

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
НАУЧНО- ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЦЕНТР
ТРАНСФУЗИОЛОГИИ

**Ж.К. Буркитбаев, А.А. Тұрғанбекова, С.А. Абдрахманова,
К.Х. Жангазиева, Н.С. Туякова**

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ HLA - СИСТЕМЫ
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМ МЕТОДОМ С ПРИМЕНЕНИЕМ
СИКВЕНС-СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПРАЙМЕРОВ**

Методические рекомендации

Нур-Султан
2019

УДК 614
ББК 51.1
О-62

Ж.К. Буркитбаев, А.А. Тұрғанбекова, С.А. Абдрахманова, К.Х. Жангазиева, Н.С. Туякова. Определение специфичности HLA- системы молекулярно-генетическим методом с применением сиквенса-специфических праймеров: Методические рекомендации - Астана: НППЦТ. 2018. - 27 с.

ISBN 978-601-7541-71-2

Авторы:

- Буркитбаев Ж.К. - кандидат медицинских наук, Директор РГП на ПХВ «Научно-производственный центр трансфузиологии»
- Тұрғанбекова А.А. - заведующая отделением иммунологического типирования тканей РГП на ПХВ «Научно-производственный центр трансфузиологии»
- Абдрахманова С.А. - кандидат медицинских наук, Первый заместитель директора РГП на ПХВ «Научно-производственный центр трансфузиологии»
- Жангазиева К.Х. - магистр здравоохранения, заведующая отделом менеджмента научных исследований РГП на ПХВ «Научно-производственный центр трансфузиологии»
- Туякова Н.С. - кандидат медицинских наук, менеджер отдела менеджмента научных исследований РГП на ПХВ «Научно-производственный центр трансфузиологии»

Рецензенты:

- Жариков С.Н. - д.м.н., директор РГП на ПХВ «Республиканский центр по координации трансплантации высокотехнологичных медицинских услуг» Министерства здравоохранения Республики Казахстан
- Байдуйсенова А.У. - к.м.н, доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. Ш.И. Сарбасовой АО «Медицинский университет Астана»

В методической рекомендации изложены этапы определения специфичности HLA - системы с применением сиквенса-специфических праймеров. Описаны процедуры контроля качества, меры защиты окружающей среды, интерпретация результатов, возможные причины недостоверных результатов и пути их устранения. Методические рекомендации предназначены для специалистов службы крови, лаборатории иммунологического типирования, научных центров, занимающихся вопросами трансплантологии.

Утверждено и разрешено к изданию типографическим способом РГП «Республиканский центр развития здравоохранения» (Заключение научно-медицинской экспертизы № 137 от 28 декабря 2018 года)

Содержание

Перечень сокращений.....	4
Понятия, используемые в методических рекомендациях	5
Введение	6
1. Молекулярно-генетические методы HLA-типирования.....	7
2. Постановка метода ПЦР- SSP	9
2.1 Основные требования к постановке метода ПЦР - SSP.....	11
2.1.1 Требования к подготовке пациента /донора на дачу крови.....	11
2.1.2 Требования к биоматериалам.....	11
2.1.3 Требования к транспортировке	11
2.1.4 Условия хранения первичной пробы.....	12
2.2 Требования к HLA - типированию	12
2.2.1 HLA - типирование пациентов и их доноров для трансплантации солидных органов	12
2.2.2 HLA - типирование пациентов и их доноров для трансплантации гемопозитических стволовых клеток.....	12
3. Этапы определения HLA - типирования	12
3.1 Этап выделения ДНК	12
3.2 Этап амплификации ДНК.....	13
3.3 Этап детекции продуктов амплификации ДНК (электрофорез).....	14
4. Оценка результата электрофореза	15
5. Процедура контроля качества	16
6. Лабораторная интерпретация результатов	17
7. Требования к реагентам и к образцам ДНК	17
8. Требования к безопасности и защите окружающей среды при исследованиях	18
9. Типичные ошибки при постановке метода ПЦР - SSP.....	19
Заключение	22
Список использованных источников	23
Список рекомендуемой литературы.....	25
Приложение 1 - Направление на типирование по HLA-системе	26
Приложение 2 -Результат HLA - типирования	27

Перечень сокращений

ПЦР	- Полимеразная цепная реакция
ДНК	- Дезоксирибонуклеиновая кислота
HLA	- Human Leucocyte Antigens- человеческие лейкоцитарные антигены
Sequence	- Последовательность
SSP	- Sequence-Specific Primers- метод специфических праймеров
SBT	- Sequence-based typing – метод секвенирования нуклеиновых кислот
НПЦТ	- Научно-производственный центр трансфузиологии
NGS	- Next-generation sequencing (секвенирование нового поколения)
K2ЭДТА	- 2-х замещенная калиевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты
	- base pair (спаренное основание) - единица измерения, сокращается до «bp»

Понятия, используемые в методических рекомендациях

Гены	- Участки хромосом, кодирующие структуру и функции антигенов
Лocus	- Линейный участок хромосомы, занимаемый одним геном
Секвенирование нуклеиновых кислот	- Определение первичной аминокислотной или нуклеотидной последовательности
Амплификация	- Увеличение числа копий генов (количества ДНК)
Ампликон	- фрагмент ДНК, клонирующийся в ходе ПЦР
Солидные органы	- Все плотные органы организма, такие как почки, сердце, легкие, печень, поджелудочная железа и др.
Агароза	- Линейный полисахарид, получаемый из клеточных стенок некоторых родов (например, род Gelidium) красных и бурых водорослей

Введение

Молекулярно-генетическая диагностика является одной из наиболее интенсивно развивающихся направлений в диагностике больных с различными патологиями, в том числе хронические болезни почек.

Внедрению молекулярно-генетической диагностики в клиническую практику способствовала разработка метода полимеразной цепной реакции (далее - ПЦР) или специфической амплификации ДНК, произошедшая более 20 лет назад [1].

Типирование генов системы HLA, основанное на анализе ДНК широко применяется при трансплантации органов и тканей, так как имеет целый ряд преимуществ по сравнению с серологическими и цитологическими методами [1,2,3]. Это, прежде всего, высокая чувствительность и специфичность, небольшой объем проб для исследования, возможность долгосрочного хранения образцов и выделенной ДНК, довольно быстрое выполнение полного тестирования [3,4].

В настоящее время широко распространены следующие молекулярно-генетические методы типирования, основанные на детекции нуклеотидных замен в генах HLA. К ним относятся: Sequence specific primers-типирование с помощью набора различных пар праймеров, каждая из которых амплифицирует определенную группу аллелей либо единичную аллельную вариацию; Sequence-based typing - секвенирование нуклеиновых кислот, путем определения нуклеотидной последовательности дезоксирибонуклеиновой кислоты [5,6].

Сейчас в Казахстане стало возможным проведение сложных операций по пересадке жизненно важных органов. И ключевое значение в успешном осуществлении трансплантации имеет лабораторное исследование донора и пациента - HLA - типирование пересаживаемых органов и тканей.

В целях упорядочения деятельности по развитию иммунологического типирования тканей и (или) органов (части органов) в рамках их трансплантации, включая гемопоэтические стволовые клетки в Республике Казахстан приказом Министра здравоохранения Республики Казахстан от 27 декабря 2011 года №928 «О некоторых вопросах трансплантации тканей и (или) органов (части органов)» на базе Научно-производственного центра трансфузиологии (далее - НПЦТ) была создана Центральная лаборатория иммунологического типирования тканей (далее - HLA лаборатория) [7].

На сегодняшний день в HLA - лаборатории проводятся типирование ДНК доноров и пациентов по локусам HLA-A, HLA-B, Cw, DRB1, DQB1 молекулярно-генетическим методом на низком уровне разрешения (SSP) и секвенирование (SBT) [5,6,7]. В дальнейшем с развитием деятельности HLA - лаборатории планируется внедрение высокопроизводительного метода - секвенирование нового поколения (NGS), для определения нуклеотидного состава молекулы ДНК [8,9,10].

1. Молекулярно-генетические методы HLA-типирования

На поверхности практически всех клеток организма представлены молекулы (белки), которые носят название антигенов главного комплекса гистосовместимости (HLA - антигены). Название HLA - антигены было дано в связи с тем, что эти молекулы наиболее полно представлены именно на поверхности лейкоцитов (клетки крови) [11,12].

Молекулы HLA выполняют роль своеобразных "антенн" на поверхности клеток, позволяющих организму распознавать собственные и чужие клетки (бактерии, вирусы, раковые клетки и т.д.) и при необходимости запускать иммунный ответ, обеспечивающий выработку специфических антител и удаление чужеродного агента из организма [12,13].

Синтез белков HLA - системы определяется генами главного комплекса гистосовместимости, которые расположены на коротком плече 6-й хромосомы [13,14].

Выделяют два основных класса генов главного комплекса гистосовместимости: I класс включает гены локусов A, B, C; II класс - D-область (сублокусы DR, DP, DQ) [14,15]. На рисунке 1 показано расположение HLA-антигена.

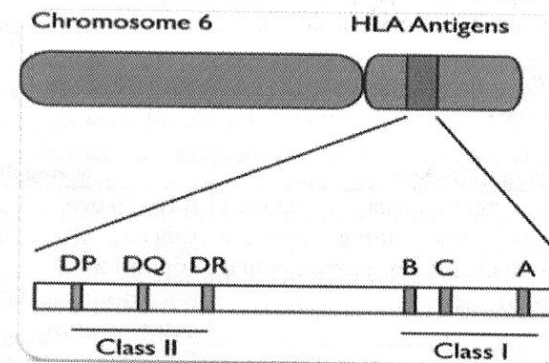


Рисунок 1 - Расположение HLA- антигена на коротком плече С6 хромосомы

В настоящее время методы анализа ДНК очень широко используют полимеразную цепную реакцию (ПЦР), которая позволяет амплифицировать нужные фрагменты генов [13,14,15]. На рисунке 2 схематично изображено метод ПЦР.

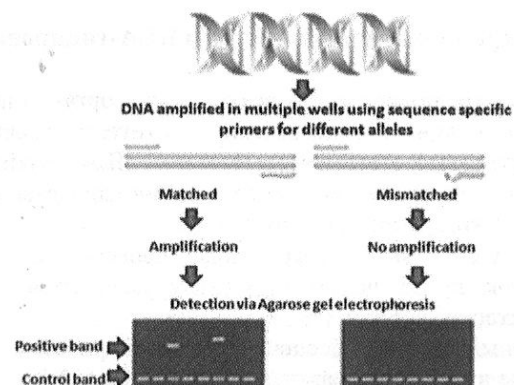


Рисунок 2 - Схематическое изображение ПЦР- SSP

Наиболее распространенными являются следующие молекулярно-генетические методы HLA-типирования: ПЦР с использованием сиквенс-специфических праймеров (SSP) и метод секвенирования нуклеиновых кислот, путем определения нуклеотидной последовательности дезоксирибонуклеиновой кислоты (SBT) [15,16,17].

В таблице 1 представлена сравнительная характеристика молекулярно-генетических методов (ПЦР- SSP и SBT).

Таблица 1-Сравнительная характеристика методов ПЦР- SSP и SBT

Метод ПЦР- SSP	Метод SBT
Универсальная технология, может использоваться как для типирования с низким, так и с аллельным разрешением (зависит от наборов)	Актуальная технология только для типирования образцов с высоким/аллельным разрешением
Простая в исполнении методика и интерпретация результатов, требует минимального количества оборудования	Сложная многостадийная методика, требующая внимательности и безошибочности, требует наличия дорогостоящего секвенатора, а также вспомогательных роботов
Очень низкая производительность, пригодна только для единичных типирований	Производительность средняя при использовании автоматов и роботов

Метод ПЦР- SSP	Метод SBT
Невозможно автоматизировать процедуру	Возможно автоматизировать отдельные этапы
Быстрое получение результата – около 2 часов (без учета времени выделения ДНК)	Конечный результат может быть получен не раньше чем через 2 дня, в случае использования ПЦР с группспецифическими праймерами – не ранее чем через 4 дня
Вспомогательная технология для любой лаборатории генотипирования	Одна из технологий в лаборатории HLA-типирования обеспечивающей неродственную трансплантацию костного мозга

2. Постановка метода ПЦР – SSP

Принцип метода:

Метод основан на многократном избирательном копировании определённого участка нуклеиновой кислоты ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (in vitro) [17,18].

Пары праймеров подбираются таким образом, чтобы хорошее совпадение наблюдалось только с одной аллелью или группой аллелей. В условиях строго контролируемого режима ПЦР амплификация искомой последовательности возможна только для пары праймеров с наилучшей комплементарностью (положительный результат), тогда как в случае неполной комплементарности праймеров, амплификация не происходит (негативный результат).

После процесса ПЦР амплифицированный фрагмент ДНК разделяется электрофорезом в агарозном геле и визуализируется окрашиванием бромидом этидия в ультрафиолетовом свете. Интерпретация результатов ПЦР-SSP основана на наличии или отсутствии специфичного амплифицированного фрагмента ДНК.

Преимущество метода ПЦР - SSP в универсальности технологии, используется как для типирования с низким, так и с аллельным разрешением, прост в исполнении и интерпретации. В финансовом отношении является менее затратным методом [19,20].

Процедура проведения метода ПЦР- SSP представлена на рисунке 3.

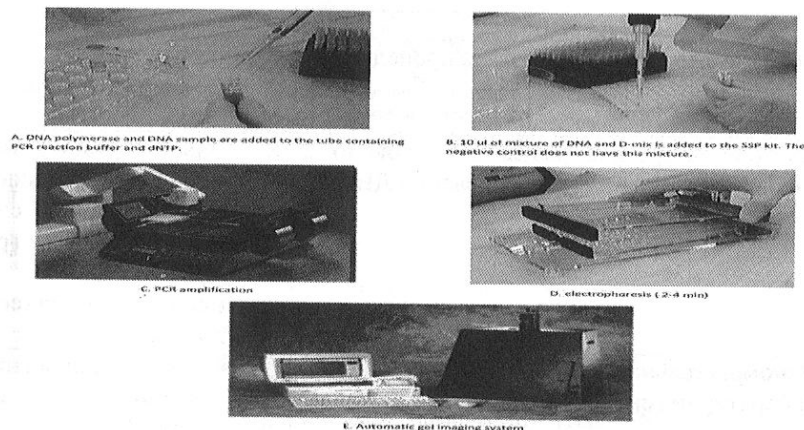


Рисунок 3 - Процедура проведения метода ПЦР- SSP

Материальное обеспечение:

1) Оборудование

- Морозильник (-18-22°C)
- Холодильник (+4+6°C)
- Центрифуга лабораторная для пробирок объемом до 10 мл (до 1000g)
- Центрифуга для микропробирок объемом до 2000 мкл (до 13000g)
- Спектрофотометр
- Вортекс-центрифуга
- Программируемый ротатор-миксер
- Термостат
- Амплификатор
- Центрифуга планшетная
- Микроволновая печь
- Заливочное устройство
- Электрофорезная камера (220-312 нм)
- Источники тока электрофорезных камер (200-300 В, 200 мА)
- Гель-документирующая система

2) Реактивы

- Набор реагентов для выделения ДНК
- Наборы диагностических реагентов для определения антигенов HLA-A, B, C I класса и DRB1, DQB1 II класса, содержат аликвотированные и высушенные реакционные смеси состоящих из аллель-специфичных праймеров, праймеров внутреннего контроля и нуклеотидов.
- Taq полимеразы (5U/мкл)
- Агарозная гель
- Буфер

- ДНК маркер
- Электрофоретический жидкий или сухой концентрат для приготовления электрофоретического буфера

- Дистиллированная вода

- Агароза

- Этидий бромид

3) Инструменты

- Одноразовая вакуумная пробирка с антикоагулянтом (К2ЭДТА)
- Контейнер
- Термоконтейнер (сумка холодильник)
- Микропробирка

2.1 Основные требования к постановке метода ПЦР- SSP

2.1.1 Требования к подготовке пациента/донора на дачу крови:

- 1) Для проведения исследования берется венозная кровь;
- 2) За 24 часа до взятия крови не допускается изменения в питании, необходимо исключить приём алкоголя и жирной пищи;
- 2) Забор крови производится в первой половине дня, допускается прием легкого завтрака;
- 3) Запрещается приём гепариносодержащих лекарств, поскольку они влияют на результаты анализов (ингибируют ПЦР). Время отмены лекарств зависит от периода выведения препарата из крови. Если отменить прием лекарств невозможно, необходимо проинформировать об этом лабораторию;
- 4) Запрещается брать анализы после процедуры гемодиализа у пациентов с почечной недостаточностью;
- 5) Запрещается брать анализы из фистульной вены.

2.1.2 Требования к биоматериалам:

- 1) Кровь берется в одноразовую вакуумную пробирку с антикоагулянтом (К2ЭДТА) объемом не менее на 9 мл;
- 2) Образец крови направляется на HLA – типирование с заполнением формы 410/у (форма утвержденная приказом и.о. Министра здравоохранения Республики Казахстан 23 ноября 2010 года № 907) (приложение 1).

2.1.3 Требования к транспортировке:

- 1) Транспортировка образцов крови должна осуществляться при температуре +4-+6° С в защищенном от света термоконтейнерах (сумка-холодильник) с теплоизолирующими свойствами и плотноприлегающей крышкой;
- 2) Транспортировка образцов крови осуществляется транспортом (автомобильным, железнодорожным, воздушным) в зависимости от удаленности лаборатории в течение 24 часов.

2.1.4 Условия хранения первичной пробы:

- До 24 часов при температуре от + 2°C до + 8°C.

2.2 Требования к HLA-типированию

2.2.1 HLA - типирование пациентов и их доноров для трансплантации солидных органов [21,22]:

1) При планировании операции по трансплантации солидного органа проводится первичное определение гистосовместимости по локусам A и B I класса и локусу DRB1 II класса HLA-системы по направлению врача-трансплантолога;

2) Для определения гистосовместимости проводится типирование донора и реципиента по указанным локусам. В обязательном порядке осуществляется подтверждающее типирование указанных локусов перед трансплантацией реципиента и подобранного донора молекулярно-генетическим методом на низком уровне разрешения;

3) Для трупного донора проводится только одно окончательное типирование по указанным локусам молекулярно-генетическим методом на низком разрешении.

2.2.2 HLA - типирование пациентов и их доноров для трансплантации гемопоэтических стволовых клеток [21,22]:

1) При планировании трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (костного мозга) проводится первичное определение гистосовместимости реципиента и его потенциальных доноров по локусам A, B и C w I класса и локусам DRB1, DQB1 II класса на низко разрешающем уровне методом SSP;

2) Для определения окончательной гистосовместимости по указанным локусам проводится подтверждающее типирование реципиента и подобранного донора молекулярно-генетическим методом SBT на высоком уровне разрешения из нового образца крови.

3. Этапы определения HLA-типирования

Все методы определения HLA-типирования предполагают наличие 3х этапов: выделение ДНК, амплификация, детекция результатов амплификации [22,23].

3.1 Этап выделения ДНК

Выделение ДНК из образцов крови можно провести существующими методами (выделение на магнитных частицах или выделение на мембранных колонках).

Выделенное ДНК можно использовать немедленно для различных ПЦР-техник или хранить при 4°C в течение 2 недель, или при -20°C долгое время. Измеряется концентрация и частота ДНК на спектрофотометре. Конечная концентрация ДНК должна быть от 30 до 50 нг/мкл при соотношении A260/A280 1,65-1,80.

Необходимый объем ДНК должен быть не менее 200 мкл. Образцы ДНК должны транспортироваться при температуре не выше 4°C.

3.2 Этап амплификации ДНК

Готовится планшета с аликвотированными высушенными праймерами на рабочий стол. Микропробирки с объемом 1,5 мл маркируются номером ДНК образца. Смесь Pre Master Mix готовится для каждого образца ДНК в 1,5 мл пробирку. Необходимое количество ПЦР буфера и Taq полимеразы пипетируется, согласно инструкции к наборам.

Смесь Pre Master Mix тщательно встряхивается на вортексе и центрифугируется для осаждения. Необходимый объем Pre Master Mix пипетируется в негативный контроль в лунку ПЦР планшеты с аликвотированными аллель-специфическими праймерами, согласно протоколу от производителя. В пробирку с Pre Master Mix добавляется необходимый объем ДНК обследуемого.

Пробирка с Pre Master Mix содержащую индивидуальную ДНК образца тщательно встряхивается в вортексе и центрифугируется для осаждения смеси.

Необходимый объем смеси Master Mix пипетируется при помощи степпера во все 95 позиций планшеты с аликвотированными аллель-специфическими праймерами, кроме негативного контроля [22,23,24].

Важно: Во избежание перекрестной контаминации между лунками необходимо вносить образец поверх праймеров, иммобилизованных на дне каждой пробирки. При внесении образца не должны касаться наконечником внутренней стенки пробирки, чтобы жидкость стекала на дно лунки. Необходимо убедиться, что в каждой лунке все внесенные образцы осели на дно. Если нет, то слегка постукивая планшетом, добится опускания образцов на дно пробирок перед началом ПЦР.

Планшета закрывается термостойкой ПЦР пленкой. Планшета центрифугируется до 500 G на 30 секунд на планшетной центрифуге, для осаждения смеси. После проверяется на наличие пузырьков. В случае наличия пузырьков, планшета повторно центрифугируется.

Затем планшета помещается в амплификатор и немедленно запускается процесс амплификации согласно протоколу производителя реагентов. Готовые ПЦР-продукты хранятся в плотно закрытой планшете при температуре 2-8°C не более двух часов. В таблице 2 представлен процесс амплификации.

Таблица 2 – Процесс амплификации

SSP Cyclor Program			
Initial denaturation (начало денатурации)	96° C	2 min	Hold
Denaturation (денатурация)	96° C	15 sec	10 cycles (10 циклов)
Annealing and Extension (отжиг и синтез)	65° C	60 sec	
Denaturation (динатураци)	96° C	15 sec	
Annealing (отжиг)	61° C	50 sec	20 cycles
Extension (продолжение)	72° C	30 sec	
Hold (окончание)	4° C	∞	
Примечание: Режим амплификации проводится согласно инструкции к прилагаемым реагентам			

3.3 Этап детекции продуктов амплификации ДНК (электрофорез)

Для проведения электрофореза необходимо приготовить 1% агарозную гель. В зависимости от размера электрофоретической камеры готовится необходимый размер агарозного геля.

Пример приготовления агарозного геля для электрофоретической камеры объемом на 200см x 200 см:

Для этого добавляется 4 грамма агарозы в подходящую ёмкость (мерная колба). Наливается 200 мл электрофоретического буфера и взбалтывается в мерной колбе для растворения порошка агарозы в буфере. Помещается раствор геля в микроволновую печь и устанавливают низкую или среднюю мощность на 5 минут. Прерывая процесс нагревания каждые 30-60 секунд для лёгкого перемешивания содержимого и растворения агарозы. Гель остужается до 50-60°C и к нему добавляют 10 мкл этидиума бромид. Гель помещается стеклянной палочкой или легкими круговым перемешиванием самой колбы.

Готовая гель выливается на подложку заливочного столика и в него помещают гребенки (по 10 мкл карманами) в соответствующие прорезы подложки так, чтобы лунки с образцами располагались ближе катоду (чёрный электрод). В процесс электрофореза образцы ДНК будут мигрировать к аноду (красный электрод). Дается время для застывания геля в течение 20-40 мин при комнатной температуре.

Осторожно извлекаются гребёнки из застывшего геля. Толщина геля должна составлять 0,5 см. Затем готовится электрофоретическая камера, наполнив до метки 1% буфером.

После окончания ПЦР-реакции ПЦР планшета переносится с амплификатора в кабинет проведения электрофореза. ПЦР планшета с ампликоном (ПЦР продукт) располагается таким образом, чтобы

отрицательный контроль оказался в правильном положении согласно инструкции к наборам.

С планшеты аккуратно не встряхивая образцы удаляется пленка. Затем вносится по 10 мкл ампликонов из ПЦР-планшеты в той же последовательности в агарозный гель (дополнительные растворы для электрофореза не требуются) [22,23,24].

Рекомендуется: Использовать 8 - канальный дозатор для пипетирования ампликона в лунки геля.

Важно: Планшет расположить согласно прилагаемому рабочему листу набора и проводить пипетирование слева направо, сверху вниз.

Электрофоретическая камера закрывается крышкой, совмещая цветные метки. Электрофорез ампликонов проводится при 150 В в течение 20 минут. После окончания электрофореза подложку с гелем помещают в трансиллюминатор для получения фото геля.

Производится отметка положительных аллелей в протокол, прилагаемым к набору реагентов. Необходимо проверить соответствие лота в протоколе и использованного реагента.

Примечание: Состав праймеров, указанный в протоколе у различных производителей отличается.

4. Оценка результата электрофореза

Дорожка внутреннего контроля (медленно мигрирующего) (молекулярной массой 1070 bp) всегда должна быть видна при отрицательном результате образцов (кроме контрольной отрицательной лунки) как контроль успешной амплификации. Отсутствие амплификации какого-либо образца видно по отсутствию дорожек.

Быстро мигрирующие положительные полосы появятся в электрофорезном геле, если специфический НЛА амплифицировался в процессе ПЦР и имеют правильный размер (указывается в таблице специфичностей). Это говорит о положительном результате.

Полоса внутреннего контроля может быть слабой или отсутствовать в положительных лунках.

Лунки с положительными результатами отмечаются на рабочем листе (протоколе соответствующего лота используемого набора).

Присутствие полосы внутреннего контроля или положительной полосы в отрицательной контрольной лунке делает сомнительными результаты всего теста и требует перестановки анализа.

Если имеет место загрязнение геномной ДНК, полоса будет иметь место на 282 bp. Дополнительные полосы могут встречаться на 78 bp, 104 bp, 176 bp и приблизительно на 580 bp. Если имеет место загрязнение амплификатами, то полосы появятся на 78 bp и/или 104 bp и/или 282 bp.

С целью регистрации визуализируется ПЦР амплификаты с помощью геледокументирующих систем или трансиллюминатором, соответствующей длины волны (312 нм).

Интерпретация гелей проверяется согласно схеме, представленной на рисунке 4.

Интерпретация гелей*

	Положительная реакция	Отрицательная реакция	Отсутствие амплификации
Лунка			
Полоса вн. контроля			
Положительная полоса			
Полоса праймеров			

* Полоса внутреннего контроля и широкая полоса несвязавшихся праймеров служат маркерами размера ампликонов. Любые видимые полосы между двумя маркерами размера должны считаться положительными.

Рисунок 4 - Схема интерпретации гелей

5. Процедура контроля качества

Поскольку амплификация при ПЦР зависит от различных факторов (ошибки пипетирования, плохое качество ДНК, наличие ингибиторов и т. д.), контрольная пара праймеров (внутренний контроль) включена в каждую ПЦР реакцию.

Контрольная пара праймеров служит для амплификации консервативного региона гена β -глобина человека, который присутствует во всех ДНК-образцах и используется для подтверждения полноты ПЦР.

При наличии положительной полосы (специфичная амплификация аллели HLA) продукт праймеров внутреннего контроля может быть слабым или отсутствовать из-за различий в концентрации и температур отжига для специфичных пар праймеров и праймеров для внутреннего контроля.

Амплифицированные фрагменты ДНК специфичных пар праймеров HLA меньше продукта праймеров внутреннего контроля, но больше полос несвязавшихся праймеров. Таким образом, позитивная реакция специфической аллели HLA или группы аллелей визуализируется в геле как амплифицированный фрагмент ДНК между полосой внутреннего контроля и полосой свободных праймеров.

6. Лабораторная интерпретация результатов

Интерпретация результата проводится на основании положительных реакций в лунках с специфическими праймерами.

У каждого обследуемого лица определяется один или два вида антигена по каждому локусу (HLA-A,B,Cw,DRB1,DQB1) и дополнительных лунках DRB 3,4,5.

Выводится фенотип обследуемых лиц по локусам A,B,Cw,DRB1,DQB1 и дополнительных лунках DRB 3,4,5.

Результат исследования записывается в бланк HLA-типирования - форма 410-2/у (форма утвержденная приказом и.о. Министра здравоохранения Республики Казахстан 23 ноября 2010 года № 907 (приложение 2)).

7. Требования к реагентам и к образцам ДНК

Основные требования к реагентам следующие:

- 1) не применяются реагенты с истекшим сроком годности;
- 2) реагенты хранятся при температуре, указанные на упаковке;
- 3) любые поврежденные пробирки с праймерами считаются непригодными для использования;
- 4) не применяется размороженная Taq-полимераза. Taq-полимераза должна храниться при -20°C. Вынимается полимеразы из морозильной камеры перед применением и немедленно помещается обратно в морозильник после использования;
- 5) не применяется гепаринизированный материал, приводящий к ингибированию ПЦР.

Основные требования к образцам:

- 1) Не используются следующие образцы:
 - термически инактивированные,
 - гемолизированные,
 - содержащие фибрин или другие твердые частицы.
- 2) При подготовке образцов необходимо:
 - избегать контаминации перчаток при работе с образцами и контролями;
 - не допускать контаминации лунки с отрицательного контроля положительной контрольной сывороткой и сывороткой обследуемого;
 - не допускать контаминации опытных лунок с положительной контрольной сывороткой;
 - рекомендуется использовать пипетки одноразового пользования и наконечники для пипеток.
- 3) Используются только поставляемые или указанные необходимые расходные материалы для обеспечения оптимального проведения теста.

8. Требования к безопасности и защите окружающей среды при исследовании

Все меры предосторожности и нормы поведения в лаборатории должны быть направлены на сохранение здоровья исследователя и упредить загрязнения проб различными веществами [22,23,24,25].

Следует помнить, что взятые образцы могут быть инфицированными и необходимо соблюдать универсальные меры безопасности во время проведения теста:

1) Процедура проводится только квалифицированным и обученным персоналом, умеющим проводить ПЦР и обращаться с инфекционными материалами;

2) Соблюдать общепринятые меры безопасной работы в лаборатории;

3) Не принимать пищу, питье и курение в местах, отведенных для проведения работ;

4) Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты и средства защиты для глаз при обращении с взятыми образцами и реагентами;

5) Тщательно мыть руки после манипуляций с взятыми образцами и реагентами;

6) Все материалы утилизируются, которые контактировали с взятыми образцами или реагентами согласно предписаниям;

7) Дозаторы, использованные в манипуляциях после ПЦР, не должны использоваться в манипуляциях перед ПЦР;

8) Следует помнить, что бромид этидия, используемый для окрашивания ДНК, является потенциально канцерогенным соединением, способный проникать через кожу;

9) При работе с бромистым этидием нужно использовать перчатки (лучше всего из нитрильной резины) и как можно меньше прикасаться к нему. В случае попадания бромистого этидия на кожу или в глаза промыть пораженный участок водопроводной водой в течение 15 минут. В случае попадания бромистого этидия внутрь организма немедленно обратиться к доктору.

10) Одевать перчатки при работе с окрашенными гелями;

11) Использовать ультрафиолет непроницаемые фильтры для защиты глаз. Запрещается смотреть на источник ультрафиолета при фотографировании гелей. Ультрафиолетовые лучи опасны для глаз. Поэтому при работе с ультрафиолетовой лампой нужно избегать прямого попадания лучей в глаза и использовать защищающие глаза специальные очки или маски. Материалом для очков и масок может служить стекло с примесями окиси железа(Fe_2O_3), например, оконное стекло (0, 1 % Fe_2O_3).

Важно: В лаборатории строго запрещается:

1) отступать от правил поведения, описанных выше;

2) ходить в грязной одежде и обуви;

3) действовать самовольно и наугад.

9. Типичные ошибки при постановке метода ПЦР - SSP

Метод ПЦР - SSP состоит из большого числа последовательных и аккуратных действий. Очень важным моментом является воспроизводимость результатов. Для получения высокого показателя нужно стандартизовать условия проведения ПЦР-SSP. Условия должны быть одинаковыми для всех проб [22,24,25,26,27].

Типичные ошибки на каждом из этапов ПЦР - SSP.

На этапе выделения ДНК:

1) Неправильное хранение биологического материала;

2) Загрязнение проб;

3) Нарушение очередности действий в этапе выделения ДНК;

4) Истечение срока годности реактивов для выделения ДНК.

На этапе амплификации ДНК:

1) Нарушение пропорций при смешивании реактивов для амплификации;

2) Загрязнение проб ДНК из соседних пробирок (при отсутствии смены наконечников);

3) Использование праймера, не способного отжигаться на ДНК данного организма;

4) Истечение срока годности реактивов для амплификации ДНК.

На этапе детекции продуктов амплификации:

1) Использование силы тока и напряжения, не подходящих для электрофореза ДНК;

2) Неправильное подключение камеры для электрофореза (ДНК-фрагменты всегда движутся к аноду);

3) Испорченный буфер. Это возможно при неправильном хранении либо при продолжительном использовании буфера;

4) Неправильное приготовление и старение агарозного геля (высокая хрупкость, сомкнутые стенки лунок и т. д.).

В таблице 3 представлены рекомендации по устранению ошибок возникших при проведении ПЦР-SSP.

Таблица 3 – Рекомендации по устранению причин

Проблема	Возможная причина		Рекомендации по устранению причин
Нет полос или слабые полосы	ДНК	Недостаточное количество	Повторить тест. Использовать количество ДНК, рекомендованное производителем праймеров.
		Недостаточная чистота	Повторить процедуру приготовления ДНК,

Проблема	Возможная причина		Рекомендации по устранению причин
		(соотношение A260/280 не входит в интервал 1,65 – 1,80)	проверить соотношение A260/280 в интервале 1,65 – 1,80, повторить тест.
		Присутствует ингибитор ПЦР (например, ЭДТА в концентрации выше 5мМ или гепарин)	Повторить процедуру приготовления ДНК, повторить тест
	Тaq-полимераза	Недостаточное количество	Повторить тест; использовать количество фермента, рекомендованное производителем праймеров
		Дегградация фермента	Повторить тест, использовать полноценный фермент
	Бромид этидия	Недостаточное количество	Приготовить раствор бромида этидия 0,5 мкг/мл в 1 x TBE
	Амплифика тор	Неверные параметры амплификации	Оптимизировать параметры амплификации
Ложные полосы, неспецифическая амплификация, дополнительные полосы (дополнительные полосы несоответствующего размера следует отбрасывать)	ДНК	Слишком большое количество	Повторить тест; использовать количество ДНК, рекомендованное производителем праймеров
		Недостаточная чистота (соотношение A260/280 не входит в интервал 1,65 – 1,80)	Повторить процедуру приготовления ДНК, проверить соотношение A260/280 в интервале 1,65 – 1,80, повторите тест.
		Контаминация другими ДНК продуктами или продуктами ПЦР	Использовать новые буферы/реагенты для экстракции ДНК и ПЦР; повторить экстракцию ДНК и тест
		ДНК загрязнена солями	Повторить выделение ДНК, попробовать разные методы

Проблема	Возможная причина		Рекомендации по устранению причин
	Тaq-полиме- раза	Слишком большое количество	Повторить тест; использовать количество фермента, рекомендованное производителем праймеров. Повторить тест, использовать полноценный фермент.
	Бромид этидия	Слишком большое количество	Приготовить раствор бромида этидия 0,5 мкг/мл в 1 x TBE, повторить тест.
	Амплифика тор	Неверные параметры амплификации	Оптимизировать параметры амплификации
Полосы в отрицательном контроле	Реагенты	Контаминация другими ДНК продуктами или продуктами ПЦР	Использовать новые буфера/реагенты для экстракции ДНК и ПЦР; повторить экстракцию ДНК и тест.
Полосы не видны или видны только светлые полосы, стандарт длины не виден	Бромид этидия	Слишком слабое окрашивание геля бромистым этидия	Повторить готовку геля с правильной концентрацией этидиума бромида
Слишком яркое фоновое свечение геля	Бромид этидия	Слишком высокая концентрация эдидия бромида	Замочить гель в H ₂ O или в 1% буфере или повторить готовку геля с правильной концентрацией этидиума бромида
Размытая полоса	Буфер	Слишком горячий буфер для электрофореза или не правильный буфер для электрофореза	Понизить напряжение тока и воспользоваться 1% буфером.
При оценке выявлено более 2 специфичностей	ДНК	Контаминация другими ДНК продуктами или продуктами ПЦР	Использовать новые буферы/реагенты для экстракции ДНК и ПЦР; повторить экстракцию ДНК и тест

Заключение

Стремительное развитие молекулярно-биологических технологий предъявляет новые требования к качеству медицинской диагностики на современном уровне.

При типировании комплекса HLA до сих пор в основном применяли серологические и клеточные методы. Отсутствие специфических сывороток на многие аллельные вариации, а также принципиальные ограничения, связанные с полиморфизмом обеих цепей молекул HLA класса II, часто приводят к низкому выявлению антигенов и к неоднозначному типированию.

В последние годы активно развиваются альтернативные методы типирования, основанные на детекции нуклеотидных замен в генах HLA. Молекулярно-генетические методы исследования могут применяться везде, где необходимо типирование системы HLA, при этом в зависимости от цели типирования выбирается уровень его разрешения. Для трансплантации органов достаточным является HLA-типирование на низком разрешении.

В будущем, возможно применение высокопроизводительного метода NGS для анализа минимальных образцов ДНК, например в единичных клетках или внеклеточной ДНК в плазме крови.

Список использованных источников

1. Волкова О.Я. Выбор метода молекулярно-биологического типирования генов системы HLA крови доноров и реципиентов при аллогенных трансплантациях гемопоэтических стволовых клеток. Ученые записки СПбГМУ им.акад. И.П.Павлова.-2008.- том15.-№1.-С.37-41.
2. Чертков И.Л., Дризе Н.И. Взлёты и падения клеточной гематологии за три четверти века. // Гематология и трансфузиология. - 2001.- №3. - С.10-14.
3. Киселев Л.Л. Геном человека и биология XXI века. Вестник РАН.- 2000.- Т.70, №5.- С.412-424.
4. Куклик Л.В. Особенности полиморфизма HLA-специфичностей I и II классов при различных типах сахарного диабета: Автореф. дис. канд. мед. наук. СПб., 2000.- 20с.
5. Blasczyk R. HLA-diagnostic sequencing – conception, application and automation // Journal of Lab Medicine. – 2003, Vol.27, N 9-10, pp.359-368
6. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing chain-terminating inhibitors//Proc Natl Acad Sci USA.-1977.-Vol.74, pp.5463-5467.
7. Приказ Министерства здравоохранения Республики Казахстан от 27.12.2011 г. № 928 «О некоторых вопросах трансплантации тканей и (или) органов (части органов)». www. zakon. kz.
8. Аникаев А.Ю., Ломоносов А.М. Применение секвенирования нового поколения (NGS) в клинической практике. Лабораторная служба. - 2014. - №1. – С. 32-36.
9. Бархатов И.М., Предеус А.В., Чухловин А.Б. Секвенирование нового поколения и области его применения в онкогематологии. Онкогематология. - 2016. -№4, том 11. - С. 56 - 63.
10. NGS: высокопроизводительное секвенирование / Д.В. Ребриков и др.; под общей редакцией Д.В.Ребрикова. -2-е изд.- М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015.- 232 с.
11. Charron D. Immunogenomics of hematopoietic stem cell transplantation//Transfusion Clinical Biology .-2003.-Vol.10-pp.156-158
12. Кишкун А.А. Иммунологические и серологические исследования в клинической практике. М., 2006.-118 с.
13. Шпакова А.П., Булычева Т.И. История разработки и использования метода смешанной культуры лимфоцитов- MLC и его HLA - генотипическая значимость при подборе геноидентичного донора для трансплантации костного мозга (45 лет применения в мире). Гематология и трансфузиология. -2012.-№5, т.57.-С. 9-17.
14. A Guide to the Services provided by the Department of Histocompatibility and Immunogenetics (The National Histocompatibility And Immunogenetics Service For Solid Organ Transplantation (NHISOT), 8th Edition - November 2011.

15. Афанасьев Б.В., Зубаровская Л.С. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток крови //Детская онкология. Руководство. – 2002. – С-Петербург. – стр. 90-108

16. Алексеев Л.П., Хаитов Р.М., Долбин А.Г., Болдырева М.Н., Трофимов Д.Ю., Алексеева П.Л., Минина М.Г. Главный комплекс тканевой совместимости человека (HLA) и клиническая трансплантология. Иммунология.- 2008.- № 4.- С. 44- 237.

17. Голованова, О.В. Молекулярный полиморфизм HLA -генов DRB1 и DPB1 в популяции европеоидного происхождения, проживающей в ЗападноСибирском регионе// О.В. Голованова, А.В. Шевченко, В.Ф. Прокофьев и др.// Иммунология. 2002.- №1.- С29-31.

18. Полетаев А.Б. Клиническая и лабораторная иммунология: Избранные лекции. – М.: ООО «Медицинские информационное агентство», 2007 – 184 с.

19. Рий А.А. Клинико-диагностическое значение антигенов HLA у больных острыми и хроническими лейкозами при проспективном наблюдении: дис. канд. мед. наук: - 2007.- 168с.

20. Сулимова Г.Е., Удина И.Г., Зинченко В.В. Анализ полиморфизма ДНК с использованием метода полимеразной цепной реакции.-М:Макс Пресс.-2006.- 80с.

21. Практическое руководство «Руководство по диагностическому лабораторному обеспечению трансплантации солидных органов». – Москва.- 2013.-16 с.

22. Оберемок В.В. Методические рекомендации к применению ПЦР-метода.- Симферополь.- 2008.- 34 с.

23. Technical Manual. American Association of Blood Banks 13-th edition, Bethesda Maryland. - 2001.-P.114-125.

24. Buchner Th., Jurgens H., Berdel W.E., van de Loo J., Ritter J., Kienast J., Vormoor J. (Eds.) Transplantation in Hematology and Oncology // Springer-Verlag Berlin Heidelberg. – 2000.

25. Oguz FS. HLA system affects the age-at-onset in chronic myeloid leukemia. / Oguz FS, Kalayoglu S, Diler AS, Tozkir H, Sargin D, Carin M, Dorak MT// Am. J. Hematol. 2003. -Vol. 73(4). - P. 256-262.

26. Практическая и лабораторная гематология, С.М.Льюис, Б.Бэйн, И.Бэйтс, перевод с английского под редакцией А.Г.Румянцев. - Москва, 2009, 17-24 с.

27. Müller LP. Increased frequency of homozygosity for HLA class II loci in female patients with chronic lymphocytic leukemia. / Müller LP, Machulla HK. // Leuk. Lymphoma. 2002. - May. - Vol. 43(5). - P. 1013-1029.

Список рекомендуемой литературы

1. Болдырева М.Н., Хаитов Р.М., Дедов И.И. и др. Новый взгляд на механизм HLA ассоциированной предрасположенности к сахарному диабету 1 типа. Теоретические и прикладные аспекты. Иммунология.- 2005.- №6.- С.324-329.

2. Новик А.А. Генетика в клинической медицине/ А.А. Новик, Т.А. Камилова, В.Н. Цыган. СПб.: Военно-медицинская академия.- 2001.- 219с.

3. Буркитбаев Ж.К., Турганбекова А.А. Распространения аллелей HLA - среди доноров города Астана и анализ генетической предрасположенности к ряду заболеваний, связанных с антигенами HLA// Вестник медицинского центра управления делами Президента РК.- 2011.- № 1/1(39).- С.134-136.

4. Рамильева И.Р., Турганбекова А.А., Баймукашева Д.К., Якияева Д.У., Космагамбетов Е.С. / Особенности HLA-антигенов у больных с целиакии (лит. обзор)// Клиническая медицина Казахстана.- 2012.- №3(26).- С.191-192.

5. Михеев В.С. Медицинская биология и генетика клетки. СПб.: Изд-во «ВВМ», 2009. – 164 с.

6. Максимов О.Д., Клиническое значение HLA-фенотипа и иммунных нарушений у больных хроническим лимфолейкозом: дис. . канд. мед. наук: Москва, 2004.-117с.

7. Иммунология: практикум: учебное пособие/под ред. Л.В.Ковальчук, Г.А.Игнатьева, Л.В.Ганковская. – М.: ГЕОТАР - Медиа, 2010. – 176 с.

8. Клиническая иммунология и аллергология: учеб. пособие/ Под. ред. А.В. Караукулова. М., 2002.- С. 54-157.

9. Наглядная иммунология/ Бурместер Г.Р., Пецутто А.; пер. с англ.-3-е изд. - Москва, 2014.- 58-67с, 90с

10. Gluckman E. Hematopoietic Stem-Cell transplants using umbilical cord blood. / Gluckman E., Broxmeyer H.E. // N. Engl. J. Med. 2001.- Vol. 344 (24). - P. 1860-61.

11. Greer JP. / Greer JP //Wintrobe's Clinical Hematology. - 11th. Philadelphia: Lippincott, Williams, and Wilkins, 2004. - P. 2045-2062.

Приложение 1

А4 форматы Формат А4		БСН бойынша ұйым коды _____ Код организации по БИН _____
Қазақстан Республикасы Денсаулық сақтау министрлігі Министерство здравоохранения Республики Казахстан		Қазақстан Республикасы Денсаулық сақтау министрінің міндетін Атқарушының 2010 жылғы «23» қарашадағы № 907 бұйрығымен бекітілген № 410-10/е нысанды медициналық құжаттама
Ұйымның атауы Наименование организации		Медицинская документация Форма № 410-10/у утверждена приказом и.о. Министра здравоохранения Республики Казахстан «23» ноября 2010 года № 907

HLA-жүйесі бойынша типтеуге жолдама/ Направление на типирование по HLA-системе

Типтеу әдісі/метод типирования:

Типтеу әдісін белгілеңіз/отметьте метод типирования:		
☐ CDC	☐	☐ гепаринді қан (гепаринизированная кровь), EDTA бар қан (Кровь с EDTA)
☐ SSP	☐	☐ EDTA бар қан (Кровь с EDTA)
☐ SBT	☐	☐ EDTA бар қан (Кровь с EDTA)
☐ SSO	☐	☐ EDTA бар қан (Кровь с EDTA)

Медициналық ұйымның атауы
наименование медицинской организации _____

Бөлімше _____

отделение _____

Тегі _____

Аты _____

фамилия _____ имя _____

Әкесінің аты (болған жағдайда) _____

отчество (при его наличии) _____

Туған күні _____

Ұлты _____

дата рождения _____ национальность _____

Мекенжайы _____

домашний адрес _____

Пациенттер үшін /для пациентов: _____

Диагнозы _____

диагноз _____

Қан тобы мен резус-
тистілігі _____

группа крови и резус-фактор _____

ҚЖТ лейкоциттердің жалпы
саны _____

количество лейкоцитов в ОАК _____

Онкогематологиялық науқастар үшін қосымша/дополнительно для онкогематологических пациентов:
Бластты жасушалардың жалпы саны _____

количество бластных клеток _____

Емдеуші дәрігердің тегі, аты, әкесінің аты (болған жағдайда), қолы мен мөрі _____

фамилия, имя, отчество (при наличии), подпись и печать лечащего врача _____

Жауапты тұлғаның байланыс телефоны _____

контактный телефон ответственного лица _____

Үлгінің алынған күні мен уақыты _____

дата и время забора образца _____

Ескерпе _____

примечание _____

Приложение 2

А5 форматы Формат А5		БСН бойынша ұйым коды _____ Код организации по БИН _____
Қазақстан Республикасы Денсаулық сақтау министрлігі Министерство здравоохранения Республики Казахстан		Қазақстан Республикасы Денсаулық сақтау министрінің міндетін Атқарушының 2010 жылғы «23» қарашадағы № 907 бұйрығымен бекітілген № 410-2/е нысанды медициналық құжаттама
Ұйымның атауы Наименование организации		Медицинская документация Форма № 410-2/у утверждена приказом и.о. Министра здравоохранения Республики Казахстан «23» ноября 2010 года № 907

HLA-типтеу нәтижесі/ Результат HLA-типирования

Медициналық ұйымның атауы _____

наименование медицинской организации _____

Бөлімше _____

отделение _____

Реципиент немесе донор (кажеттінің астын сызыңыз)
реципиент или донор (нужное подчеркнуть)

Тегі _____ Аты _____

фамилия _____ имя _____

Әкесінің аты (болған жағдайда) _____

отчество (при наличии) _____

Туған күні _____ Үлгінің коды _____

Дата рождения _____ код образца _____

Бастапқы үлгінің түрі _____

вид первичного образца _____

Үлгінің алынған күні мен уақыты _____

дата и время забора образца _____

Үлгінің қабылдау күні мен уақыты _____

дата и время поступления образца _____

HLA-	Нәтижесі/результат	Типтеу әдісі метод типирования
A		
B		
Cw		
DRB1		
DQB1		

Ескертпе/примечание _____

Дәрігердің қолы/подпись врача _____

Бөлімше меңгерушісінің қолы/подпись заведующей отделением _____

Есепті қалыптастырған күні мен уақыты /дата и время формирования отчета _____