

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра
_____ Д.Л. Пиневич
_____ 2012 г.
Регистрационный № 147-112



Метод генетической диагностики первичных иммунодефицитов
инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический
центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

АВТОРЫ:

Шарапова С.О., Мигас А.А., Гурьянова И.Е., к.б.н. Белевцев М.В.,
д.м.н., проф., член-корр. Алейникова О.В.

Минск, 2012

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневич

28.11.2012

Регистрационный № 147-1112

**МЕТОД ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ
ПЕРВИЧНЫХ ИММУНОДЕФИЦИТОВ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

АВТОРЫ: С.О. Шарапова, А.А. Мигас, И.Е. Гурьянова, канд. биол. наук
М.В. Белевцев, д-р мед. наук, проф., чл.-корр. НАН Беларуси О.В. Алейникова

Минск 2012

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ПИД — первичные иммунодефициты
ГСК — гемопоэтическая стволовая клетка;
HLA — Human Leucocyte Antigens, или главный комплекс гистосовместимости
ПЦР — полимеразная цепная реакция
ТКИН — тяжелая комбинированная иммунологическая недостаточность преимущественно с АТ (антительным) дефектом
ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК — рибонуклеиновая кислота
SSCP — single strand conformation polymorphism, конформационный полиморфизм одноцепочечной молекулы ДНК
ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота

Проведение генетической диагностики ПИД (мутационного анализа) необходимо в следующих случаях: 1) установление точного диагноза; 2) помощь в генетическом консультировании, определение носителей в семье, пренатальная диагностика; 3) возможность получения информации при некоторых ПИД, для которых описана генотип-фенотипическая корреляция, о возможном прогнозировании клинических осложнений; 4) установление точного диагноза при атипичной клинической и лабораторной манифестации; 5) возможность диагностики до появления клинической манифестации у детей с потенциально летальными формами ПИД (после генетического консультирования, пренатальной диагностики), и следовательно, возможность трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) или генотерапии.

Настоящая инструкция по применению позволит повысить качество диагностики первичных иммунодефицитов.

Медико-социальная значимость генетической диагностики первичных иммунодефицитов позволяет установить точный диагноз у ребенка в раннем возрасте до полной клинической манифестации и наступления перманентного повреждения органов и тканей вследствие тяжелых, повторяющихся инфекций, что в целом снизит смертность и инвалидизацию данной группы пациентов.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Оборудование

Центрифуга

Центрифуга с охлаждением на 14000 об./мин

ПЦР боксы

Вакуумный аспиратор

Вортекс

Спектрофотометр

Термомиксер

Термоциклер

Аппарат для горизонтального электрофореза в агарозном геле

Аппарат для вертикального электрофореза в полиакриламидном геле

Документирующая система

Микроскоп

Проточный цитофлуориметр

Секвенатор

Морозильник 20°C

Морозильник -70°C

Дозаторы

Расходные материалы

Наконечники для дозаторов с аэрозольными барьерами объемом от 0,1 до 1000 мкл

Центрифужные пробирки (объем 15 мл)

Пробирки для проведения ПЦР (объем 0,2 мл)

Пробирки для проточного цитофлуориметра (объем 5 мл)

Пастеровские пипетки

Камера Горяева

Реагенты

Реагент для создания градиента плотности (1,077 г/см³)

TRI-reagent

Тақ-полимераза

β-меркаптоэтанол

Агароза

Вода деионизованная

Изопропанол

Ингибитор РНКаз

Маркер молекулярного веса

Обратная транскриптаза

Растворы дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (дНТФ)

Набор праймеров

Рэндом гексамеры

Фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (25:24:1)

Хлороформ

Этанол 70%, Этанол 96%

Фосфатно-солевой буфер (рН = 7,2–7,4)

Раствор, лизирующий эритроциты

Раствор, фиксирующий лимфоциты

Моноклональные антитела

Раствор для внутриклеточного и внутриядерного определения белков в лимфоцитах

Дигидрородамин

Цитрат натрия

Хлорид калия

Коллагеназа

Этанол (или метанол)

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Показанием для проведения генетической диагностики первичных иммунодефицитов является:

1. Установление точного диагноза в случае, если результаты иммунологических и других лабораторных тестов трактуются неоднозначно.

2. При проведении трансплантации ГСК выявление точной мутации помогает отследить процентное приживание донорской стволовой клетки в случае, если отследить химеризм другими методами не возможно (полное совпадение по HLA, одна группа крови, один пол донора и реципиента).

3. Постановка точного диагноза, если клиническая презентация атипична, поздняя манифестация, нестандартное лабораторное проявление вследствие гипоморфных мутаций.

4. Определение точной мутации помогает провести генетическое консультирование семьи, определить число родственников–носителей

патологического гена, а также возможность пренатальной диагностики при аутосомно-рецессивных и аутосомно-доминантных типах наследования.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Генетическая диагностика первичных иммунодефицитов начинается с определения типа иммунодефицита, который характеризуется перечнем клинических и лабораторных признаков. Тип иммунологического дефицита устанавливается с использованием последней версии классификации экспертного комитета Международного объединения иммунологических сообществ [*an update on the classification PID, 2011. Frontiers in Immunology*]. Если за один иммунодефицит отвечает несколько генов, во-первых, выбирается ген, который наиболее часто описан среди пациентов, а затем другие гены по уменьшению частоты встречаемости.

Данная инструкция разработана для выявления мутаций в 20 генах ПИД, относящихся к 6 из 8 разделов современной классификации врожденных иммунодефицитов. Данная классификация включает в себя следующие разделы.

1. Комбинированные Т/В-клеточные иммунодефициты:
 - 1.1. ТКИН.
 - 1.2. Другие комбинированные иммунодефициты.
2. Иммунодефициты с преимущественно АТ-дефектом.
3. Точно определенные синдромы:
 - Синдром Вискотт–Олдрич;
 - Дефекты репарации ДНК;
 - Тимические дефекты;
 - Гипер-IgE синдром и др.
4. Врожденные дефекты числа и/или функций фагоцитов.
5. Недостаточность системы комплемента.
6. Синдромы иммунной дисрегуляции.
7. Дефекты врожденного иммунитета.
8. Аутовоспалительные синдромы.

В табл. 1 представлены названия разделов и перечень иммунодефицитов, для которых разработана генетическая диагностика, перечень генов и количество экзонов в каждом гене.

Таблица 1 — Перечень иммунодефицитов и генов для генетической диагностики

№	Иммунодефицит, название	Ген(ы)	Количество экзонов
<i>Комбинированные T/B-клеточные иммунодефициты (тяжелая комбинированная иммунная недостаточность — ТКИН)</i>			
1	X-сцепленный ТКИН	<i>IL2RG</i>	8
2–6	ТКИН с аутосомно-рецессивным типом наследования	<i>RAG1, RAG2, ADA, IL7Ra, Jak3</i>	13, 7, 12, 9, 24
<i>Иммунодефициты с преимущественно АТ-дефектом</i>			
7	Агаммаглобулинемия типа Брутона (X-сцепленная)	<i>BTK</i>	19
8	Гипер-IgM синдром (X-сцепленный)	<i>CD40L</i>	5
9–10	Общий вариабельный иммунодефицит (ОВИН)	<i>TACI, ICOS</i>	5, 2
<i>Точно определенные синдромы</i>			
11	Синдром Вискотт–Олдрич	<i>WAS</i>	12
12	Синдром Ниймеген	<i>NBS1</i>	16
13	Синдром Луи–Барр (атаксия-телеангиэктазия)	<i>ATM</i>	64
<i>Синдромы иммунной дисрегуляции</i>			
14	X-сцепленный лимфопролиферативный синдром I типа	<i>SH2D1A</i>	4
15	Аутоиммунный лимфопролиферативный синдром I типа	<i>FAS</i>	9
16	Аутоиммунный полигландулярный синдром I типа	<i>AIRE</i>	14
17	Иммунная дисрегуляция, полиэндокринопатия, энтеропатия, сцепленная с X-хромосомой	<i>FOXP3</i>	12
<i>Врожденные дефекты числа и/или функций фагоцитов</i>			
18	Врожденная нейтропения	<i>ELANE</i>	5
19	Хроническая гранулематозная болезнь (X-сцепленная)	<i>CYBB</i>	13
<i>Недостаточность системы комплемента</i>			
20	Врожденный ангионевротический отек	<i>Cinh</i>	8

Генетическая диагностика первичных иммунодефицитов

Состоит из следующих этапов:

1. Подбор праймеров для кодирующей части каждого экзона и сплайс-сайтов конкретного гена. Отработка полимеразной цепной реакции (ПЦР), условий амплификации и температуры отжига.

2. Выделение ДНК из мононуклеаров периферической крови или костного мозга или других видов биологического материала пациента. При подозрении тяжелых форм иммунодефицита одновременно набирается периферическая кровь родителей для подтверждения носительства предполагаемого гена.

3. Скрининг на поиск изменений в подвижности ДНК в полиакриламидном геле — SSCP (single strand conformation polymorphism).

4. Секвенирование выбранных экзонов.

5. Анализ полученных последовательностей ДНК, сравнение цепочки нуклеотидов с референсными базами данных (www.ensembl.org). Описание обнаруженных изменений (мутации, полиморфизм, дикий тип) по номенклатуре.

1.1. Подбор праймеров и условий амплификации

Праймеры подбирались с учетом следующих требований, если позволяла последовательность матрицы: длина праймера — 18–22 нуклеотида. Температура отжига — 55–65°C. Содержание GC — 40–70%. Отсутствие на 3'-конце стабильных петель. Неспособность формировать праймер-димеры со вторым праймером. Отсутствие кластеров повторяющихся нуклеотидов. Отсутствие альтернативных сайтов отжига прямого и обратного праймеров на ДНК человека (проверялось с помощью интернет-программы BLAST) в пределах одной хромосомы.

Праймеры были подобраны таким образом, чтобы в ходе ПЦР амплифицировались не только последовательности экзонов, но и сплайс-сайты.

1.2. Выделение ДНК из суспензии клеток

1. *Лизис.* Клетки отмывают в фосфатно-солевом буфере (PBS — phosphate buffered saline) или физиологическим раствором. После осаждения часть жидкости оставляют в пробирке (20–40 мкл), осадок клеток тщательно ресуспензируют. Лизирующий буфер (100 mM NaCl, 10 mM TrisHCL, 25 mM EDTA, 0,5% SDS) добавляют в объеме 100 мкл на 1 млн. Пипетируют. Лизируют при 50–60°C при перемешивании в течение 1–24 ч. Экстракция фенол-хлороформной смесью (фен.-хл.-изоам. спирт 25:24:1 pH = 7,5–8,5). Фенол-хлороформную смесь добавляют в лизат в равном объеме (400 мкл на 600 мкл лизата). Центрифугируют 1 мин при 1–5000 оборотов. Отбирают верхнюю фазу. Перед второй экстракцией держат пробирку в термомиксере при +50°C в течение 10 мин. Затем проводят высаливание белка. К лизату добавляют 8М ацетат аммония (АА) в объеме, равном половине объема лизата. Смесь тщательно перемешивают на центрифуге вортекс. Центрифугируют при 14000 оборотах 10–20 мин с охлаждением.

2. *Осаждение и отмывка ДНК.* Добавить равный объем изопропанола. Перед осаждением желательно охладить смесь до -10–20°C. После отбора супернатанта добавить 70% этанол, 300 мкл, если осадка очень мало и 500–700 мкл — если осадок выраженный. Перемешать переворачиванием и центрифугировать при

максимальных оборотах 5–10 мин. Затем жидкость отбирают, осадок высушивают в ламинаре в виде открытой пробирки, растворяют в 30–200 мкл ТЕ буфера в зависимости от количества осадка. Если осадка очень много (рисовое зернышко), можно растворить в 300–350 мкл ТЕ-буфера, однако чистота ДНК в этом случае ниже. Растворяют осадок обычно в термомиксере 10 мин – 1 ч при 25–40°C.

1.3. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) и однонитевой конформационный полиморфизм (SSCP)

ПЦР проводилась в стандартных условиях: 1хПЦР-буфер с KCl, 1,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ дНТФ, 0,5 мкМ каждого праймера, 1U Taq полимеразы. Тотальная клеточная ДНК пациента вносилась в количестве 100 нг. Число циклов амплификации составляло 35. Простая ПЦР, объем — 25 мкл, ПЦР проводили на твердотельном амплификаторе.

Методика проведения SSCP

Приготовление геля (8%) на 45 мл:

40% сток Акриламид/бисакриламид (39:1)	11,25мл
5хТВЕ-буффер	4,5 мл
Глицерол	2,5 мл
Вода	до 44 мл
APS (персульфат аммония)	300 мкл
TEMED	30 мкл

После добавления персульфата аммония и TEMED все тщательно перемешать и в течение 5 мин залить гель.

Оставить полимеризоваться на 1–2 ч при комнатной температуре.

Приготовление образцов: Промываем лунки геля 0,5хТВЕ-буфером с помощью дозатора и наконечника с тонким носиком. Ставим гель на преран в камеру с 0,5хТВЕ, примерно на 1 ч при 200 В (6–8 Вт). В это время готовим образцы для внесения в гель: смешиваем в пропорции 2:1 формамид (х.ч.) и ПЦР-продукт (должен быть четким при электрофорезе в агарозном геле, без неспецифики). Общий объем образца зависит от размера лунок. В нашем случае при ширине лунок 5 мм смешиваем 4 мкл формамида и 2 мкл ПЦР-продукта.

Затем ставим образец денатурировать на 5–10 мин при 95°. По окончании денатурации пробирки с денатурированными образцами помещаем на лед (продержать на нем минимум 5 мин), с него же и закапываем их в лунки. Электрофорез (градиентный) либо вручную: 5 мин — 50В, 5 мин — 100 В. До 16 ч — 350 В (мощность примерно 15 Вт). Необходимым условием является постоянная температура (18–23°) в помещении на протяжении всего электрофореза. Следует избегать нагревания стекол. Длина анализируемых фрагментов 150–650 п.о., оптимально 200–300 п.о. Окрашивание производится в 1X растворе красителя SYBRGold в буфере, в котором шел форез в течение 8–15 мин. Анализ производится на обычном трансиллюминаторе. Полученный продукт анализировался в 1,5% агарозном геле и далее использовался для SSCP-анализа в 10% (37,5:1) полиакриламидном геле с добавлением 5% глицерола. Красили гель в растворе флуоресцентного красителя SYBRGold в 0,5%ТВЕ

(1:10000). Для фотосъемки используется документирующая система закрытого типа с цифровой камерой.

1.4. Секвенирование

Продукт ПЦР, предназначенный для секвенирования, очищался от неспецифических продуктов амплификации с использованием электрофореза в 6% полиакриламидном геле и элюировался из вырезанного фрагмента геля в ТЕ(Трис-ЭДТА)-буфер (рН = 8,0) в ходе инкубации в термомиксере при 45°C в течение 1 ч.

Далее очищенный образец использовался в качестве матрицы для реакции секвенирования. Реакция терминации, принцип которой основан на получении фрагментов различной длины, оканчивающихся мечеными флуорохромом диоксинуклеотидами, проводилась с использованием тех же праймеров, что и для ПЦР и готовой смеси терминаторов BigDye Terminators v1.1. Для секвенирования в каждую реакцию терминации вносилось 4 мкл ТЕ-буфера, содержащего очищенный ПЦР-продукт, 3,2 пмоль прямого или обратного праймера, использовавшихся для ПЦР амплификации, 9 мкл чистой воды, 4 мкл раствора терминаторов BigDye Terminators v1.1 и 2 мкл буфера для секвенирования. Продукты терминации очищались от невстроившихся терминаторов преципитацией этанол/ЭДТА. Капиллярный электрофорез и детекция полученных продуктов терминации осуществлялись на автоматическом капиллярном секвенаторе.

Генетическая диагностика первичных иммунодефицитов осуществляется после осмотра врачом, сбора семейного анамнеза (особенно важны данные ранней младенческой смертности — сыновей, братьев, дядей, дедушек по материнской линии для диагностики X-сцепленных иммунодефицитов у мальчиков), проведения всего спектра лабораторных и иммунологических исследований, причем иммунологический анализ рекомендуется повторить дважды.

Выбор гена для секвенирования начинается с определения типа иммунодефицита (комбинированный Т-/В-, дефект АТ-образования, дефекты числа и/или функций фагоцитов — табл. 1). При диагностике комбинированных и тяжелых комбинированных иммунодефицитов определяется фенотип лимфоцитов периферической крови, а затем по фенотипу выбирается ген (табл. 2).

Таблица 2 — Соответствие генов к фенотипу лимфоцитов периферической крови у пациентов с ТКИН

№	Иммунофенотип	Ген	Количество экзонов
1	Т-В+NK+	<i>IL7-Ra</i>	12
2	Т-В+NK-	<i>Common-j-chain</i>	9
3	Т-В+NK-	<i>Jak3</i>	24
4	Т-В-NK+	<i>RAG1</i>	Фрагменты (13)
5	Т-В-NK+	<i>RAG2</i>	Фрагменты (7)
6	Т-В-NK-	<i>ADA</i>	12

При диагностике дефектов АТ-образования, в частности агаммаглобулинемии, мутационный анализ гена ВТК выполняется всем мальчикам после стандартного иммунологического исследования и типирования костного мозга для определения блока дифференцировки В-лимфоцитов с использованием маркеров (CD19, CD10, CD34).

Выбор генов при точно диагностированных иммунодефицитах устанавливается клинически; синдром Вискотт–Олдрич — после определения размеров тромбоцитов и выявления белка WAS в лимфоцитах периферической крови.

Если диагноз не ясен, т. е. клинические и лабораторные признаки характерны для нескольких иммунодефицитов, то для секвенирования выбирается спектр генов, причем гены могут быть из разных групп иммунодефицитов (например, гены ТКИН при поиске атипичных фенотипов, гены иммунодефицитов с нарушением иммунорегуляции и др.). Спектр генов определяется данными литературы. Для всех разработанных генов имеются данные литературы об атипичной презентации, поздней манифестации иммунодефицита, а также для некоторых о частоте встречаемости данного гена у детей различных регистров.

Генетический диагноз первичный иммунодефицит устанавливается в том случае, если после секвенирования в последовательности ДНК обнаружены патологические изменения в виде гомозиготных мутаций, гетерозиготных компаундов, патогенного полиморфизма при сравнении полученной цепочки нуклеотидов с референсными последовательностями.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Возможные сложности в проведении генетической диагностики первичных иммунодефицитов и способы их устранения изложены в табл. 3.

Таблица 3 — Возможные сложности в проведении генетической диагностики первичных иммунодефицитов и способы их устранения

Проблемы	Способы разрешения
ПЦР не проходит	Проверить качество ДНК, очистить ДНК методом высаливания, повторить мутационный анализ на свежесыводенной ДНК
SSCP не проходит	Проверить качество реагентов и ДНК, условия проведения и температуру в помещении, повторить анализ
Реакция секвенирования не проходит	Проверить количество ДНК в образце, повторить реакцию секвенирования