

FN Ostrava	Příručka pro odběr vzorků HLA, DNA laboratoř	Strana: 1/3
-		Revize: 02

PŘÍRUČKA PRO ODBĚR PRIMÁRNÍHO VZORKU

1 Požadavky na odběry

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

Metoda: PCR-SSPfl, PCR-SSP, RT-PCR

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 $< 1,5 \times 10^9 /l$).

Stěr z bukalní sliznice pacienta (doporučen např. u pacientů s počtem leukocytů v periferní krvi $< 1,5 \times 10^9 /l$), nesmí být kontaminovaný krví. Stěry (2x), se po zaschnutí vloží, do sterilní zkumavky/ obálky.

1.2 *Aktuální cross-match (ACM)*

Metoda: lymfocytotoxický test (ACM)

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 – 10 ml**, eventuálně sérum min. množství 2 ml; děti adekvátní objem krve dle věku, **min. však 2,4 ml**, eventuálně sérum min. množství 1 ml.

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

Metoda: průtoková cytometrie (FCXM)

Vyšetření HLA IgG protilátek proti T a B lymfocytům dárce ledviny (kadaverózní/ žijící) a sérem příjemce, tj. stanovení přítomnosti dárcovsky specifických HLA protilátek proti antigenům HLA I. a II. třídy.

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

Odběr vzorku dárce: nesrážlivá (Li-Heparin) krev, objem Li-Heparin **> 12 ml**. **Vzorek tkáně v uchovávacím roztoku. NECHLADIT!!!**

1.3 *Kalkulované PRA (cPRA)*

Metoda: výpočet pravděpodobnosti positivity křížového testu na základě vyšetření a identifikace anti-HLA protilátek (Luminex, xMAP)

Odběr vzorku: viz bod 1.7

1.4 *Vyšetření protilátek proti leukocytům (lymfocytům, granulocytům)*

Metoda: lymfocytotoxický 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.

1.5 *Vyšetření protilátek proti trombocytům*

Metoda: DIFT (destičkový imunofluorescenční test), CAPTURE-P – vyšetření aloimunních protilátek v séru/plazmě.

FN Ostrava	Příručka pro odběr vzorků HLA, DNA laboratoř	Strana: 2/3
-		Revize: 02

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

Odběr vzorku: pro vyšetření **autoprotilátek** - nesrážlivá krev (EDTA), minimální objem **10 ml**, doporučený objem **20 ml při počtu trombocytů $< 50 \times 10^9 / l$** a současně 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. Pro vyšetření **aloprotilátek** - 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.

1.6 Vyšetření a identifikace anti-HLA protilátek (Luminex, xMAP)

Metoda: měření intenzity fluorescence (MFI) vzorku na platformě LUMINEX.

Odběr vzorku: srážlivá krev doporučený objem **10 ml**, eventuálně sérum minimální množství **2 ml**.

1.7 Vyšetření funkční aktivity, antigenu a protilátek metaloproteázy ADAMTS13)

Metoda: měření nárůstu fluorescence pomocí Fluorescence resonance energy transfer (FRET) technologie, Enzyme-linked immuno assay (ELISA)

Odběr vzorku: nesrážlivá (citrát sodný), objem **5 – 10 ml (min. 2,9 ml)**, eventuálně citrátovou plazmu chudou na trombocyty (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/ vzorek musí být náležitě označena identifikačními údaji vyšetřované osoby a datem odběru vzorku.

2 Dodání vzorků

2.1 Uchování a přeprava

2.1.1 Transport vzorků z FNO

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 **aktivity, antigenu a protilátek (inhibitoru) proteázy ADAMTS13** je nutné vzorky nesrážlivé krve v 3,2% citrátu sodném (0,109 M) **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 2 hodin od odběru) skladovanou při **$< -20^{\circ}\text{C}$** , 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 krátkodobém transportu (< 1 hodina) potrubní poštou FNO platí teplotní rozsah 15-30°C. Při transportu delším než 24 hod. vzorky chladit v chladícím 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, citrátu sodném, ACD-A) lze transportovat při pokojové teplotě (**18-25°C**) maximálně **do 24 hodin**. Při krátkodobém transportu (< 1 hodina) potrubní poštou FNO platí teplotní rozsah 15-30°C. Pokud transport probíhá z objektivních důvodů déle než 24 hod. nebo za

FN Ostrava	Příručka pro odběr vzorků HLA, DNA laboratoř	Strana: 3/3
-		Revize: 02

teploty vyšší než 25°C, je nutné primární vzorky zaslat v chladícím 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.**

Vzorky nesrážlivé krve v Li-Heparinu lze transportovat při pokojové teplotě (18-25°C) maximálně do 36 hodin. Při krátkodobém transportu (< 1 hodina) potrubní poštou FNO platí teplotní rozsah 15-30°C. Vzorky je nutné doručit max. do 36 hod. od odběru. Vzorky odebrané do Li-Heparinu, nesmí být chlazeny na teplotu nižší než 15°C.

Vzorky tkáně musí být doručeny do laboratoře do 24 hodin a měly by být udržovány při pokojové teplotě (18-25°C), netransportovat s chladovými vložkami/ nechladiť.

Stěry z bukální sliznice lze uchovávat a transportovat při pokojové teplotě (18-25°C) maximálně do 8 hod od odběru. Při krátkodobém transportu (< 1 hodina) potrubní poštou FNO platí teplotní rozsah 15-30°C.

Při požadavku na vyšetření **volných a vázaných (auto)protilátek proti trombocytům (MAIPA)** - náběry musí být 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. **Žádanky na molekulárně genetické vyšetření musí obsahovat vyplněný informovaný souhlas pacienta/ky.**

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, MNSs, RHDweak/partial, RHCDE, AB0 systémů – 7 dnů, HLA genotypizace do 8 h (statim); HPA genotypizace – 10 dnů

Narkolepsie, Celiakie, HLA-B*27 a další HLA varianty asociované s chorobami – 7 dnů

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

ACM – 5 hodin (statim), 4 dny (rutina)

FCXM – do 24 hodin (statim), do 48 hodin (rutina)

Protilátky proti leukocytům a trombocytům – 10 dnů

Vyšetření a identifikace HLA protilátek (PRA) – 90 dnů

MAIPA, xMAP-Luminex (PAKLx) – 30 dnů

xMAP-Luminex – 60 dnů / statimové vyšetření (dle telefonického požadavku do) 48 hod.

ADAMTS13 – 21 dnů/ statimové vyšetření (dle telefonického požadavku do) 24 hod.

Zpracovala: Mgr. Petra Kovářová dne: 20.6.2025

Připomínkovala: Mgr. Alena Malušková, Ph. D. dne: 20.6.2025