HLA-типирование и анализ предсуществующих анти- HLA антител

58

Методы тканевого типирования

HLA-диагностика или тканевое типирование применяется сегодня для решения вопросов трансплантации костного мозга (ТКМ) и органов, для диагностики наследственных заболеваний, ассоциированных с генами главного комплекса гистосовместимости (болезни Бехтерева, сахарного диабета, цилиакии, рассеянного склероза и др.), а также в диагностике некоторых форм бесплодия, связанных с особенностями HLA супругов. У человека гены главного комплекса гистосовместимости локализованы на 6-й хромосоме и кодируют так называемые лейкоцитарные антигены – HLA, human leucocyte antigens – историческое название, обусловленное способом их идентификации. Различают два основных класса HLA: I –экспрессируется преимущественно на Т-лимфоцитах, II – преимущественно на В лимфоцитах. Для клинических задач подбора доноров при пересадке органов и ТКМ, проводят типирование локусов A, B и C HLA I класса и локусов DR, DQ и редко DP HLA II класса.

ЗАО «БиоХимМак» предлагает оборудование и наборы для HLA-типирования фирмы Invitrogen (Dynal) с использованием: классического серологического метода, основанного на комплемент зависимом лимфоцитотоксическом тесте и молекулярного метода ПЦР.

Молекулярный метод HLA-типирования использует в настоящее время три основные технологии идентификации ДНК: (1) **SSP; (2) SSO; (3) Секвенирование**

SSP-HLA-типирование

Называется так потому, что искомые HLA участки ДНК «улавливаются» специфическими праймерами (**SSP** – Sequence Specific Primers) в процессе амплификации. На первом этапе необходимо выделить ДНК из исследуемого образца крови, костного мозга или ткани (от 15 мин. до 2 ч, в зависимости от метода). Затем следует этап ДНК амплификации в термоциклере. Для SSP HLA-типирования ДНК раскапывается в лунки ПЦР планшета, каждая из которых содержит праймеры определенной специфичности. Количество лунок (ПЦР реакций), таким образом, определяется количеством типируемых локусов и количеством аллельный вариантов в каждом локусе. Так, например, для низкоразрешающего (скринингового) типирования локуса DR обычно определяют около 24 специфичностей (24 лунки ПЦР планшета). После амплификации (45 мин.-1,5 ч) ампликоны переносятся в лунки агарозного геля, где проводится электрофорез (20-30 мин.). В тех лунках, где специфичности праймеров совпали со специфическими участками ДНК мы видим полосу продукта в геле. По таблице интерпретации или при помощи программы, определяем какой HLA-аллели она соответствует.

Основным достоинством SSP технологии нужно признать то, что можно осуществлять типирование как на низком так и на экстра высоком разрешении, определяя точечный аллельный полиморфизм (практически сравнимый с секвенированием). Оборудование для электрофореза сравнительно дешево и широко доступно. Основным недостатком SSP HLA-типирования является его низкая производительность. В 96-луночный термоциклер при низкоразрешающем типировании можно поместить только один образец (DR-локус – 24 пробирки, A локус – 24 пробирки, B локус – 48 пробирок). Время, затраченное таким образом на типирование одного образца, например, по A, B, DR от выделения ДНК до интерпретации результатов составит примерно 3 часа. За день, при хорошей организации, можно протипировать 2-3 человека.

SSP-HLA-технологию можно рекомендовать лабораториям использующим как низко- так и высокоразрешающее типирование: трансплантологическим отделениям, клиникам ТКМ, для типирований, связанных с выявлением генетических заболеваний, при средней нагрузке на лабораторию до 5-7 человек в неделю.

SSO-HLA-типирование

Название так же обусловлено принципом выявления HLA-специфичностей. Аналогично SSP технологии для SSO (Sequence Specific Oligonucleotides) тоже необходима стадия выделения геномной ДНК, которая затем должна амплифицироваться. Однако амплификация образца происходит в одной ПЦР пробирке, т.е. никаких «специфических» HLA ампликонов мы пока не получаем, а получаем только общую геномную ДНК образца. Искомые специфичности улавливаются на следующем этапе – блот-гибридизации, который, условно говоря, заменяет электрофорез в SSP технологии. Блот-гибридизация представляет собой процесс связывания (коньюгацию) теперь уже специфических участков ДНК с олигонуклеотидными зондами, пришитыми на специальные нейлоновые полоски – стрипы. Несвязавшиеся участки ДНК отмываются, а конъюгированные фрагменты, соответствующие искомым HLA аллелям окрашиваются пероксидазой. Весь процесс блот-гибридизации, окраски и интерпретации результатов полностью автоматизирован (2 часа) с помощью специального оборудования: процессора **BeeBlot 48** и сканера **AutoCam**.

Одним из несомненных достоинств SSO технологии является возможность ее автоматизации и большая пропускная способность. На этапе амплификации в термоциклер можно установить сразу от одной до 96 проб. Амплифицированная ДНК каждого образца переносится в лунки блот-гибридизатора, куда предварительно раскладываются стрипы (1 стрип – 1 локус). Соответственно для низкоразрешающего HLA-типирования одного образца, например, по A, B, DR нужно 3 стрипа. Блот-гибридизатор BeeBlot 48 расчитан на одновременную загрузку от 2 до 48 стрипов. SSO технология не позволяет проводить HLA-типирование на высоком разрешении. Максимальное разрешение от низкого к среднему. Поэтому для типирования на высоком разрешении нужно иметь в арсенале лаборатории систему для электрофореза. SSO-HLA-типирование незаменимо при создании крио-хранилищ пуповинной крови, регистров доноров костного мозга, крупных трансплантологических и онкологических центров.

HLA-типирование (секвенирование)

Секвенирование – метод позволяющий установить первичную последовательность искомой ДНК. Для осуществления методики HLA-типирования лаборатория должна располагать дополнительно секвенатором, например Becmann Coulter, Aplera. Реагенты и программное обеспечение Dynal.

Для SSP, SSO, серологического HLA-типирования и секвенирования ЗАО «БиоХимМак» предлагает оборудование и реагенты фирмы «Дайнал» (Dynal), которая является мировым лидером в разработке технологий HLA-типирования. Исходя из задач лаборатории, мы подберем комплект оборудования и расходных материалов, необходимых для проведения анализа. Информацию по комплектации всех видов лабораторий и реагентам вы можете получить на нашем сайте или по телефонам компании.

Диагностика предсуществующих HLA антител

Антитела к HLA, экспрессированным на поверхности ядросодержащих клеток, могут вырабатываться в ответ на ряд разных антигенных стимулов. Чаще всего стимулом аллоиммунизации служит беременность, реже – гемотрансфузия или трансплантация. Поскольку в каждом из указанных случаев доза антигена и способ иммунизации различны, вырабатывающиеся антитела, как правило, отличаются по титру, биохимической аффинности к соответствующему антигену, в ряде случаев – по изотипу, а также по специфичности и продолжительности персистенции в организме. Кроме того, у некоторых больных, ожидающих пересадки, могут присутствовать разнообразные аутоантитела как следствие их основного заболевания. Выявляемые антитела обычно описываются термином «предсуществующие антитела» с тем, чтобы подчеркнуть, что эти антитела присутствуют у больного еще до пересадки. В том случае, если у реципиента есть предсуществующие антитела, способные специфически связываться с антигенами донора, после восстановления кровотока в трансплантате очень быстро, в течение минут или нескольких часов развивается сверхострое отторжение, неизбежно ведущее к утрате пересаженного органа.

Обнаруживающиеся в сыворотке крови пациентов HLA антитела обычно являются IgG. IgM встречаются весьма редко. В большинстве случаев предсуществующие HLA антитела способны активировать комплемент. Они могут быть направлены против HLA класса I (HLA-A, -B, C) или класса II (HLA-DR, -DQ). HLA I присутствуют на всех ядросодержащих клетках. При трансплантации основной мишенью для предсуществующих анти-HLA I антител служат клетки сосудистого эндотелия трансплантата. Экспрессия HLA II ограничена несколькими типами клеток, а именно, B-лимфоцитами, дендритными клетками, моноцитами, а также активированными T-лимфоцитами (Пособие для врачей, В.Ю. Абрамов, Москва 2006).

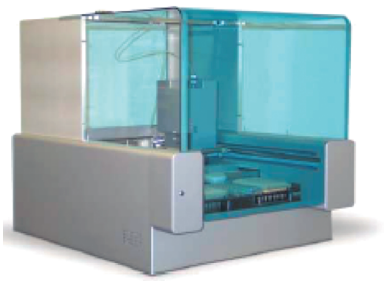
Данные об уровне предсуществующих антител позволяют весьма точно предсказать вероятность регистрации положительной или отрицательной прямой перекрестной пробы с донором аллотрансплантата в случайной выборке трупных доноров в данной популяции. Например, если сыворотка пациента реагирует более чем с 90% образцов клеток-мишеней, этот пациент будет ожидать совместимой трупной почки существенно дольше, нежели больной, чья сыворотка реагирует с 5 или 10% образцов. Таким образом, появляется возможность приблизительно оценить время ожидания трансплантации тем или иным потенциальным реципиентом.

Отличный от нуля уровень предсуществующих антител, как правило, не является стабильной величиной во времени. У части пациентов он может постепенно снижаться вплоть до 0%, у других – демонстрировать волнообразное колебание с амплитудой в несколько месяцев. Поэтому необходимо периодически обновлять образцы сыворотки крови потенциальных реципиентов и при выполнении прямой перекрестной пробы с донором, и при определении предсуществующих антител пользоваться свежей сывороткой.

Традиционным методом определения предсуществующих HLA-антител является микролимфоцитотоксический тест, вернее, зеркальное его отражение: в лунках планшета Терасаки находятся типированные донорские лимфоциты куда затем вносятся исследуемые сыворотки реципиента. Показатель уровня предсуществующих антител выражается в процентах. Компания Dynal (США) выпускает готовые клеточные панели для определения HLA-антител, в комплекте с комплементом.

Определенные сложности в использовании этого метода заключаются в коротком сроке хранения таких панелей (2-3 мес.) и условиях транспортировки. Реагенты требуют хранения при -50°С и транспортировки при -20°С. Поэтому транспортировка осуществляется только в термоконтейнерах с сухим льдом.

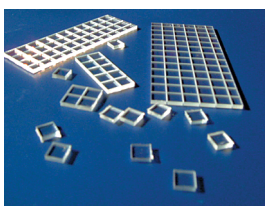
ЗАО «БиоХимМак» рад представить Вам новинку – автоматический анализатор для определения HLA-антител DynaChip компании Dynal (Англия). DynaChip технология объединяет простоту ИФА с преимуществами микрочипов. HLA фиксируются на поверхности микрочипа благодаря специальному химическому составу мембраны.

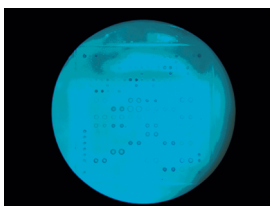


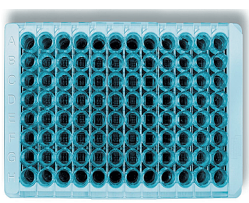
Автоматический анализатор DynaChip Instrument

Индивидуальные микрочипы затем помещают в ячейки стрипов. Стрипы в специальном штативе-рамке (максимум 12 стрипов или 96-лунок) устанавливаются в анализатор. Для анализа HLA-антител одного пациента используется одна лунка стрипа, которая содержит микрочип с полным набором HLA (90 антигенов I класса и 37 антигенов II класса). Управление анализатором осуществляется с внешнего компьютера. Программа интерпретации обрабатывает результаты теста и позволяет архивировать отчет по каждому пациенту.

Методика DynaChip имеет несомненные достоинства во всех отношениях. Практически отсутствует этап пробоподготовки образцов. Полученная от реципиентов сыворотка раскапывается в лунки стрипов и запускается программа анализатора. Отсутствие необходимости использования клеточного материала позволило создать реагенты с длительным сроком хранения и при температуре 2-8°С. Формат микрочипа позволяет исследовать одновременно весь спектр HLA-антител I и II класса. Компьютерная обработка результатов исследования позволяет получить быстрый и точный отчет о типировании и создавать архивы данных пациентов.







ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

Кат.№	Описание
888100	Автоматический анализатор DynaChip Instrument
88896	Набор реагентов для определения предсуществующих HLA-антител
	DynaChip™ HLA Antibody Analysis, 96 тестов