



HLA-типирование

Набор реагентов для типирования генов гистосовместимости человека (HLA) II класса методом амплификации ДНК

HLA-ТИПИРОВАНИЕ

НАБОРЫ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ТИПИРОВАНИЯ ГЕНОВ ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ ЧЕЛОВЕКА (HLA) II КЛАССА МЕТОДОМ АМПЛИФИКАЦИИ ДНК.

РУ 2008/03891

Набор реагентов для типирования гена HLA-DRB1 методом ПЦР
в режиме реального времени

Набор реагентов для типирования гена HLA-DQA1 методом ПЦР
в режиме реального времени

Набор реагентов для типирования гена HLA-DQB1 методом ПЦР
в режиме реального времени

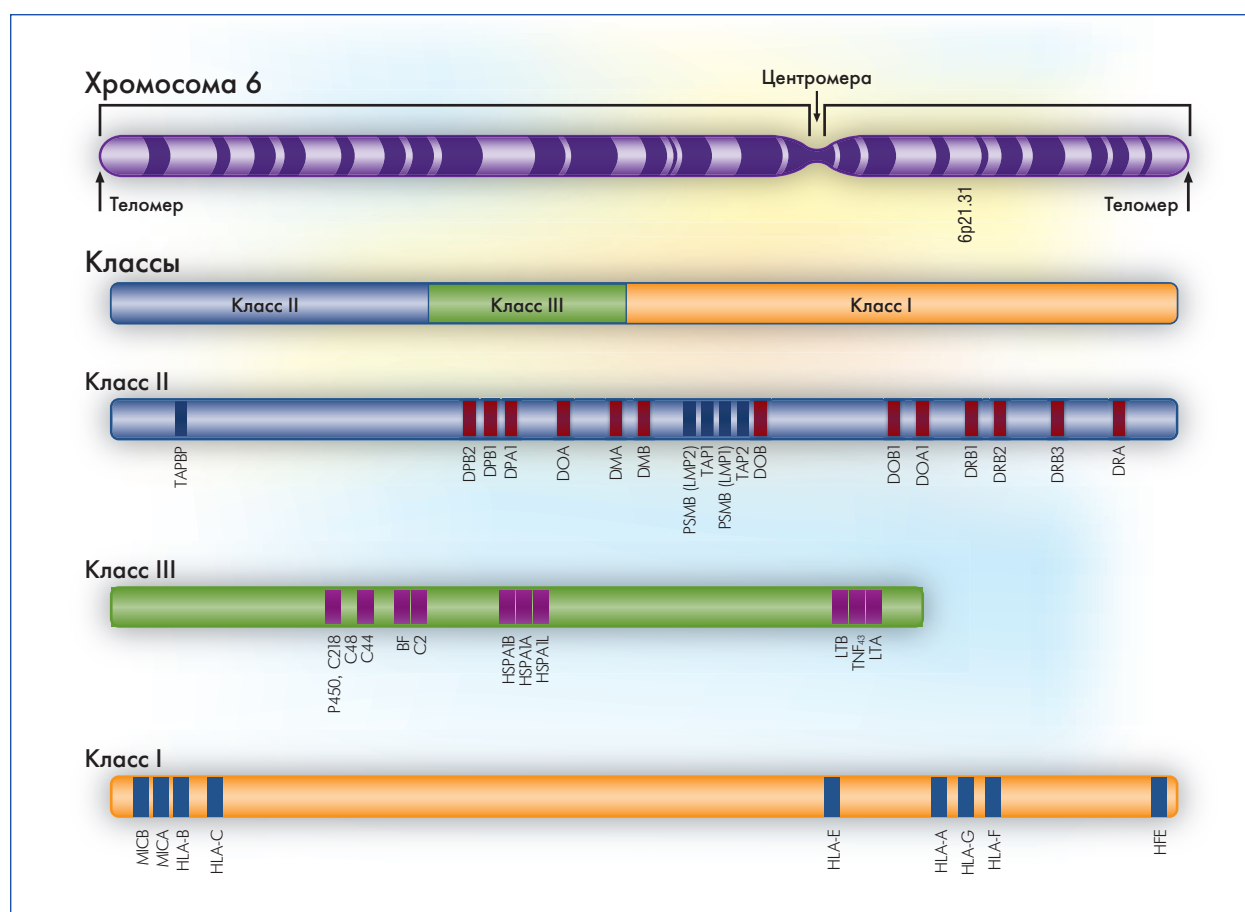


Рис. 1 Главный комплекс гистосовместимости

HLA (от Human Leukocyte Antigens) – комплекс генов, компактно расположенный на 6-й хромосоме человека. Установлено, что гены HLA наряду с другими являются генами иммунного ответа человека.

Главная функция белков «классических» генов HLA – «предоставление» клеткам иммунной системы как собственных, так и чужеродных фрагментов белка для запуска иммунного ответа. «Классические» гены HLA бывают I (A, B, C) и II класса (DRB1, DQA1, DQB1, DPB1). Диагностика HLA-

системы – это типирование, то есть определение, какие конкретно варианты генов (или белков) из всех возможных имеются у конкретного человека. Существуют два варианта каждого HLA-гена (разные или одинаковые), каждый из которых человек получил от своих родителей.

Отличительной особенностью генов HLA является их чрезвычайное разнообразие – около 13500 вариантов генов (аллелей). Эти варианты объединены в группы аллелей. Таких групп аллелей в пределах каждого гена HLA значительно меньше, например у гена DRB1 – 13.

HLA-типирование I класса можно проводить двумя методами: при помощи микролимфоцитоксического теста специфическими анти-HLA-сыворотками и различными методами на основе ПЦР, HLA-типирование II класса – только методами на основе ПЦР.

HLA-типирование широко применяется в следующих областях медицины:

- ❖ определение тканевой совместимости донора и реципиента при трансплантации органов и тканей;
- ❖ дифференциальная диагностика и прогноз развития аутоиммунных заболеваний;
- ❖ диагностика причин репродуктивных нарушений неясной этиологии.

Для диагностических целей используют HLA-типирование генов DRB1, DQA1 и DQB1 на уровне низкого разрешения. Для HLA-DRB1 – 13 групп аллелей, для HLA-DQA1 – 8 групп аллелей, для HLA-DQB1 – 12 групп аллелей.

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ



Генотипирование по локусу DRB1 на уровне групп аллелей (низкое разрешение) используется для подбора тканесовместимых донора и реципиента при первичных трансплантациях органов, например почек. Показано, что такой уровень генотипирования является достаточным для обеспечения подбора тканесовместимого донора при первичной трансплантации почки на уровне, соответствующем передовым трансплантологическим центрам мира.

Генотипирование по локусам DRB1, DQB1 на уровне групп аллелей используется для подбора потенциального донора при родственных пересадках гемопоэтических стволовых клеток, а также для первичного скрининга потенциального донора при неродственных пересадках гемопоэтических стволовых клеток.

АУТОИММУННЫЕ ПАТОЛОГИИ



Риск развития сахарного диабета 1 типа, одного из наиболее тяжелых аутоиммунных заболеваний, в 10 раз выше при определении в генотипе любых двух вариантов из числа следующих: DRB1*01, *03, *04, *08, *09, *10. Учитывая многочисленные данные мировой литературы, можно распространить этот вывод, сделанный при изучении ассоциаций HLA с сахарным диабетом 1 типа, на все аутоиммунные заболевания.

РЕПРОДУКТИВНЫЕ ПРОБЛЕМЫ



Различие супругов по вариантам генов HLA является одним из важных условий успешного наступления и вынашивания беременности. Сходство супругов между собой по вариантам генов HLA ведет к увеличению вероятности появления плода с двойным набором одинаковых вариантов генов, то есть HLA-гомозигот, что является неблагоприятным фактором, следствием могут быть репродуктивные потери. Поэтому для диагностики причин репродуктивных неудач используют HLA-типирование супругов для

установления сходства между ними по вариантам генов HLA.

Кроме того, известно также, что нарушение репродуктивной функции может быть первым признаком аутоиммунных расстройств. Аутоиммунные нарушения, в том числе клинически бессимптомные, могут приводить к нарушениям репродукции на различных стадиях репродуктивного процесса. Определение HLA-«маркеров» (см. «Аутоиммунные патологии») аутоиммунного процесса может помочь в установлении причин репродуктивных потерь как у женщин, так и у мужчин.

Преимущества использования ДНК-диагностики являются:

- ❖ высокая аналитическая чувствительность;
- ❖ высокая аналитическая специфичность теста;
- ❖ высокая скорость проведения анализа.

Компания «ДНК-Технология» разработала наборы реагентов для типирования генов HLA-DRB1, HLA-DQA1 и HLA-DQB1 методом ПЦР в режиме реального времени (табл. 1).

Таблица 1. Наборы реагентов производства компании «ДНК-Технология» для генотипирования HLA II класса

Наименование возбудителя	Формат детекции				РУ	Назначение*
	Форез	Flash	Rt	qPCR		
HLA-DRB1 (DRB1 – 14 специфичностей: 01, 03, 04, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13a, 13b, 14, 15, 16)	–	–	*	–	2008/03891	IVD
HLA-DQA1 (DQA1 – 8 специфичностей: *0101, *0101 или *0102, *0102 или *0103, *0101/*0102 или *0101/*0103, *0103, *0101/*0103 или *0102/*0103, *0401, *0601, *0401/*0601)	–	–	*	–	2008/03891	IVD
HLA-DQB1 (DQB1 – 12 специфичностей: *0301, *0302, *0303, *0304, *0305, *0501, *0503, *0601 и групп аллелей гена *02, *0401/*0402, *0502/*0504, *0602-8)	–	--	*	–	2008/03891	IVD

* Примечание:

IVD – наборы реагентов имеют регистрационное удостоверение, облагаются НДС 10 %

Формат наборов:

- нераскапанные – HLA-DQA1, HLA-DQB1;
- стрипованные (8 шт. по 0,2 мл) – HLA-DRB1.

Температура хранения:

+2 ... + 8 °С (Taq-АТ-полимераза на – 20 °С для наборов HLA-DQA1, HLA-DQB1).

Срок годности: 6 месяцев.

Наборы реагентов для выделения ДНК:

- ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА;
- ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА;
- ПРОБА-МЧ_ГЕНЕТИКА.

Материал для исследования: цельная периферическая кровь.

Рекомендуемые дополнительные реагенты:

- реагенты для контроля качества ДНК (КВМ) предназначены для определения и приблизительной оценки количества геномной ДНК человека методом ПЦР в режиме реального времени в биологическом материале человека;
- для HLA-DRB1 КВМ входит в состав набора.

Для проведения анализа необходимы следующие расходные материалы и оборудование:

- микропробирки (или микропробирки в стрипах) объемом 0,2 мл для ПЦР-анализа, адаптированные для работы с термоциклером в режиме реального времени;
- штатив и насадка на микроцентрифугу (вортекс) для стрипованного пластика.

Оборудование, необходимое для проведения анализа:

для комплектов реагентов в формате Rt – приборы серии ДТ производства ООО «НПО ДНК-Технология» (ДТ-322 (кроме DQA1, DQB1), ДТлайт, ДТпрайм, ДТ-96).

Приборы производства **компании «ДНК-Технология»** оснащены специально разработанным русскоязычным программным обеспечением, поддерживающим **автоматическую** обработку данных и выдачу результатов исследования в удобной для интерпретации форме (рис. 2).

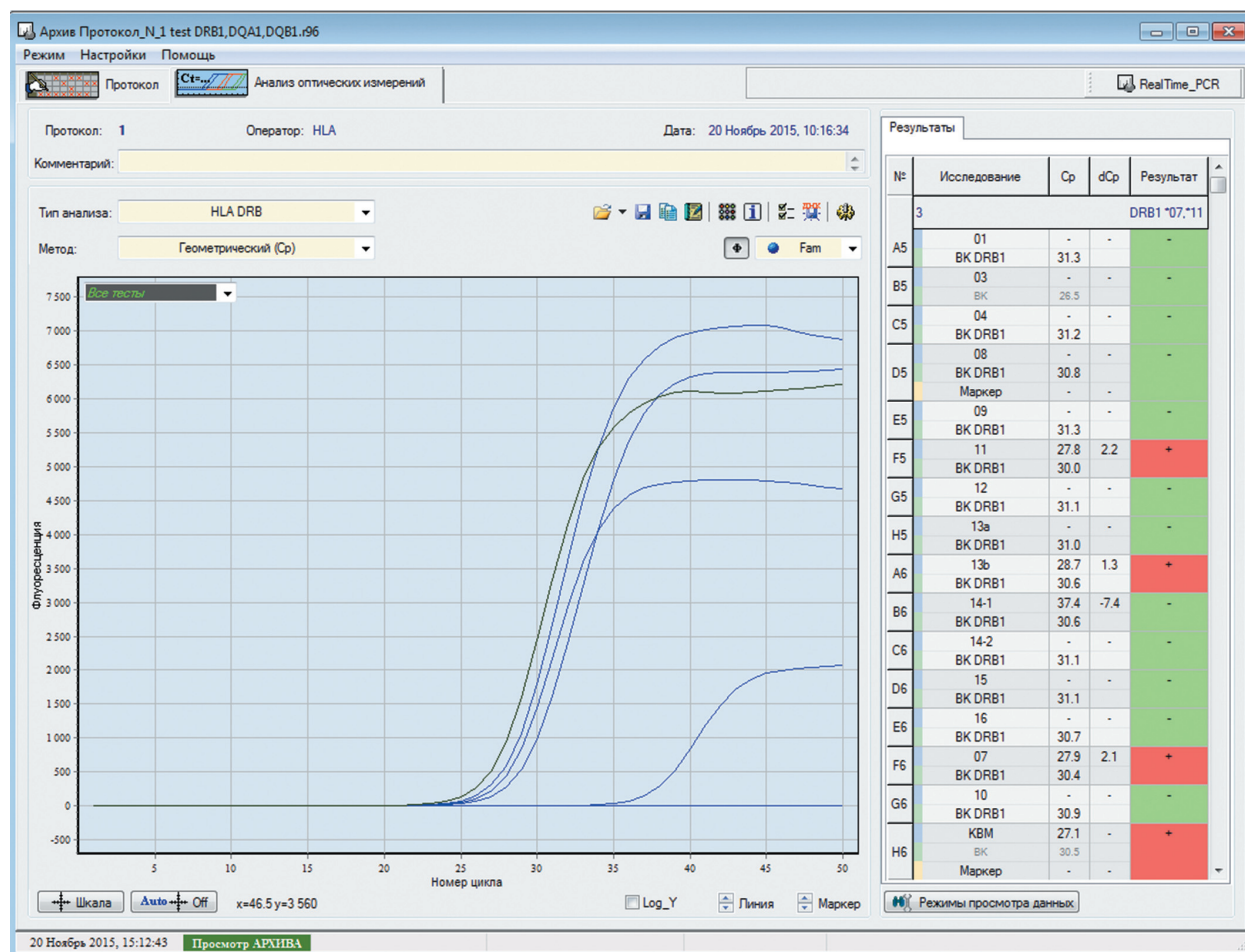


Рис. 2. Приборы производства компании «ДНК-Технология»

Уникальные технические характеристики приборов позволяют существенно сократить общее время проведения анализа. Это значительно экономит время исследования и обеспечивает высокую пропускную способность лаборатории.

Кроме того, программа позволяет выдавать результаты **в удобной и наглядной форме** для анализа полученных данных врачами-клиницистами (рис. 3)

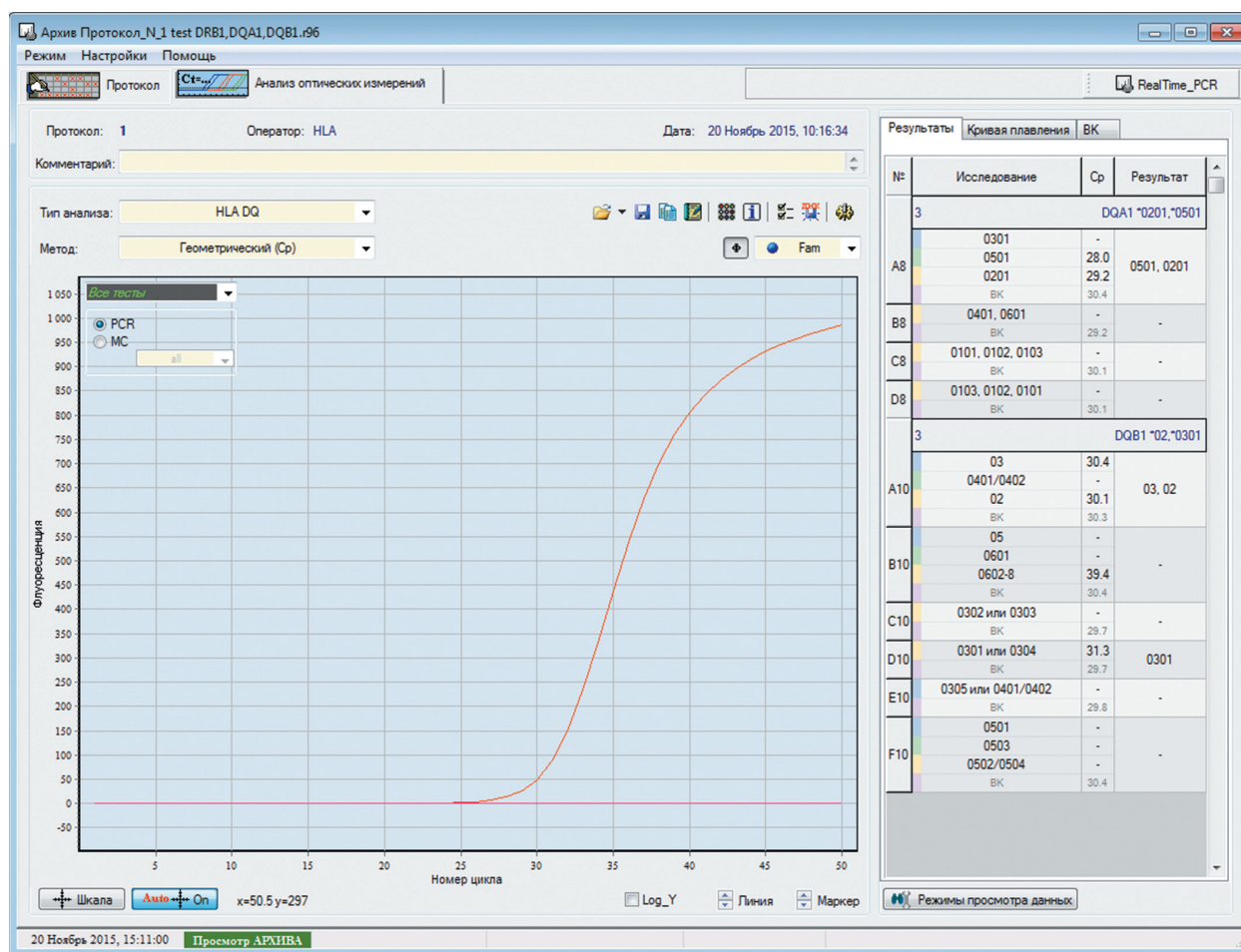
А



Б

№	Название исследования	Результат
1	DRB1	*07, *11

В



Г

№	Название исследования	Результат
1	DQA1	*0201, *0501
2	DQB1	*02, *0301

Рис. 3. Результаты анализа оптических измерений в формате Rt (приборы серии ДТ)

Набор реагентов для типирования генов гистосовместимости человека (HLA) II класса методом амплификации ДНК. Комплект реагентов для типирования гена DRB1

А – анализ оптических измерений (канал Fam)

Б – бланк выдачи результатов

Набор реагентов для типирования генов гистосовместимости человека (HLA) II класса методом амплификации ДНК. Комплекты реагентов для типирования гена DQB1 и гена DQA1

В – анализ оптических измерений (канал Fam)

Г – бланк выдачи результатов

Компания «ДНК-Технология» предлагает уникальное программное обеспечение для автоматической интерпретации результатов анализа с несколькими вариантами лабораторного заключения:

- ❖ выдача результатов с комментарием о рисках развития аутоиммунной патологии;
- ❖ выдача результатов с комментарием о совместимости пары;
- ❖ выдача результатов с комментариями как о рисках развития аутоиммунной патологии, так и совместимости пары.

Реализация данного подхода возможна при использовании готового файла (ini-файла) с соответствующими параметрами отчетов (рис. 4).

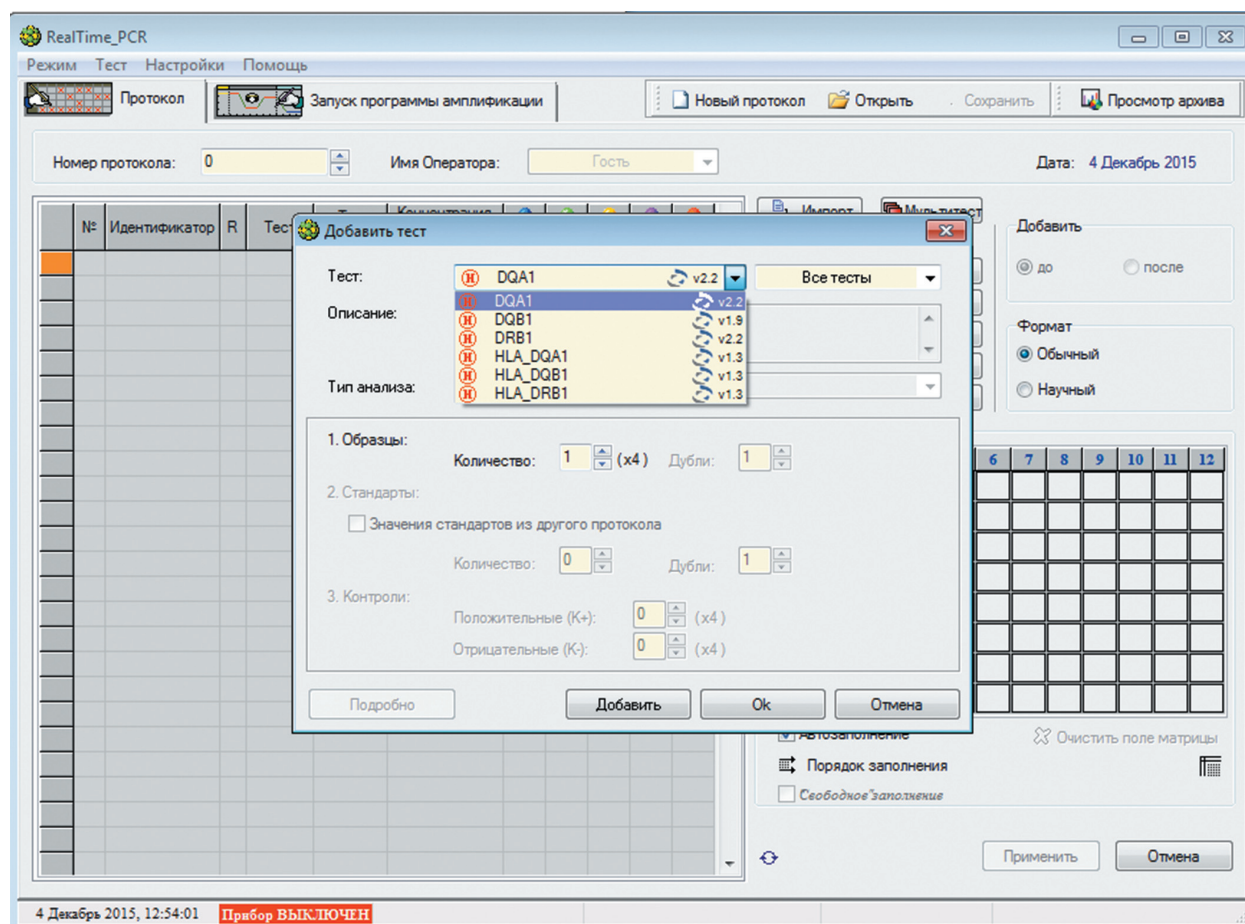


Рис. 4. Выбор теста в программе амплификатора серии ДТ

Независимо от типа выбранных тестов после завершения программы амплификации результаты оптических измерений выдаются в одинаковом виде (рис. 5).

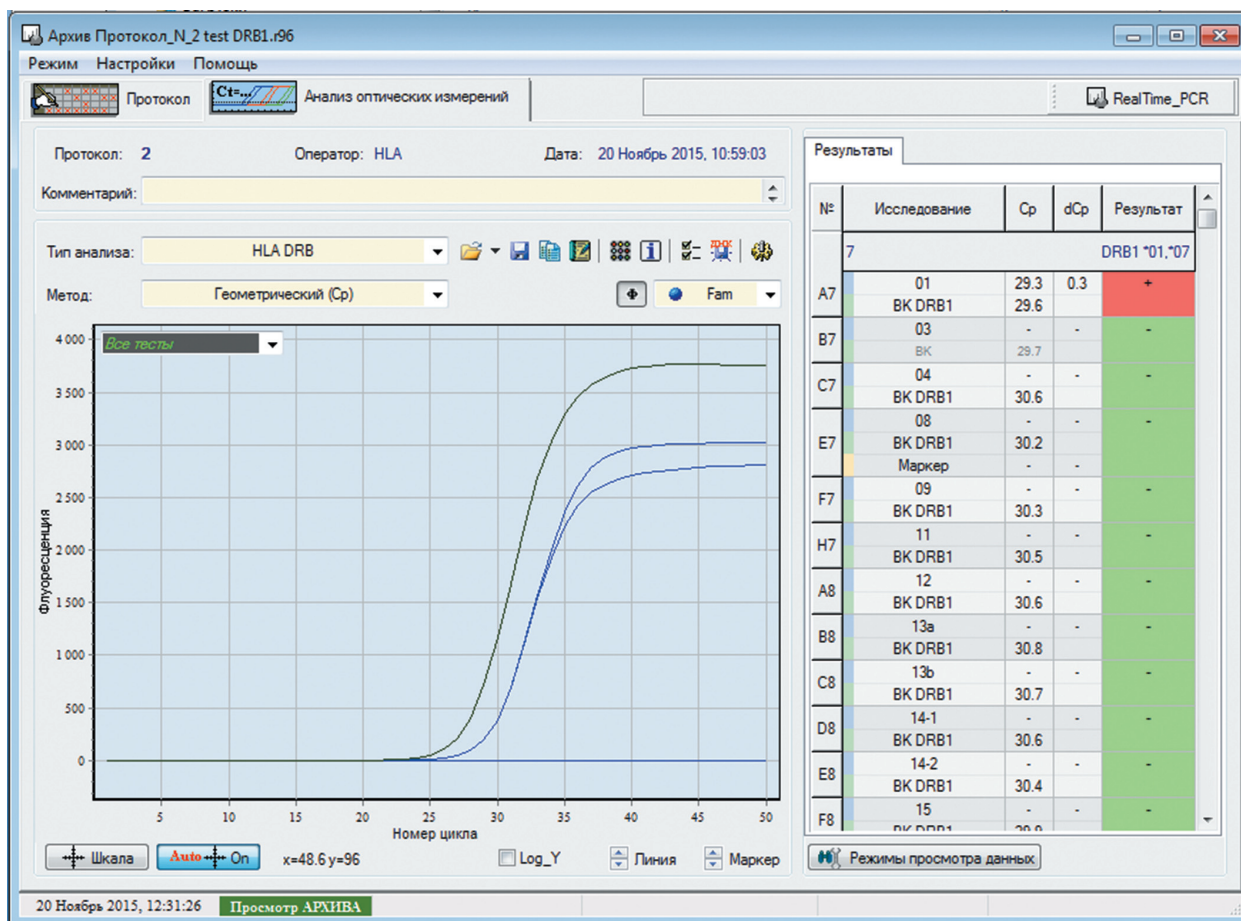


Рис. 5. Анализ оптических измерений (канал Fam) в формате Rf (приборы серии ДТ)

Получение комментария по результатам исследования возможно в окне предварительного просмотра и редактирования результатов. Для формирования бланка необходимо нажать кнопку «Бланк ответа» (рис. 6).

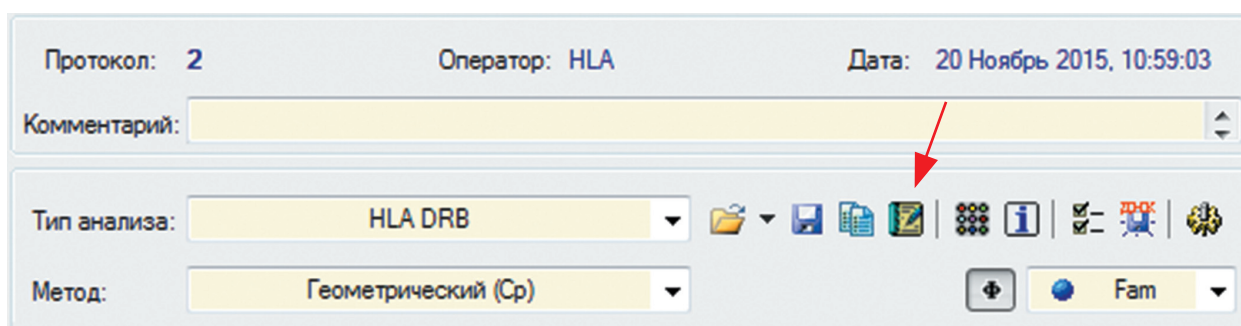


Рис. 6. Выбор настройки для формирования бланка ответа

Предлагаемое решение открывает широкий спектр возможностей для реализации индивидуального подхода к пациенту (паре), поскольку позволяет на этапе предварительного просмотра отчета настроить его параметры (рис. 7).

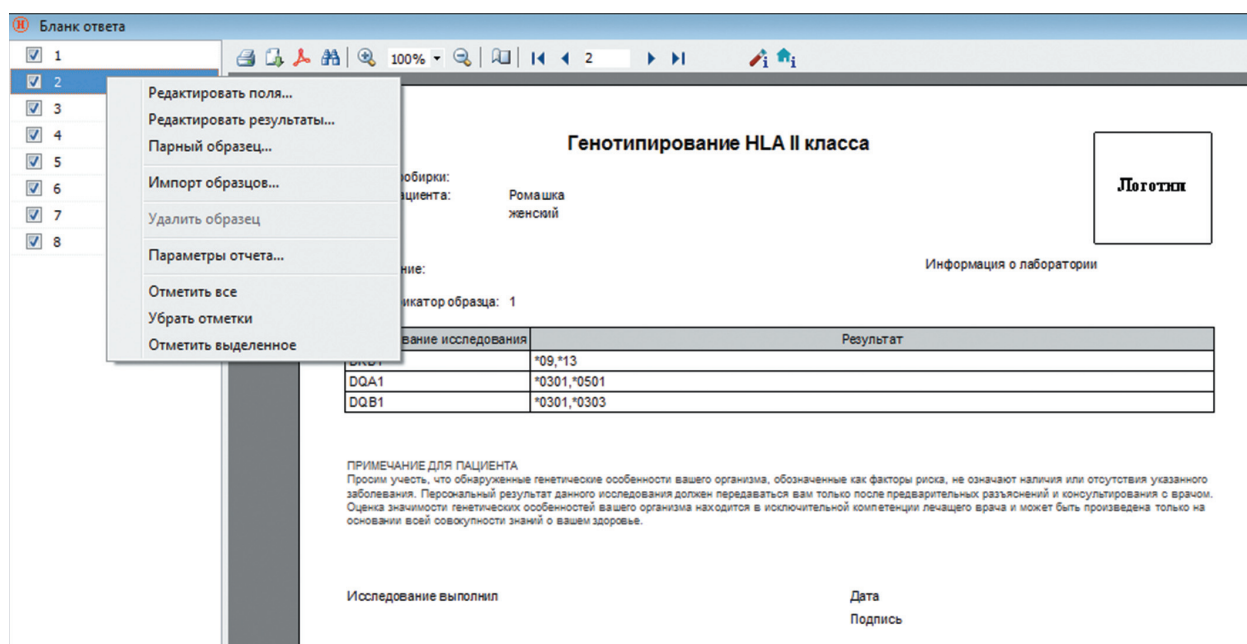
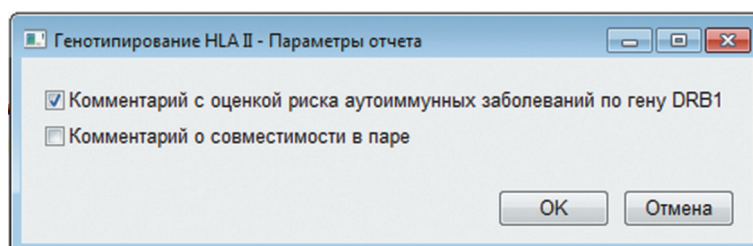
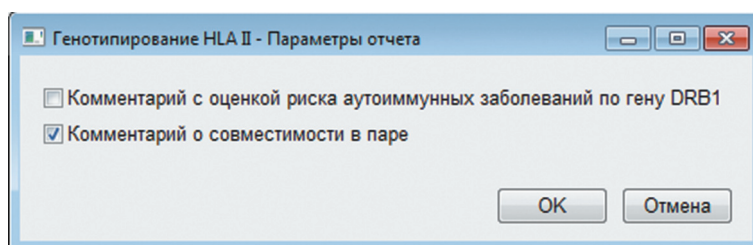


Рис. 7. Настройка параметров отчета

- Для получения комментария о рисках аутоиммунной патологии выбрать **«Комментарий с оценкой риска аутоиммунных заболеваний по гену DRB1»**

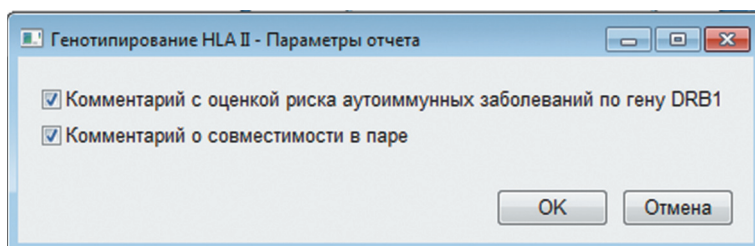


- Для получения комментария о совместимости пары необходимо выбрать **«Комментарий о совместимости пары»**. Данный комментарий выдается только на основании исходно выбранных трех тестов для каждого образца (DRB1, DQA1, DQB1). При введении одного или двух тестов комментарий формироваться не будет из-за недостаточности данных.



- Для получения комментария как о рисках аутоиммунной патологии, так и совместимости пары необходимо **одновременно выбрать** и **«Комментарий с оценкой риска аутоиммунных заболеваний по гену DRB1»**, и **«Комментарий о совместимости пары»**.

Комментарий о совместимости пары выдается только на основании исходно выбранных трех тестов для каждого образца (DRB1, DQA1, DQB1). При введении одного или двух тестов комментарий формироваться не будет из-за недостаточности данных.



- Для получения комментария о совместимости пары как отдельно, так и в комплексном комментарии необходимо указать пол образца и сделать привязку образцов в паре (рис. 8).

Маркировка	ФИО	Пол
5	Ромашка	женск
6	Настурция	женск
7	Гладиолус	мужск
8	Астра	женск
9	Пион	мужск
1	Орхидея	женск
2	Кактус	мужск
3	Физалис	мужск

Рис. 8. Выбор настроек для формирования бланка ответа для заключения о совместимости пары

A

Генотипирование HLA II класса									
Номер пробирки:									
Ф.И.О. пациента:	Астра								
Пол:	женский								
Возраст:									
Врач:									
Примечание:									
Идентификатор образца: 8									
<table><thead><tr><th>Название исследования</th><th>Результат</th></tr></thead><tbody><tr><td>DRB1</td><td>*07, *14</td></tr><tr><td>DQA1</td><td>*0101, *0201</td></tr><tr><td>DQB1</td><td>*02, *0503</td></tr></tbody></table>		Название исследования	Результат	DRB1	*07, *14	DQA1	*0101, *0201	DQB1	*02, *0503
Название исследования	Результат								
DRB1	*07, *14								
DQA1	*0101, *0201								
DQB1	*02, *0503								
ПРИМЕЧАНИЕ ДЛЯ ПАЦИЕНТА Просим учесть, что обнаружены генетические особенности вашего организма, обозначенные как факторы риска, не означают наличия или отсутствия указанного заболевания. Персональный результат данного исследования должен передаваться вам только после предварительных разъяснений и консультирования с врачом. Оценка значимости генетических особенностей вашего организма находится в исключительной компетенции лечащего врача и может быть произведена только на основании всей совокупности знаний о вашем здоровье.									
Исследование выполнил	Дата Подпись								

Генотипирование HLA II класса. Риск аутоиммунных заболеваний

Номер пробирки:

Ф.И.О. пациента: Пион

Пол: мужской

Возраст:

Врач:

Примечание:

Логотип

Идентификатор образца: 9

Название исследования	Результат
DRB1	*04, *07
DQA1	*0201, *0301
DQB1	*0302, *0303
Комментарий ¹	Риск развития аутоиммунных заболеваний не превышает популяционный.

¹Литература:

1. Болдырева М. Н., Барцева О. Б., Курило Л. Ф., Ткаченко Э. Р., Алексеев Л. П., Адамян Л. В. Связь HLA-DRB1-генотипа с репродуктивными неудачами. Проблемы репродукции, 2010, № 6, стр. 59-63.
2. Болдырева М. Н. Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук, г. Москва, 2007, 275 с.

ПРИМЕЧАНИЕ ДЛЯ ПАЦИЕНТА

Просим учесть, что обнаружены генетические особенности вашего организма, обозначенные как факторы риска, не означают наличия или отсутствия указанного заболевания. Персональный результат данного исследования должен передаваться вам только после предварительных разъяснений и консультирования с врачом. Оценка значимости генетических особенностей вашего организма находится в исключительной компетенции лечащего врача и может быть произведена только на основании всей совокупности знаний о вашем здоровье.

Исследование выполнил

Дата

Подпись

Генотипирование HLA II класса. Комплексное исследование

Номер пробирки:

Ф.И.О. пациента: Ромашка

Пол: женский

Возраст:

Врач:

Примечание:

Логотип

Идентификатор образца: 5

Название исследования	Результат
DRB1	*12, *15
DQA1	*0102, *0501
DQB1	*0301, *0602-8
Комментарий ¹	Снижен риск развития аутоиммунных заболеваний: сахарный диабет 1 типа, системная красная волчанка, аутоиммунный гепатит, первичный билиарный цирроз, целиакия, хроническая идиопатическая крапивница

¹Литература:

1. Болдырева М. Н., Барцева О. Б., Курило Л. Ф., Ткаченко Э. Р., Алексеев Л. П., Адамян Л. В. Связь HLA-DRB1-генотипа с репродуктивными неудачами. Проблемы репродукции, 2010, № 6, стр. 59-63.
2. Болдырева М. Н. Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук, г. Москва, 2007, 275 с.

HLA II класс-совместимость пары

HLA-гены	Женщина Ромашка	Мужчина Василек	Количество совпадений в паре
DRB1	*12	*13	1
	*15	*15	
DQA1	*0102	*0102	1
	*0501	*0103	
DQB1	*0301	*0602-8	2
	*0602-8	*0602-8	
Итого совпадений в паре			4

КОММЕНТАРИЙ: количество совпадений в паре (4) недостаточно для того, чтобы быть основной причиной репродуктивных нарушений.

ПРИМЕЧАНИЕ ДЛЯ ПАЦИЕНТА

Просим учесть, что обнаружены генетические особенности вашего организма, обозначенные как факторы риска, не означают наличия или отсутствия указанного заболевания. Персональный результат данного исследования должен передаваться вам только после предварительных разъяснений и консультирования с врачом. Оценка значимости генетических особенностей вашего организма находится в исключительной компетенции лечащего врача и может быть произведена только на основании всей совокупности знаний о вашем здоровье.

Исследование выполнил

Дата

Подпись

Рис. 9. Варианты результатов исследования и вид соответствующих бланков

А. Генотипирование генов HLA II класса (без заключения)

Б. Генотипирование генов HLA II класса. Риск аутоиммунных заболеваний (с заключением)

В. Генотипирование генов DRB1, DQA1 и DQB1 при комплексном обследовании пары с автоматическим заключением для партнерши

ВНИМАНИЕ!

Пользователям, впервые приобретающим комплекты реагентов для генотипирования HLA II класса методом ПЦР, рекомендовано предварительное обучение работе с реагентами. По вопросам обучения обращаться в офис компании «ДНК-Технология».



Контакты офиса:

ООО «ДНК-Технология» Адрес: Москва, Варшавское шоссе, д. 125 Ж, корп. 6
Тел./факс: (495) 980-45-55 www.dna-technology.ru, mail@dna-technology.ru

Телефон горячей линии:

8 800 200-75-15 (звонок по России бесплатный)