

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ



Первый заместитель Министра  
Д.Л. Пиневиц  
2017 г.  
Регистрационный № 130-1216

**МЕТОД КОНФИРМАТОРНОГО HLA-ТИПИРОВАНИЯ ПРИ  
ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

инструкция по применению

**УЧРЕЖДЕНИЯ РАЗРАБОТЧИКИ:**

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий», учреждение здравоохранения «9-я городская клиническая больница» г. Минска

**АВТОРЫ:**

к.м.н. Семенов Г.В., к.б.н. Расюк Е.Д., к.м.н. Злотникова М.В., к.м.н. Карпенко Ф.Н., д.м.н., профессор Усс А.Л., к.м.н. Искров И.А., Старцева А.Ю.

Минск, 2016

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д. Л. Пиневиц  
26.12.2017  
Регистрационный № 130-1216

**МЕТОД КОНФИРМАТОРНОГО HLA-ТИПИРОВАНИЯ  
ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ  
КЛЕТОК**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий», УЗ «9-я городская клиническая больница» г. Минска

АВТОРЫ: канд. мед. наук Г. В. Семенов, канд. биол. наук Е. Д. Расюк, канд. мед. наук М. В. Злотников, канд. мед. наук Ф. Н. Карпенко, д-р мед. наук, проф. А. Л. Усс, канд. мед. наук И. А. Искров, А. Ю. Старцев

Минск 2016

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

1. Бокс.
2. Весы.
3. Микроволновая печь для плавления агарозного геля.
4. Камера для горизонтального электрофореза.
5. Источник постоянного тока с напряжением не менее 150 В.
6. Оборудование для детекции и интерпретации результатов ПЦР-SSP.

### ***Расходные материалы***

1. Одноразовые наконечники с фильтром для ручных дозаторов.
2. Штатив для хранения микропробирок ПЦР-планшета.
3. Крышки или пластины для герметизации ПЦР-планшета.
4. Лот-специфичные таблицы интерпретации.

### ***Реактивы***

1. Набор для иммуномагнитной сепарации ДНК из цельной крови.
2. Наборы «low resolution» и «high resolution» для ДНК-типирования аллелей HLA класса I SSP HLA-A\*.
3. Наборы «low resolution» и «high resolution» для ДНК-типирования аллелей HLA класса ISSPHLA-B\*.
4. Наборы «low resolution» и «high resolution» для ДНК-типирования аллелей HLA класса I SSP HLA-C\*.
5. Наборы «low resolution» и «high resolution» для ДНК-типирования аллелей HLA класса II SSP HLA-DRB1\*.
6. Наборы «low resolution» и «high resolution» для ДНК-типирования аллелей HLA класса II SSP HLA-DQB1\*.
7. Рекомбинантная Taq-полимераза.
8. Агароза для электрофореза.
9. Этидиум бромид.
10. Буферы для электрофореза (TAE или TBE).

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Подбор гистосовместимых пар донор-реципиент для аллогенных родственных и неродственных трансплантаций гемопоэтических стволовых клеток (ГСК).

## **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Отсутствуют.

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

В настоящей инструкции рассмотрены алгоритмы проведения конфирматорного теста при различных видах трансплантации ГСК.

### **Конфирматорный тест HLA-типирования для неродственного донора ГСК**

Конфирматорный тест HLA-типирования при идентичности донора и реципиента осуществляется на уровне «high resolution» из свежего образца

крови. Производится молекулярное типирование I и II класса: HLA-A\*, -B\*, -C\*, -DRB1\*, -DQB1\* локусов. HLA-генотипирование осуществляется по технологии PCR-SSP.

### **Конфирматорный тест HLA-типирования для родственной трансплантации ГСК**

Данный тест включает молекулярное типирование «low resolution» совместимого с реципиентом sibса из свежих образцов крови по генам I класса HLA - A\*, -B\*, -C\* и II класса HLA -DRB1\*, - DQB1\*. HLA-генотипирование осуществляется по технологии PCR-SSP.

**Исследование генов системы HLA I и II класса** осуществляется методом молекулярно-генетического типирования и производится в несколько этапов:

выделение геномной ДНК;

амплификация путем полимеразной цепной реакции (ПЦР), детекция и визуализация полученных результатов.

Технология ПЦР-SSP (Sequence Specific Primers). SSP-праймеры предназначены для присоединения к специфическим участкам исследуемой ДНК. В случае комплементарности нуклеотидной последовательности праймера с исследуемой ДНК происходит их гибридизация (отжиг). Присутствие в реакционной смеси Taq-полимеразы запускает процесс амплификации — многократного увеличения количества копий ДНК. Продукты амплификации ДНК — ампликоны — переносятся в лунки агарозного геля, где осуществляется электрофорез.

Специфичные продукты и внутренний контроль становятся видимыми в геле под ультрафиолетовым светом. Амплификация внутреннего контроля должна быть обнаружена во всех образцах, которые отрицательны в их специфичной реакции. В положительных специфичных реакциях группа внутреннего контроля может быть подавлена из-за конкурентоспособных эффектов праймеров. Маркер молекулярной массы (стандарт длины ДНК), добавленный к гелю, используется для определения размера фрагмента.

В тех лунках, где специфичности праймеров совпадают со специфическими участками ДНК, регистрируют полосу продукта геля. По прилагаемой в инструкции таблице интерпретации или при помощи программы определяют соответствие HLA-аллели. Данный метод позволяет разделить аллели, так как амплификация гена происходит в лунках с разными праймерами, специфичными к полиморфным последовательностям.

В контроле контаминации не должно быть видимых полос.

### **Процедура получения ДНК**

1. В качестве исходного образца используется периферическая кровь пациентов с ЭДТА (не использовать гепаринизированную кровь).

2. Мануальный метод выделения ДНК производится с использованием наборов, основанных либо на магнитной, либо на колоночной экстракции ДНК в соответствии с инструкцией по применению производителя.

3. Для достижения наилучших результатов ПЦР-SSP амплификации и типирования в целом использовать высокоочищенную ДНК (отношение D260/D280 в пределах 1,6–1,8). Конечная концентрация ДНК перед ПЦР-SSP должна составлять около 20–50 нг/мкл.

**Процедура проведения амплификации и детекции продуктов ПЦР** методом гель-электрофореза осуществляется в соответствии с инструкциями по применению производителя наборов.

При помощи гель-документирующей системы или УФ-транслюминатора регистрируют полосы продуктов ПЦР.

#### **Интерпретация результатов**

Аллели HLA I и II класса выявляются по присутствию специфических продуктов ПЦР. Специфическая амплификация приводит к образованию фрагмента ДНК определенной длины, который выглядит в УФ-свете в геле как светящаяся красная полоса. Это указывает на то, что образец содержит либо конкретный аллель, либо один из аллелей, принадлежащих к соответствующей группе, определяемой парой праймеров. Конкретный аллель или группа аллелей определяется по лот-специфичным таблицам интерпретации или компьютерной программой. Совпадение/несовпадение HLA-генотипа у сибса и реципиента при проведении конфирматорного теста методом молекулярного типирования «low resolution» является дефинитивным при родственной трансплантации и не требует проведения HLA-типирования на уровне «high resolution».

### **ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

Проблема	Вероятная причина	Рекомендуемое решение
Амплификация (специфическая и для внутреннего контроля) отсутствует	Количество ДНК недостаточно	Проверить, чтобы объем и концентрация образца ДНК были правильными
	Образец ДНК содержит ингибиторы ПЦР (белки и этанол, оставшиеся от этапа преципитации)	Исследовать качество образца ДНК. В точности следовать указаниям методики получения ДНК. Применить альтернативный метод экстракции ДНК. Выделить новый образец ДНК
	Для получения ДНК была использована гепаринизированная кровь	Использовать кровь с иным видом антикоагулянта
	ДНК разведена буфером, содержащим ЭДТА	Повторить экстракцию ДНК и развести ее в стерильной воде

Неудачная амплификация в некоторых лунках	Пробирки, в которых проводится ПЦР, закрыты неплотно, что приводит к испарению и, как следствие, неудачной амплификации	Прижать пленку или крышки плотно. Применить для этого специальный инструмент
	При внесении в гелевые лунки произошла какая-то ошибка. В некоторые лунки попало по две амплифицированных ПЦР-смеси	Проверить, что загружено правильное количество гелевых лунок. Каждая лунка должна содержать примерно одинаковое количество ПЦР-смеси
	Пипеточные дозаторы неисправны или неправильно откалиброваны	Проверить и откалибровать инструменты в соответствии с инструкцией производителя
	Ошибки пипетирования	Проводить дозирование с большей аккуратностью
	Образец ДНК, Taq-полимераза или ПЦР-смеси были перед применением недостаточно перемешаны	Перед внесением перечисленные жидкости следует кратковременно встряхивать на вортексе
Бледные полосы внутреннего контроля	Загрязнение образца ДНК	Оценить чистоту выделенной ДНК. Выполнить ее экстракцию заново, приготовив для этого свежие реактивы
	Низкая концентрация ДНК	Измерить концентрацию ДНК и довести ее до 50 нг/мкл
	Слишком высокая температура отжига. Термоциклер не откалиброван	Проверить программу. Откалибровать термоциклер. Для ПЦР-SSP это следует делать не реже одного раза в полгода
	Недостаточное количество термостабильной ДНК-полимеразы	Применить для ПЦР большее количество фермента
	Низкое качество термостабильной ДНК-полимеразы	Перейти на применение альтернативной Taq-полимеразы

Неспецифическая амплификация (пятна или штрихи на треках)	Загрязненный образец ДНК	Все полосы размера больше внутреннего контроля следует игнорировать. Проверить качество ДНК. Провести повторное выделение ДНК. Полное отсутствие ДНК тоже может привести к штриховым картинам на треке
Яркость амплификационных полос от постановки к постановке ухудшается	Раствор для окраски геля на основе бромид этидия состарился	Приготовьте новую порцию окрашивающего раствора
	Одна из УФ-ламп транслюминатора вышла из строя	Проверить УФ-осветитель
Ложноотрицательная амплификация	Слишком высокая температура отжига. Термоциклер не откалиброван	Проверить программу. Откалибровать термоциклер. Для ПЦР-SSP это следует делать не реже одного раза в полгода
Ложноположительная амплификация	Контаминация	Использовать перчатки, наконечники для дозаторов с фильтрами, провести операции в хорошо разделенных зонах пре- и постамплификации. Не пренебрегать культурой проведения анализа
	Загрязнение образца ДНК	Оценить чистоту выделенной ДНК. Провести ее экстракцию заново
	Слишком низкая температура отжига. Термоциклер не откалиброван	Проверить программу. Откалибровать термоциклер. Для ПЦР-SSP это следует делать не реже одного раза в полгода
Необычная картина треков	Применяется неподходящая таблица интерпретации	Проверить, чтобы номер серии набора совпадал с номером серии таблицы интерпретации

	Трек содержит ложнопозитивный результат	Проверить правильность размеров продуктов специфической амплификации. Проверить, не могла ли ложнопозитивная полоса появиться в результате переноса или не образована ли она димером праймера
	Новый аллель, не отраженный таблицей интерпретации	Повторите типирование. Если новая картина воспроизводится, обратиться к производителю за информацией об образцах амплификации последних описанных аллелей
Слаборазличимые полосы в пятнах	Возможно, электрофорезный буфер перегрелся	Применить рекомендованный буфер. Понизить напряжение разгонки
	Лунки в геле чрезмерно широкие	Применить гребенку с более тонкими зубьями (4x1 мм)
Ампликон разгоняется по треку неровно	Для приготовления геля и для разгонки использованы буферы разной ионной силы. Разгоночный буфер несовместим с ПЦР-ампликоном. Пузырьки в наконечнике пипетки	Для плавления агарозы при приготовлении геля рекомендуется брать тот же раствор, что будет затем использован в качестве разгоночного буфера