nebo 7 ml** (při počtu leukocytů $2,0 \times 10^9 / l$).

děti adekvátně menší objem - min. **2,5 ml** (při počtu leukocytů nad $3,0 \times 10^9 / l$) nebo **5 ml** (při počtu leukocytů $2,0 \times 10^9 / l$)

K určení HLA antigenů je nutné dostatečné množství lymfocytů v krvi (min. $2 \times 10^9 / l$ leukocytů), při nižším počtu leukocytů ($0,5 - 2 \times 10^9 / l$) je možné se o typizaci pokusit z většího náběru krve – **20-30 ml**. Ihned po odběru je třeba krev ve zkumavce opakovaným převrácením promísit, aby nedošlo ke srážení.

1.4 Aktuální cross-match (ACM)

Metoda: lymfocytotoxický test

Vyšetření HLA protilátek (komplement dependentních) mezi lymfocyty dárce ledviny (kadaverózní/ žijící) nebo dárce trombocytů a sérem/plazmou příjemce (orgánu nebo trombokoncentrátu), tj. určení dárcovsky specifických protilátek.

Odběr vzorku příjemce: nesrážlivá (EDTA a srážlivá krev, objem **5 - 10ml**, eventuálně sérum min. množství 2 ml; děti adekvátní objem dle věku, **min. však 2,4ml**, eventuálně sérum min. množství 1 ml.

Odběr vzorku dárce: nesrážlivá (EDTA) krev, objem **5 - 10ml**. **Vzorek tkáně v uchovávacím roztoku.**

1.5 Panel reaktivních protilátek (PRA)

Metoda: lymfocytotoxický test

Vyšetření HLA protilátek (komplement dependentních) s panelem 50-60 buněk o známém HLA fenotypu, určení specifity.

Odběr vzorku: srážlivá krev, objem **5 - 10ml**, eventuálně sérum min. množství 5 ml.

FN Ostrava	Příručka pro odběr vzorků HLA, DNA laboratoř	Strana: 2/3
-		Revize: 01

1.6 **Vyšetření protilátek proti leukocytům**

Metoda: lymfocytotoxický test, granulocytární aglutinační test, granulocytární imunofluorescenční test, – vyšetření aloimunních protilátek v séru/plazmě.

Odběr vzorku: nesrážlivá (EDTA) nebo srážlivá krev, objem **5 - 10ml**, eventuálně sérum min. množství 2 ml; děti adekvátní objem dle věku, **min. však 2,4 ml**, eventuálně sérum min. množství 1 ml.

1.7 **Vyšetření protilátek proti trombocytům**

Metoda: ELISA a DIFT (destičkový imunofluorescenční test) – vyšetření aloimunních protilátek v séru/plazmě.

MAIPA, xMAP-Luminex (komerční kity) – vyšetření auto a aloimunních protilátek.

Odběr vzorku: pro vyšetření **autoprottilátek** - nesrážlivá krev (EDTA), minimální objem **10 ml**, doporučený objem **20 ml při počtu trombocytů pod $50 \times 10^9 / l$** a současně srážlivá krev, objem **5 - 10ml**, eventuálně sérum min. množství 2 ml; děti adekvátní objem dle věku, **min. však 2,4 ml**, eventuálně sérum min. množství 1 ml. Pro vyšetření **aloprottilátek** - srážlivá krev, objem **5 – 10 ml**, eventuálně sérum min. množství 2 ml; děti adekvátní objem dle věku, **min. však 2,4 ml**, eventuálně sérum min. množství 1 ml.

1.8 **Vyšetření a identifikace anti-HLA protilátek (PRA, xMAP - Luminex)**

Metoda: měření fluorescenční intenzity vzorku na platformě LUMINEX.

Odběr vzorku: srážlivá krev doporučený objem **10 ml**, eventuálně sérum minimální množství **5 ml**.

1.9 **Vyšetření funkční aktivity, antigenu a protilátek metaloproteázy ADAMTS13)**

Metoda: ELISA

Odběr vzorku: nesrážlivá (citrát sodný), objem **5 – 10 ml (min. 2,9 ml)**, eventuálně **citrátovou plazmu (PPP) zamraženou min. 1 ml**, která byla zcentrifugována a zamražena podmínky viz níže; **děti adekvátní objem dle věku, min. však 2,5 ml**, eventuálně **citrátovou plazmu (PPP) zamraženou min. 0,5 ml**, která byla zcentrifugována a zamražena podmínky viz níže.

Každá zkumavka musí být náležitě označena identifikačními údaji vyšetřované osoby.

2 **Dodání vzorků**

2.1 **Uchování a přeprava**

Transport primárních vzorků z lůžkových/ ambulantních oddělení FNO zajišťuje potrubní pošta, případně pracovníci donáškové služby, kteří materiál spolu s žádankami přenášejí ve stojácích vložených v termotašce nebo termoboxech.

Potrubní poštou mohou být za stanovených podmínek (teplota 18-25°C) zasílány vzorky srážlivé, nesrážlivé krve a vzorky tkáně na všechna výše uvedená vyšetření.

Při požadavku na vyšetření **JAK2 V617F mutace** je optimální doručit vzorek co nejdříve od odběru, v případě rychlého dodání lze transportovat **při teplotě 18-25°C**, v případě déle trvajících transportu (> 8 hodin) je nutné vzorky transportovat **při 2-8°C**; vzorky je nutné **doručit do 48 hod.**

Při požadavku na vyšetření **aktivity, antigenu a protilátek (inhibitoru) proteázy ADAMTS13** je nutné vzorky nesrážlivé krve v 3,2% citrátu sodném (0,109M) **dodat do 2 hodin od odběru pouze při teplotě 18-25°C** (tyto vzorky nesmí být chlazeny ani zamrazeny). V případě, že není možné rychlé dodání vzorků nesrážlivé krve, lze zaslat pouze **zamraženou (bezdestičkovou) citrátovou plazmu - PPP** (1. Centrifugace, při 18-20°C, 15 min. při 2000 ot/min. + 2. centrifugace plazmy 15 min. při 4000 ot/min., do

FN Ostrava	Příručka pro odběr vzorků HLA, DNA laboratoř	Strana: 3/3
-		Revize: 01

2 hodin od odběru) skladovanou při < 20°C, stáří vzorku plazmy nesmí přesáhnout 14 dnů; **citrátovou plazmu je nutné zaslat na suchém ledu** tj. rozmrzlé respektive chlazené vzorky a sérum nejsou akceptovány!

Vzorky srážlivé krve lze transportovat při pokojové teplotě **18-25°C**, při doručení **do 24 hod.** Při transportu delším než 24 hod. vzorky chladit v chladicím boxu a dodat nejdéle do 48 hod.

U vzorků séra/plazmy na vyšetření protilátek se doporučuje transport při **2-8°C** s dodáním **do 48 hodin**, zamražené vzorky séra/plazmy přepravujte uschované v suchém ledu nebo s namraženými vložkami (stáří vzorku nesmí přesáhnout 1 měsíc).

Vzorky nesrážlivé krve (EDTA, Na citrát, ACD) lze transportovat při pokojové teplotě (**18-25°C**) maximálně **do 24 hodin**. Pokud transport probíhá z objektivních důvodů déle než 24 hod. nebo za teploty vyšší než 25°C, je nutné primární vzorky zaslat v chladicím boxu, nebo v boxu s chladicími vložkami (doručit max. do 48 hod. od odběru). **Vzorky lze uchovávat max. 3 dny při 2-8°C před doručením.**

Při požadavku na vyšetření **volných a vázaných (auto)protilátek proti trombocytům (MAIPA)** musí být náběry dodány **v den odběru nejpozději do 14.00 hod.** (preanalytická příprava vzorku).

2.2 Žádanky

Ke každému vzorku/-ům vyšetřované osoby je třeba dodat řádně vyplněnou žádanku, v níž musí být náležitě identifikován lékař indikující vyšetření, včetně adresy žadatele a jeho telefonního spojení, dále musí obsahovat jednoznačnou identifikaci vyšetřované osoby /pacienta, včetně čísla zdravotní pojišťovny, kódu diagnózy a údaj o datu a času odběru krevního vzorku.

Laboratoře KC přijímají primární vzorky správně odebrané, nepotřísněné, v nepoškozeném obalu označené identifikačními údaji vyšetřované osoby v souladu s údaji na správně vyplněné žádance.

3 Doba odezvy

Laboratoř má stanovený čas od příjmu vzorku do odeslání výsledku takto:

HLA genotypizace, genotypizace Kel, Kidd, Duffy, RhD, AB0 – 7 dnů, HLA genotypizace do 8h (statim)

Narkolepsie, celiakie, HLA-B*27– 7 dnů

FV Leiden, Protrombin, MTHFR a PAI-1, JAK2 mutace – 10 dnů

HLA sérotypizace – 4 dny

ACM – 5 hodin(statim), 8 hodin (rutina)

Protilátky proti leukocytům a trombocytům – 9 dnů

Vyšetření a identifikace HLA protilátek (PRA) – 30 dnů

MAIPA, x-MAP-Luminex (komerční) – 30 dnů

xMAP-Luminex – 30 dnů / urgentní vyšetření dle telefonického požadavku do 48 hod.

ADAMTS13 – 7 dnů/ urgentní vyšetření dle telefonického požadavku do 24 hod.

Zpracovala: Mgr. Alena Malušková dne: 29.10.2020

Připomínkovala: Mgr. Petra Kovářová dne: 29.10.2020