

Приложение № 1  
к письму № А17/21 от «4» марта 2021 г.

«УТВЕРЖДАЮ»

Временные методические рекомендации по проведению HLA-типирования доноров костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток

Москва, 2021

Организация-разработчик:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Под редакцией академика РАН В.Г. Савченко

Методические рекомендации освещают вопросы проведения HLA-типирования доноров костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток.

Издание предназначено для врачей-трансфузиологов, врачей-гематологов, врачей-иммунологов-аллергологов, врачей-онкологов, врачей клинической лабораторной диагностики, работников лабораторий тканевого типирования, работников операторов подсистемы ведения специализированного регистра донорства костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток крови (КМ и ГСК), специалистов, занимающихся вопросами информирования, мотивации, привлечения доноров для тканевого типирования и внесения информации в базу данных доноров КМ и ГСК.

## Содержание

1. Введение.
2. Термины и определения.
3. Основные принципы донорства КМ и ГСК.
4. Подходы к формированию единой системы сбора, накопления информации о потенциальных донорах костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток
  - 4.1. Рекомендации по деятельности рекрутинговых организаций (обязательные условия включения донора в регистр, порядок формирования индивидуальной записи о потенциальном доноре в регистре, порядок направления образцов крови потенциального донора в случае первичного типирования с целью внесения информации в регистр, порядок информационного взаимодействия с донором после внесения информации о нем в регистр)
  - 4.2. Условия вступления потенциального донора КМ и ГСК в регистр.
  - 4.3. Права донора КМ и ГСК.
  - 4.4. Порядок информационного взаимодействия рекрутинговой организации с донором КМ и ГСК после внесения информации в регистр.
  - 4.5. Унифицированные подходы к организации деятельности лабораторий HLA-типирования в случае типирования потенциальных доноров КМ и ГСК и пациентов.

Formatted: Highlight

Commented [OM1]: Часть раздела не имеет отношения к названию методического пособия по HLA-типированию. Согласно поручению, должна быть методичка №2, в которой и логично рассмотреть данные абзацы

5. Особенности HLA-типирования (в лаборатории трансплантационного центра) с целью подбора оптимального донора при выполнении трансплантации аллогенного костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток:
  - 5.1. При выполнении трансплантации от родственного донора HLA-идентичного сиблинга.
  - 5.2. При выполнении трансплантации от родственного донора при трансплантации гаплоидентичного костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток.
  - 5.3. При выполнении трансплантации от неродственного донора.
  - 5.4. При выполнении трансплантации гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови.
6. Заключение.

## 1. Введение.

В соответствии с Порядком оказания медицинской помощи при заболеваниях (состояниях), для лечения которых применяется трансплантация (пересадка) костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток<sup>1</sup>, значительно расширен перечень медицинских показаний для ее проведения. В частности, кроме злокачественных и других новообразований лимфоидной и кроветворной тканей, обозначены и злокачественные новообразования других органов и систем (мягких тканей, костей, суставных хрящей и др.), а также иные системные заболевания (демиелинизирующие болезни центральной нервной системы, болезни кожи и подкожной клетчатки, системные поражения соединительной ткани).

Однако наблюдается разрозненность отдельных структурных элементов (трансплантационных центров, организаций рекрутинга доноров, лабораторий HLA-типирования и др.).

Ключевыми критериями качества и эффективности оказания медицинской помощи при заболеваниях (состояниях), для лечения которых применяется трансплантация (пересадка) костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток, являются ее доступность (в том числе информационная), преемственность, своевременность и точное соблюдение технологий HLA-типирования.

Для выполнения трансплантации аллогенного костного мозга или гемопоэтических стволовых клеток необходимо выполнение подбора или родственного (полностью совместимого, частично совместимого и гаплоидентичного), так и неродственного донора.

Одним из главных условий успешного проведения трансплантации является выбор оптимального донора: родственного или неродственного. Подбор осуществляется жпо HLA-комплексу - наследуемая генетическая система, одной из главных функций которой является распознавание и отторжение чужеродных тканей и органов. Именно этим

Formatted: Highlight

Commented [OM2]: Текст не связан между двумя другими абзацами.

Formatted: Highlight

Commented [OM3]: HLA – типирования не на столько значимо, сколько алгоритм поиска и подбора донора. В сравнении с другими указаниями опустили в частности.

Formatted: Highlight

Formatted: Highlight

<sup>1</sup> Порядок 875н

определяются возможность выполнения трансплантации, выбор варианта ее проведения, а также особенности течения посттрансплантационного периода.

В соответствии с Федеральным законом «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации»<sup>2</sup> в целях обеспечения доступа граждан к услугам в сфере здравоохранения в электронной форме, а также взаимодействия информационных систем в сфере здравоохранения уполномоченным федеральным органом исполнительной власти создается, развивается и эксплуатируется единая государственная информационная система в сфере здравоохранения, подсистемой которого является ведение специализированных регистров пациентов по отдельным нозологиям и категориям граждан.

Однако, в настоящее время подсистемы регистра пациентов, нуждающихся в трансплантации костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток, а также потенциальных доноров на территории Российской Федерации отсутствуют. В связи с чем, наиболее актуальной представляется разработка методических подходов к созданию единой системы оказания помощи пациентам при заболеваниях (состояниях), для лечения которых применяется трансплантация (пересадка) костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток. Ключевыми элементами данной системы являются:

- единая система сбора, накопления информации о потенциальных донорах костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток;

- унифицированные правила деятельности лабораторий HLA-типирования.

## 2. Термины и определения.

2.1. HLA-типирование/тканевое типирование: определение генов или антигенов наследуемой генетической системы, расположенной на 6 хромосоме одной из функций которой, является распознавание и отторжение чужеродных тканей и органов.

2.2. HLA типирование с **низким** (low) разрешением - результат типирования, полученный методами ДНК-типирования на уровне первого поля согласно номенклатуре ВОЗ. Рис.1

2.3. HLA типирование с **высоким** (high) разрешением - идентификация аллелей, кодирующих одинаковую аминокислотную последовательность внутри антигенсвязывающего сайта. Высокое разрешение идентифицирует аллели на уровне первого и второго поля (четыре цифры) – например, *A\*01:01*, согласно номенклатуре ВОЗ, и разрешает все неоднозначности внутри 2 и 3го экзона для *HLA* класса I и 2го экзона для *HLA* класса II, приводящие к изменению аминокислотной последовательности, а также исключает все нулевые аллели (*N*), независимо от места локации полиморфизма. Рис.1

2.4. *HLA* типирование с **аллельным** (allelic) разрешением - результат типирования на уровне отдельного аллеля, как уникальной нуклеотидной последовательности, при определении всех цифр в имени данного аллеля согласно номенклатуре ВОЗ. Например, *A\*01:01:01:01* или *A\*01:01:33*. Рис.1

Рисунок 1. Уровни разрешения при HLA типировании и обозначения, соответствующие уровню разрешения.

<sup>2</sup> 323-ФЗ

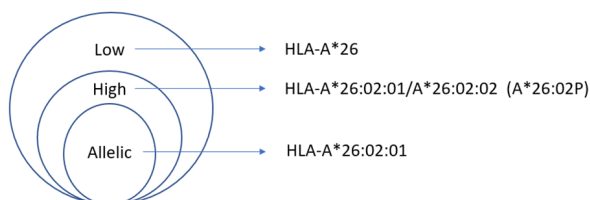
Formatted: Highlight

Formatted: Highlight

Formatted: Highlight

Commented [OM4]: Как это относится к названию методички?

Formatted: Highlight



2.5. **G** группы *HLA* аллелей - группы аллелей, имеющих одинаковую нуклеотидную последовательность экзонов, кодирующих пептидсвязывающие домены (экзон 2 и 3 для аллелей *HLA* класса I и только экзон 2 для аллелей *HLA* класса II). *G* группа *HLA*-аллелей обозначается заглавной буквой 'G', за которой следует 3 поля аллеля с самым низким номером в группе. Например, *A\*01:03:01G* включает аллели *01:03:01:01/01:03:01:02/01:03:02/01:287N/01:315*, в том числе нулевой – *A\*01:287N*

2.6. *HLA* - гаплотип - совокупность генов *HLA*, лежащих на одной хромосоме. *HLA* - генотип - совокупность генов *HLA*, лежащих на обеих хромосомах.

2.7. Локус - местоположение определённого гена на хромосоме.

2.8. Аллели – варианты одного и того же гена, которые различаются по нуклеотидной последовательности.

2.9. Полиморфизм генов – гены, представленные в популяции несколькими вариантами (аллелями).

2.10. Экзон – участок гена, несущий генетическую информацию, копия которого составляет зрелую РНК, кодирующую синтез определенного продукта.

2.11. Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) – клетки, способные к делению и дифференцировке в различные клеточные линии гемопоэтической и иммунной системы. Источником ГСК могут быть костный мозг, периферическая кровь, пуповинная кровь.

2.12. Трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) – трансплантация с использованием костного мозга или гемопоэтических стволовых клеток, полученных от другого человека (родственного или неродственного донора).

2.13. Потенциальный донор аллогенных гемопоэтических стволовых клеток – лицо, добровольно прошедшее *HLA* - типирование, а также дополнительное обследование и подтвердившее возможность, в случае необходимости, рассмотреть сдачу забор ГСК для пациента, нуждающегося в трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток.

2.14. Донор гемопоэтических стволовых клеток (костного мозга или гемопоэтических стволовых клеток из периферической крови) – лицо, которому была выполнена процедура изъятия костного мозга или забора гемопоэтических стволовых клеток периферической крови с целью проведения трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток пациенту.

2.15. Сиблинг - родной брат или сестра (дети одних родителей).

Commented [OM5]: Не понятно, что оно включает

Formatted: Highlight

Formatted: Highlight

Formatted: Highlight

2.16. HLA-идентичный родственный донор – донор, наследующий общие с пациентом HLA-гаплотипы от одних и тех же родителей.

**Commented [OM6]:** Как быть с родителями, которые совместимы с детьми, к кому они относятся

2.17. Частично-совместимый родственный донор – донор, отличающийся от пациента не менее чем по одному *HLA-гену*.

2.18. Гаплоидентичный родственный донор – донор, наследующий один общий с пациентом HLA-гаплотип, при условии совместимости на 50 - 90% по 10 и более генам *HLA*.

2.19. Полностью совместимый неродственный донор – полностью совпадающий с пациентом по 10 из 10 и более генам *HLA*.

2.19. Частично-совместимый неродственный донор – донор, совместимый с пациентом на 70-90% по 10 и более генам *HLA*.

2.20 Амплификация- увеличение числа копий ДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

2.21 Кросс-контаминация – перекрестное загрязнение продуктами ПЦР.

2.22 Пуповинная кровь – кровь, заготовленная после родов из плаценты и пуповинной вены и содержащая ГСК.

### 3. Основные принципы донорства КМ и ГСК;

3.1 безопасность донорства КМ и ГСК, как для донора, так и для пациента, то есть сохранение здоровья донора при выполнении им донорской функции, а также безопасность заготовленных КМ и ГСК для самого пациента;

**Commented [OM7]:** Считаю нельзя в одном абзаце говорить и про доноров и про пациентов. Для пациентов это принцип трансплантации, а не донорства.

3.2 добровольность сдачи КМ и ГСК; в случае необходимости проведения донации от родственного донора моложе 18 лет для проведения трансплантации для родного брата или сестры, информированное добровольное согласие подписывает один из родителей или иной законный представитель донора КМ и ГСК;

**Commented [OM8]:** Может я не правильно читаю, но я понимаю так, что только доноры моложе 18 лет подписывают информированное добровольное согласие, а остальные нет.

3.3 обеспечение социальной поддержки и соблюдение прав доноров; поощрение и поддержка безвозмездного донорства КМ и ГСК;

**Commented [OM9]:** Поощрение и безвозмездность мне кажутся взаимоисключающими вещами.

3.4 соблюдение анонимности неродственного донорства КМ и ГСК.

**Commented [OM10]:** Что под этим подразумевается?

### 4. Подходы к формированию единой системы сбора, накопления информации о потенциальных неродственных донорах КМ и ГСК.

**Commented [OM11]:** Весь раздел не относится к теме методички

**Commented [OM12]:** Раздел до 4.5 не относится к теме методички

4.1 Рекомендации по внесению необходимых данных в регистр рекрутинговыми организациями.

4.1.1 Рекрутинговые организации - объединенные в единую систему организации, созданные на базе медицинских, образовательных, научных, некоммерческих и других организаций, в целях проведения мероприятий по информированию, мотивированию и рекрутингу доноров КМ и ГСК, внесению информации, в том числе персональных данных

**Commented [OM13]:** В терминологии не раскрыто понятие Рекрутинговые организации.

**Commented [OM14]:** Что это такое

(пол, дата рождения, адрес, паспортные данные, СНИЛС, контактная информация, информация о доверенном лице (лице, которому можно звонить в случае невозможности контакта с потенциальным донором), группа крови по системе АВ0, резус-принадлежность, наличие или отсутствие антител IgG к цитомегаловирусу) в единую поисковую базу (регистр) для последующего HLA-типирования.

4.1.2. Рекрутинговая организация при внесении данных о потенциальном доноре в регистр КМ и ГСК выполняет следующие функции:

4.1.3 предоставление донору информации об основных принципах донорства КМ и ГСК в Российской Федерации;

4.1.4 предоставление донору информации о способах донации КМ и ГСК, возможных осложнениях донорства, анкеты донора и информированного добровольного согласия (см. приложение 1 и 2);

4.1.5 определение идентификационного номера потенциального донора в регистре;

4.1.6 направление образцов периферической крови / соскоба буккального эпителия в лабораторию для выполнения HLA-типирования потенциального донора;

4.1.7 направление образцов периферической крови донора для необходимого обследования определения группы крови по системе АВ0; резус- принадлежности, наличия/отсутствия антител G к цитомегаловирусу;

4.1.8 внесение данных о доноре (идентификационный номер, результаты HLA-типирования, пол, год рождения, группа крови по системе АВ0; резус фактор наличие/отсутствие антител G к цитомегаловирусу) в единую поисковую базу;

4.1.9 предоставление донору информации о внесении его данных, в том числе данных о проведенном HLA-типировании (фактическом выполнении исследования, без предоставления информации о результатах) в регистр и осуществление «обратной» связи с донором КМ и ГСК;

4.1.10 получение запроса трансплантационных центров и согласия потенциального донора на дополнительное обследование, в том числе повторное HLA-типирование и последующую процедуру КМ и ГСК;

4.1.11 удаление данных о доноре при отзыве информированного добровольного согласия, выявлении медицинских противопоказаний, отказе от донации КМ и ГСК.

4.2. Условия вступления потенциального донора КМ и ГСК в регистр:

Потенциальным донором КМ и ГСК может стать дееспособное лицо в возрасте от 18 до 40 лет, являющееся гражданином Российской Федерации и имеющий вид на жительство в соответствии с законодательством Российской Федерации, изъявившее добровольное

**Commented [OM15]:** ФИО не указаны, а паспорт и снимок указаны.  
Контактные данные нельзя указывать в поисковой базе. Что такое поиск в их понимании? Искать можно по всем параметрам, которые подаются в систему по их требованию? Можно по паспорту?

**Commented [OM16]:** Единая поисковая система – это BMDS? Опять нет определения в терминологии выше

**Commented [OM17]:** Противоречит пункту 4.1.8

**Commented [OM18]:** Каким образом определяется идентификационный номер?

**Commented [OM19]:** Иными словами, легкого вступления через почту, как делает весь мир не применить, т.к. всегда нужно брать пробы на группу крови и антитела. При этом технология NGS позволяет определить и то, и другое

**Commented [OM20]:** Противоречит пункту 4.1.1

**Commented [OM21]:** Противоречит медицинским исследованиям. Если человеку выполнили исследование, то ему обязаны предоставить данные. 323 закон статья 22.

**Commented [OM22]:** Кто является оператором данных, если регистр, то почему он эту функцию не выполнит сам?

**Commented [OM23]:** А кто занимается организацией забора образца и его отправкой, обследованием перед донацией?

**Commented [OM24]:** Регистр или единую поисковую систему

**Commented [OM25]:** Если государство выделяет средства, то оно может ограничить возраст, а если нет, то человек/донорский центр сам должен иметь возможность регулировать границу возраста.

**Commented [OM26]:** Тоже странное ограничение, человек имеющий вид на жительство тоже должен иметь возможность вступить в регистр

**Formatted:** Highlight

желание, пройти медицинское обследование и рассмотреть забор ГСК для пациента, нуждающегося в трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток.

4.2.1 предоставление паспорта или иного удостоверяющего личность документа;

**Commented [OM27]:** Предоставление паспорта не равно предоставлению паспортных данных

4.2.2 заполнение анкеты донора, информированного добровольного согласия, согласия на обработку персональных данных;

4.2.3 сдача образца крови/соскоба буккального эпителия для проведения HLA-типирования, определение группы крови по системе АВ0; резус-принадлежности и наличия/отсутствия антител G к цитомегаловирусу);

4.2.4 предоставление информации о ранее перенесенных инфекционных заболеваниях, хронических и наследственных заболеваниях, наличии доброкачественных и злокачественных новообразований, об употреблении наркотических средств, психотропных веществ, терапии иммуносупрессивными препаратами, других нарушениях здоровья.

4.3 Права донора КМ и ГСК.

4.3.1 защита государством прав и охрана здоровья донора КМ и ГСК;

**Commented [OM28]:** А у нас есть отдельное понятие или все таки имеется ввиду тоже что и для всех 323 ФЗ?

4.3.2 возможность ознакомления с результатами медицинского обследования (за исключением результатов проведенного HLA-типирования);

**Commented [OM29]:** Нарушение 323 ФЗ

4.3.3 полное информирование о возможных последствиях сдачи КМ и ГСК для здоровья;

4.3.4 получение бесплатной медицинской помощи в соответствии с клиническими рекомендациями с учетом стандартов ее оказания в случаях возникновения у него реакций и осложнений, связанных с выполнением донорской функции;

**Commented [OM30]:** Ответственность несет учреждения забирающего клетки. Донор уезжает из региона забора клеток и пользуется стандартным ОМС. В итоге не несет ответственности. Мучается сам с поликлиникой.

4.3.5 возмещение вреда, причиненного жизни или здоровью донора КМ и ГСК в связи с выполнением донорской функции.

**Commented [OM31]:** Кто и каким образом, не понятно

4.4. Порядок информационного взаимодействия рекрутинговой организации с донором КМ и ГСК после внесения информации в регистр.

4.4.1. После получения результатов HLA-типирования и внесения их в единую поисковую базу рекрутинговая организация уведомляет донора, выбранным удобным для него способом, о внесении данных донора в единый регистр;

4.4.2. Рекрутинговая организация связывается с потенциальным донором в случае необходимости проведения подтверждающего HLA-типирования и дополнительного медицинского обследования;



4.4.3. Информирование потенциального донора при выявлении, по результатам проведенного медицинского обследования, инфекционных заболеваний и других нарушений здоровья.

**Commented [OM32]:** Никакого наблюдения после донации, кто несет ответственность и держит анонимную связь донор – реципиент?

4.5. Унифицированные подходы к организации деятельности лабораторий НЛА-типирования в случае типирования потенциальных доноров КМ и ГСК и пациентов.

4.5.1. Требования к помещениям предусматривают разграничение на две зоны: основную рабочую, где выполняют главные лабораторные исследования, и которую условно делят на преамплификационную и постамификационную, а также другие вспомогательные помещения.

Это разделение необходимо, с одной стороны, для исключения кросс-контаминации исследуемых биологических образцов между собой и продуктами полимеразной цепной реакции (ПЦР), а с другой - для обеспечения этапности исследования и поточности образцов биологического материала, формирование алгоритмов действия персонала.

4.5.1.1 Помещения, которые условно относят к преамплификационной зоне, их назначение.

4.5.1.2 Помещение приемки и регистрации биологического материала: приемка биологического материала, поступающего на исследование, его регистрация в лабораторной информационной системе, хранение до начала работ.

4.5.1.3. Помещение выделения нуклеиновых кислот: выделение и очистка нуклеиновых кислот из проб биологического материала, проверка качества полученных образцов ДНК, хранение архивных образцов ДНК.

4.5.1.4. Помещение приготовления реакционных смесей: подготовка реакционных смесей для постановки амплификации, реагентов, необходимых для проведения исследований.

4.5.2.1 Помещения, которые условно относят к постамификационной зоне:

4.5.2.2 Помещение проведения амплификации: выполнение реакции амплификации, при необходимости - приготовление и измерение концентрации библиотек, оценка качества амплификации методом гель-электрофореза, очистка продуктов амплификации и реакции секвенирования, а также (в зависимости от используемого метода) проведение гибридизации образцов с олигонуклеотидными зондами.

4.5.2.3. Помещение учета результатов анализа: проведение секвенирования на автоматических генетических анализаторах нуклеиновых кислот, или других анализаторах, предназначенных для НЛА-типирования.

4.5.3.1 Другие вспомогательные помещения:

комната хранения реагентов;

комната хранения расходных материалов,  
вентиляционная камера,  
серверная/архив,  
**комната водоподготовки**  
ординаторская, комната приема пищи  
кабинет заведующего,  
раздевалка для сотрудников,  
**санитарные помещения**

4.5.4.1. Требования к основным помещениям лаборатории, где выполняется работа с биологическими материалами.

Помещения для выполнения работ на этапах ПЦР-анализа должны быть боксированными (боксы и предбоксы), оборудованы бактерицидными лампами, приточно-вытяжной вентиляцией с различной кратностью воздухообмена, водопроводом, канализацией, все помещения обеспечены искусственным и естественным освещением. Внутренняя отделка рабочих помещений выполняется с использованием материалов, устойчивых к действию дезинфицирующих и моющих средств, все поверхности должны являться легкообрабатываемыми. Помещения «грязной» зоны оснащаются автономной системой вентиляции, при которой вытяжка преобладает над притоком, для обеспечения дополнительного барьера для предотвращения контаминации «чистых» зон лаборатории продуктами амплификации нуклеиновых кислот. Для помещения учета результатов анализа необходимо оснащение кондиционером, обеспечивающим оптимальную рабочую температуру для генетических анализаторов нуклеиновых кислот, обладающих узким диапазоном рабочих температур.

4.5.4.2 Организация передачи биологических образцов.

Для исключения контаминации образца передача образцов происходит в определенном направлении между помещениями преамплификационной зоны через передаточные окна, затем материал попадает в постамплификационную зону, изолированную от других помещений. Исключается возможность передачи материала другим путем и в обратном направлении. Помещение проведения амплификации и помещение учета результатов анализа также оснащены передаточным окном для передачи всех отходов, образующихся в ходе производственного процесса.

4.5.4.3. Требования к оснащению помещений и сотрудникам лаборатории, работающим в разных зонах: в каждой из рабочих зон используют отдельные наборы лабораторного оборудования, посуды, расходных материалов, халатов и перчаток, предназначенные для различных стадий анализа. Оборудование, материалы и уборочный инвентарь в каждом

Commented [OM33]: Не уверена, что везде это есть

помещении имеет соответствующую маркировку. Вход сотрудников, работающих в постамплификационной зоне в помещения предамплификационной зоны запрещен.

4.5.4.4. Наиболее распространенные методы типирования представлены в приложении 3. Рекомендуемый перечень оснащения лаборатории HLA-типирования представлен в приложении 4.

4.5.5. Требования к HLA-типированию донора для внесения информации в регистр потенциальных доноров КМ и ГСК.

4.5.5.1 Вероятность подбора совместимого неродственного донора зависит от количества доноров, информация о результатах HLA-типирования которых внесена в регистр, однако эта зависимость не прямая: регистр доноров КМ и ГСК, включающий в себя 1 млн человек, позволяет эффективно подбирать доноров для 50-70% пациентов, относящихся к той же популяции. Увеличение регистра в десять и более раз существенно не меняет эффективность подбора неродственного донора, вероятность подбора донора для каждого пациента, нуждающегося в алло-ТГСК недостижима.

**Commented [OM34]:** Не относится к теме методички

4.5.5.2 Вероятность подбора совместимого донора зависит от HLA-полиморфности популяции. Оптимальные неродственные доноры - это молодые мужчины той же этнической группы, что и пациент.

**Commented [OM35]:** Начинаем с вероятности, заканчиваем оптимальностью. Какова же вероятность найти в регистре совпадающего молодого мужчину при условии, что 70% потенциальных доноров женщины?

4.5.5.3. Для осуществления подбора оптимального неродственного донора в регистр вносятся результаты HLA-типирования, пол, год рождения, данные лабораторного исследования проб потенциального донора: информация о группе крови по системе АВ0, наличии или отсутствии антител IgG к цитомегаловирусу.

**Commented [OM36]:** Противоречит пункту 4.1.1.

4.5.5.4 В регистр необходимо внести информацию о HLA-генах потенциального донора: *HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1*.

**Commented [OM37]:** Все доноры Кирова не подлежат внесению в регистр, а их более 40 тысяч

4.5.5.5 Допускается внесение дополнительной информации о результатах HLA-типирования потенциального донора *HLA-DPB1* и *HLA-DRB3/4/5* и других. В случае наличия нескольких потенциальных доноров, совместимых с пациентом по 10 из 10 генов, выбор донора осуществляется с учетом результатов HLA-типирования *HLA-DPB1* и *HLA-DRB3/4/5* и других генов.

4.5.5.6 Минимальными требованиями к HLA-типированию потенциального донора для внесения информации о нем в регистр является ДНК-типирование в низком разрешении по 5 HLA-генам: *HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1*.

4.5.5.7 Для осуществления HLA-типирования потенциальных доноров используются следующие методы ДНК-типирования: PCR-SSP, PCR-SSO, PCR-SBT, NGS и другие, информация об основных методах ДНК-типирования представлена в приложении 3.

4.5.5.8 Для подбора совместимого неродственного донора в кратчайший срок, при наличии соответствующей информации, в регистр вносятся данные о результатах расширенного типирования доноров по генам *HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, DRB3/4/5, HLA-DQB1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DPA1* в высоком (аллельном) разрешении.

**Commented [OM38]:** Кто и при каких обстоятельствах это делает?

4.5.5.9 При подборе пары донор-реципиент, в случае, если HLA-типирование потенциального донора выполнено в низком разрешении, проводится повторное HLA-

типирование в высоком разрешении в соответствии с требованиями, указанными в разделе 5 данных временных методических рекомендаций.

### 5. Особенности HLA-типирования (в лаборатории трансплантационного центра) с целью подбора оптимального донора при выполнении трансплантации аллогенного костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток.

5.1. Минимальные требования к проведению HLA-типирования при оценке совместимости перед алло-ТГСК при выполнении трансплантации от родственного HLA-идентичного донора (сиблинга).

5.1.1. При установлении четырех родительских HLA-гаплотипов (при типировании по HLA-A, -B и HLA-DRB1) совместимый донор определяется при совпадении пациента и донора по 6 из 6 HLA-генов HLA-A, -B и HLA-DRB1 в низком разрешении.

5.1.2. При отсутствии возможности установления идентичности по результатам HLA-типирования четырех родительских HLA-гаплотипов проводится HLA-типирование пациента и донора, предусмотренное протоколом трансплантационного центра, но не менее, чем HLA-A, -B и HLA-DRB1 в **высоком** разрешении. При необходимости дополнительно осуществляется HLA-типирование генов: HLA-C, -DQB1, -DPB1 (расширенное типирование).

5.1.3. Для подтверждения идентичности по HLA-гаплотипам перед алло-ТГСК проводится повторное взятие образцов крови и HLA-типирование пациента и донора. В случае, когда определены 4 родительских гаплотипа, исследование проводят по HLA-A, -B, -DRB1 в низком разрешении. В остальных случаях HLA-типирование пациента и донора осуществляют по HLA-A, -B, -DRB1 в высоком разрешении.

5.1.4. Для выполнения трансплантации обязательным условием является совпадение результатов первичного и повторного типирования. При проведении первичного и повторного типирования образцы поступают в лабораторию под уникальными номерами, привязанными к ФИО пациента и донора.

5.1.5. В случае, когда больной и донор-сиблинг отличаются по одному из генов HLA в результате рекомбинации (кроссинговера), проводится HLA-типирование в высоком разрешении по 5 генам. При данной алло-ТГСК больной и донор-сиблинг должны совпадать, как минимум, по 9 из 10 HLA-генов (при учете HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 генов).

5.2. Минимальные требования к проведению HLA-типирования при оценке совместимости перед алло-ТГСК при выполнении трансплантации от родственного гаплогенетического донора.

Внедрение новых методов обработки трансплантата и методов профилактики реакции трансплантат против хозяина (РТПХ) существенно снизили риск развития тяжелых осложнений при выполнении трансплантации от гаплогенетических доноров. Родители, дети, сиблинги и другие родственники, которые наследуют общий с больным HLA-гаплотип, могут являться родственными HLA-гаплогенетическими донорами, что определяет доступность данного вида терапии для большинства (до 95%) пациентов.

5.2.1. Установление идентичности общего HLA-гаплотипа (при возможности). Общий гаплотип должен быть установлен по результатам HLA-типирования четырех родительских HLA-гаплотипов.

Formatted: Highlight

Commented [OM39]: Каким образом может быть реализован данный механизм, если оплата по ОМС происходит под ФИО, данные должны поступить в историю болезни под ФИО, кто ведет учет генотипов в семье и сверку с генерируемым ID донора и пациента

Formatted: Highlight

Formatted: Highlight

5.2.2. При отсутствии данных об идентичности общего HLA-гаплотипа, проводится HLA-типирование в высоком разрешении, минимально *HLA-A*, *-B* и *HLA-DRB1*.

5.2.3. Допускается только одно несовпадение между донором и пациентом по каждому из исследованных *HLA*-генов. Два и более несовпадения по одному *HLA*-гену свидетельствуют, что донор и пациент расходятся по обоим HLA-гаплотипам.

5.2.4. Для подтверждения идентичности по HLA-гаплотипам перед алло-ТГСК проводится повторное взятие образцов крови и HLA-типирование пациента и донора. В случае, когда определены 4 родительских гаплотипа, исследование проводят по *HLA-A*, *-B*, *-DRB1* в низком разрешении. В остальных случаях HLA-типирование пациента и донора осуществляют по *HLA-A*, *-B*, *-DRB1* в высоком разрешении.

5.2.5. Для выполнения трансплантации обязательным условием является совпадение результатов первичного и повторного типирования. При проведении первичного и повторного типирования образцы поступают в лабораторию под уникальными номерами, привязанными к ФИО пациента и донора.

Formatted: Highlight

5.3. Минимальные требования к проведению HLA-типирования при оценке совместимости донора и пациента перед алло-ТГСК от неродственного донора.

Основная сложность в подборе совместимого неродственного донора ГСК определяется экстремальной вариабельностью HLA-системы. В настоящее время в базе данных IPD-IMGT/HLA зарегистрировано более 28 тысяч *HLA*-аллелей. Их число постоянно увеличивается, а в последние несколько лет в связи с внедрением в практику новых молекулярно-генетических методов HLA-типирования этот процесс приобрел лавинообразный характер.

5.3.1. Совместимый неродственный донор определяется по результатам HLA-типирования в случае полного совпадения 10 из 10 исследованных HLA-генов при типировании генов *HLA-A*, *-B*, *-C* и *-DRB1*, *-DQB1* в высоком разрешении.

5.3.2. Для снижения риска тяжелых осложнений после трансплантации в ряде случаев выполняется дополнительное HLA-типирование *DRB3/4/5*, *DPB1* и других, а также HLA-типирование проводится в более высоком (аллельном) уровне разрешения.

Commented [OM40]: В РФ не пользуются этим

5.3.3. Для подтверждения идентичности по HLA-гаплотипам перед алло-ТГСК проводится повторное взятие образцов крови и HLA-типирование пациента и донора не менее чем по *HLA-A*, *-B*, *-C* *-DRB1* *DQB1* в высоком разрешении.

Commented [OM41]: По пяти генам иначе как писать 10 из 10

5.3.4. Для выполнения трансплантации обязательным условием является совпадение результатов первичного и повторного HLA-типирования. Результаты HLA-типирования донора, полученные на этапе внесения данных о нем в регистр учитываются как одно из двух необходимых для выполнения трансплантации HLA-типирований. При проведении первичного и повторного типирования образцы поступают в лабораторию под уникальными номерами, привязанными к ФИО пациента и ID донора.

5.3.5. Частично-совместимый неродственный донор определяется по результатам HLA-типирования в случае совпадения от 7 до 9 из 10 исследованных HLA-генов при типировании генов *HLA-A*, *-B*, *-C* и *-DRB1*, *-DQB1* в высоком разрешении.

5.3.6. Для снижения риска тяжелых осложнений алло-ТГСК от неродственного донора осуществляется дополнительное HLA-типирование по *HLA-DP* и по другим генам.

5.4. Минимальные требования к проведению HLA-типирования при оценке совместимости донора и пациента перед алло-ТГСК пуповинной крови.

Требования к совместимости реципиента и образца пуповинной крови варьируют в рекомендациях международных сообществ.

5.4.1. традиционно образец пуповинной крови является приемлемым для ТГСК при совпадении с реципиентом > 4/6 по генам HLA-A и -B на низком уровне разрешения и гену HLA-DRB1 на высоком уровне разрешения

5.4.2. Типирование на высоком уровне разрешения, а также типирование дополнительных HLA-генов может быть проведено, если это предусмотрено трансплантационным протоколом.

5.4.3. Перед алло-ТГСК больной должен быть повторно типирован из нового образца, а пуповинная кровь из сегмента трубки криомешка или флакона-спутника как минимум по генам HLA-A, -B и HLA-DRB1 на низком уровне разрешения, для подтверждения полученных ранее результатов HLA-типирования.

#### 1. Дополнение

Образцы для HLA-типирования должны поступать в лабораторию без указания ФИО, ID и других персональных данных, под индивидуальным номером, который присваивается в момент взятия биологического образца, и при повторном типировании под иным номером для исключения «человеческого фактора».

Лаборатории, проводящие HLA-типирование для алло-ТГСК, как больных, так и доноров (родственных и неродственных, включая доноров регистров) обязаны участвовать в межлабораторном контроле качества HLA-типирования и успешно его проходить по заявленному уровню HLA-типирования. Пока в Российской Федерации отсутствует собственный межлабораторный контроль качества HLA-типирования, лаборатория, проводящая HLA-типирование для алло-ТГСК, как больных, так и доноров (родственных и неродственных, включая доноров регистров), может заниматься данной деятельностью, если она успешно прошла контроль качества HLA-типирования (не более 1 расхождения), проводимый EFI (European Federation for Immunogenetics).

Перечень лабораторий, передающих данные о типировании доноров КМ и ГСК утверждаются приказом Министерства Здравоохранения Российской Федерации. Для включения в перечень лаборатория представляет информацию об оснащении лаборатории, штатном расписании и результатах межлабораторного контроля качества типирования или внешней оценке качества.

HLA-совместимость — важный, но не единственный фактор, определяющий эффективность алло-ТГСК. **Главный фактор** — статус заболевания, потребовавшего выполнения алло-ТГСК. Основная цель достижения эффективности при алло-ТГСК — поиск оптимального донора, который может быть как родственным, неродственным, так и частично-совместимым родственным, для выполнения трансплантации в запланированные сроки, что особенно важно для пациентов с агрессивными формами гемобластозов. **Выбор**

Formatted: Highlight

Commented [OM42]: Куда направляет образец на типирование, кто присваивает индивидуальный номер и куда выдает результат? Кто платит за исследование?

Formatted: Highlight

Commented [OM43]: Кто контролирует прохождение контроля качества? Разве непрохождение контроля является в РФ отзывом лицензии на лабораторный вид деятельности?

Commented [OM44]: Каким штатным расписанием должна обладать лаборатория для включения в перечень? Необходимо ли этой лаборатории иметь медицинскую лицензию на работу и использовать лицензированные NGS реагенты, которые стоят гораздо дороже. Что приводит к медицинскому исследованию и обязанности выдать результат в случае требования донора согласно статье 22 фз 323

Formatted: Highlight

донора не должен затягиваться из-за призрачной надежды найти со временем более совместимого донора.

**Commented [OM45]:** Не относится к теме методички

### Заключение

Реализация представленных методических подходов к созданию единой системы сбора, накопления информации о потенциальных донорах костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток, а также унифицированных подходов к организации деятельности лабораторий HLA-типирования, позволит не только оказывать пациентам с заболеваниями (состояниями), для лечения которых применяется трансплантация (пересадка) костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток, медицинскую помощь надлежащего качества, но и обеспечить сохранение здоровья донора при выполнении им донорской функции.

**Commented [OM46]:** Методичка об HLA, а вывод о единой системе сбора данных.

**Commented [OM47]:** Нет ничего, что оградило бы донора от всех участников процесса работы с донором

### Список используемой литературы:

1. EFI (European Federation for Immunogenetics). Standards for histocompatibility & Immunogenetics testing. Version 8.0
2. Dehn e.a., 2019 - Selection of unrelated donors and cord blood units for hematopoietic cell transplantation: guidelines from the NMDP/CIBMTR Blood 2019;134(12):924-934
3. Little A.M., Green A., Harvey J., Hemmatpour S., Latham K., Marsh S.G., Poulton K., Sage D. BSHI Guideline: HLA matching and donor selection for haematopoietic progenitor cell transplantation. Int J Immunogenet. 2016;43(5):263-86. doi: 10.1111/iji.12282
4. Tiercy J.M. How To Select The Best Available Related Or Unrelated Donor Of Hematopoietic Stem Cells? Haematologica. 2016; 101: 680–7. DOI: 10.3324/haematol.2015.141119
5. Howard C.A., Fernandez-Vina M.A., Appelbaum F.R., et al. Recommendations for donor human leukocyte antigen assessment and matching for allogeneic stem cell transplantation: consensus opinion of the Blood and Marrow Marrow Transplant Clinical Trials Network (BMT CTN). Biol Blood Transplant. 2015; 21(1): 4–7. DOI: 10.1016/j.bbmt.2014.09.017
6. Ciurea SO, Cao K, Fernandez-Vina M, Kongtim P, Malki MA, Fuchs E, Luznik L, Huang XJ, Ciceri F, Locatelli F, Aversa F, Castagna L, Bacigalupo A, Martelli M, Blaise D, Handgretinger R, Roy DC, O'Donnell P, Bashey A, Lazarus HM, Ballen K, Savani BN, Mohty M, Nagler A. The European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) Consensus Guidelines for the Detection and Treatment of Donor-specific Anti-HLA Antibodies (DSA) in Haploidentical Hematopoietic Cell Transplantation. Bone Marrow Transplant. 2018;53(5):521-534. doi: 10.1038/s41409-017-0062-8.

**Field Code Changed**

**Commented [OM48]:** Почему не изучены русские статьи, написанные за более чем 40 летнюю историю развития донорства костного мозга. Отсутствие международных стандартов по работе с донорами костного мозга из ассоциации доноров.

Приложение 1.

**АНКЕТА ПОТЕНЦИАЛЬНОГО ДОНОРА ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ  
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

Пожалуйста, точно и внимательно ответьте на все вопросы. Все сообщенные Вами сведения являются конфиденциальными и будут использованы только для оценки Вашей возможности быть донором гемопоэтических стволовых клеток. Мы полагаемся на Вашу объективности при заполнении анкеты. Правильности ответов позволит свести к минимуму риск для здоровья донора и реципиента.

Ф.И.О.

донора \_\_\_\_\_

Возраст(полное число лет) \_\_\_\_\_ Пол \_\_\_\_\_

Телефон \_\_\_\_\_

ОБЩЕЕ СОСТОЯНИЕ ЗДОРОВЬЯ		
Были ли у Вас когда-либо	ДА	НЕТ
1)Вирусные гепатиты		
2) Туберкулез		
3)ВИЧ		
4)Диабет (I, II тип.)		
5)Психические заболевания		
6)Наркомания		
7)Алкоголизм		
8)Цирроз печени		
9)Являетесь ли Вы донором крови и ее компонентов		

Я прочитал(а), понял(а) и правильно ответил(а) на все вопросы анкеты, а также получил(а) ответы на все заданные мной вопросы.

Я информирован(а), что во время процедуры взятия крови возможны незначительные реакции организма (кратковременное снижение артериального давления, гематома в области инъекции), не являющиеся следствием ошибки персонала.

Дата \_\_\_\_\_

Потенциальный донор гемопоэтических стволовых клеток

\_\_\_\_\_

(подпись)

(Ф.И.О.)



## Приложение 2.

### **Добровольное информированное согласие на выполнения HLA- типирования и внесение персональных данных в Регистр доноров гемопоэтических стволовых клеток.**

Этим соглашением я выражаю готовность добровольно стать потенциальным донором гемопоэтических стволовых клеток.

В настоящий момент я располагаю достаточной информацией о донорстве гемопоэтических стволовых клеток. Я знаю, что на все мои вопросы, касающиеся донорства, которые возникнут в будущем, я получу ответы от сотрудников ФГБУ ГНЦ МЗ РФ.

Вся информация о результатах HLA – типирования является строго конфиденциальной, не подлежит разглашению, доступ к ней имеет только медицинский персонал с определенными полномочиями.

#### **Я согласен(а)**

1-Сообщить свою Ф.И.О., год рождения, адрес, паспортные данные, контактный телефон, e-mail.

2-Информировать Регистр об изменении моих контактных данных.

3-Сообщить Регистратору контактную информацию о моих доверенных лицах для экстренной связи со мной.

4- Сообщить врачу Регистра всю информацию о моем здоровье.

5-Дать образец своей крови методом венопункции в количестве 20 мл. для проведения HLA – типирования.

6-При совпадении моего HLA – фенотипа с HLA – фенотипов пациента, нуждающегося в трансплантации гемопоэтических клеток, рассмотреть возможность дать свои гемопоэтические клетки на условиях безвозмездной донации. В случае положительного решения подписать информационное согласие на процедуру заготовки гемопоэтических клеток в присутствии двух врачей регистра.

7- Пройти дополнительное медицинское обследование, включающие осмотр специалиста и лабораторные исследования, в случае, если мой HLA-генотип будет совместим с HLA-генотипом пациента и после моего согласия об использовании моих гемопоэтических стволовых клеток.

8-На обработку и распространение моих персональных данных с целью реализации донорства гемопоэтических стволовых клеток.

#### **Я информирован(а) о том, что**

1-Мое согласие стать потенциальным безвозмездным донором гемопоэтических клеток является первым этапом донорства. Если мой HLA – фенотип окажется совместимым с HLA – фенотипом пациента, нуждающегося в трансплантации гемопоэтических клеток, после моего согласия может быть решен вопрос об использовании моих гемопоэтических клеток для спасения больного.

2-Закрытие сведений о наличии у меня ВИЧ-инфекции или венерических заболеваний я подлежу уголовной ответственности в соответствии со статьями 121 и 122 Уголовного кодекса Российской Федерации (Собрание законодательства Российской Федерации, 1999г, N25, ст.2954).

#### **Я имею право:**

**Commented [OM49]:** Какая роль у клиники: Трансплантационный центр, рекрутинговая организация или регистр?

**Commented [OM50]:** Как информировать, где контакты в соглашении?

**Formatted:** Highlight

**Commented [OM51]:** Донор обследуется несколько раз перед сдачей клеток. Это актуально для доноров крови.

**Formatted:** Highlight

1-Получить интересующую меня информацию о процедуре заготовки гемопоэтических клеток.

2-Расторгнуть данное соглашение в одностороннем порядке на любом этапе до подписания информированного согласия на процедуру заготовки гемопоэтических клеток

**Регистр гемопоэтических стволовых клеток обязуется:**

1-Хранить конфиденциальную информацию, касающуюся состояния здоровья потенциального безвозмездного донора гемопоэтических стволовых клеток в закодированном виде и обязуется не передавать ее третьим лицам, в том числе пациенту и его родственникам.

2- При отзыве согласия потенциального донора гемопоэтических стволовых клеток уничтожить информацию о нем в Регистре.

3-Ответить на все интересующие вопросы о донорстве гемопоэтических стволовых клеток.

Фамилия \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Имя \_\_\_\_\_ Отчество \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Дата \_\_\_\_\_ заполнения \_\_\_\_\_ г.

Подпись \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Фамилия, \_\_\_\_\_ имя, \_\_\_\_\_ отчество  
врача: \_\_\_\_\_

Дата \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ г.

Подпись \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Идентификацию и наклеивание марки на пробирку провел

\_\_\_\_\_ дата \_\_\_\_\_ г.

Commented [OM52]: Кто и на каком этапе это заполняет?

**Персональные данные**

Фамилия	
Имя	
Отчество	
Национальность	
Дата рождения	
Возраст (полных лет)	
Пол	
Вес (кг)	
Рост (см)	
Паспортные данные	серия, номер кем выдан, дата

Formatted: Highlight

Commented [OM53]: Это оттолкнет потенциальных доноров.

Formatted: Highlight

Адрес по прописке	
Адрес фактического проживания	
Телефон	
E-mail	

Formatted: Highlight

Контактные данные родственников или друзей, с помощью кого мы могли бы Вас оперативно найти.

Информация о них строго конфиденциальна.

Фамилия, имя, отчество	
Кем приходится	
Адрес	
Телефон, E-mail	

### Приложение 3. Наиболее распространенные методы ДНК-типирования.

1. PCR-SSP - ПЦР (полимеразная цепная реакция, PCR) с сиквенс-специфическими праймерами (SSP - Sequence Specific Primers).

Метод основан на ПЦР с использованием праймеров, специфичных к конкретным аллелям, например A\*26:02:01, или к группам аллелей, например всем аллелям A\*26. Праймеры конструируются таким образом, чтобы вид целевого полиморфизма располагался на 3'-конце. В случае совпадения нуклеотидной последовательностей праймеров с исследуемой ДНК происходит их отжиг на одной из цепей ДНК-мишени с последующей элонгацией в присутствии фермента Taq-полимеразы. Многократное повторение температурных циклов (амплификация) приводит к многократному увеличению количества копий ДНК. Образовавшиеся продукты амплификации ДНК визуализируют с помощью гель-электрофореза. Учет результатов типирования осуществляется субъективно, исходя из электрофоретической подвижности фрагментов в агарозном геле. В зависимости от выбранных праймеров технология SSP позволяет осуществлять типирование как в низком, так и в высоком разрешении. HLA-типирование в высоком разрешении возможно только после получения результата в низком разрешении.

Основной недостаток метода PCR-SSP - низкая производительность. За один рабочий день возможно выполнить типирование не более 3-8 образцов по 5 HLA-генам (в зависимости от оснащённости лаборатории). Также имеется высокий риск контаминации помещений лаборатории продуктами реакции амплификации из-за большого количества открытых операций с продуктами ПЦР.

Основные преимущества - простота выполнения, невысокая стоимость (для типирования в низком разрешении) и доступность необходимого оборудования, возможность проведения типирования как в низком, так и в высоком разрешении. Однако типирование в высоком разрешении требует большого количества дорогостоящих наборов на конкретные группы HLA-аллелей.

2. PCR-SSO - метод специфических олигонуклеотидов (SSO - Sequence Specific Oligonucleotides).

Метод SSO основан на ПЦР с использованием локус-специфичных олигонуклеотидов с последующим блоттингом продукта реакции на положительно заряженную нейлоновую мембрану. Детектирующие олигонуклеотиды конструируются так, чтобы вид целевого полиморфизма был расположен в середине олигонуклеотидной последовательности для прочного связывания с амплифицированной ДНК. Для выявления гибридизации используется хемилюминесцентный или колориметрический метод. HLA-генотип определяется по картине положительных реакций с олигонуклеотидными зондами. Метод SSO типирования наиболее выгоден для лабораторий с большим потоком образцов как экономически эффективный, но мало применим для единичных исследований.

Reverse-SSO подходит как для тестирования отдельных образцов, так и для проведения массовых исследований. Метод основан на локус-специфичной ПЦР. Олигонуклеотиды связаны с мембранами, каждая из которых несет на себе набор олигонуклеотидов, необходимый для типирования группы аллелей или HLA-локуса.

Олигонуклеотидные зонды могут быть зафиксированы на специальных нитроцеллюлозных стрипах, микросферах, на дне типизирующей ячейки.

При использовании олигонуклеотидных зондов, фиксированных на поверхностях микросфер, Lumiplex xMAP использует полистирольные микросферы, окрашенные двумя флуорофорами (красным и инфракрасным) в различных соотношениях. Это позволяет получить до 100 комбинаций уникальных микросфер, обладающих индивидуальными спектральными характеристиками, что обеспечивает мультиплексность анализа. Анализ результатов HLA-типирования проводится в специализированных программных продуктах на основе сравнения исследуемых образцов с опубликованными в международной базе данных последовательностями генов HLA.

### 3. PCR-SBT - метод, использующий секвенирование по Сэнгеру (Sequence Based Typing).

Основной способ секвенирования по Сэнгеру получил название метода «терминаторов». Это двухэтапный процесс – первичная ПЦР с локус- или аллель-специфичными праймерами и собственно секвенирующая реакция. При секвенировании происходит отжиг олигонуклеотидного праймера на специфический участок одноцепочечного амплификата, полученного на первом этапе. Дальнейшая элонгация цепи осуществляется в присутствии полимеразы и четырех дезоксинуклеотидов (dATP, dCTP, dGTP и dTTP). Терминация цепи происходит из-за наличия в реакционной смеси дидезоксинуклеотидов (ddATP, ddTTP, ddGTP или ddCTP), каждый из которых мечен флуоресцентным красителем. Продукты реакции секвенирования анализируют с использованием современных автоматических анализаторов, принцип работы которых основан на проведении капиллярного электрофореза фрагментов ДНК, при этом луч лазера возбуждает флуоресценцию красителей, а детектор определяет, какой нуклеотид в настоящий момент мигрирует через гель.

Несмотря на то, что метод является достаточно точным, низкая производительность, высокая стоимость и возможные ошибки при анализе гетерозиготных образцов делают его применение ограниченным при проведении массовых исследований.

### 4. HLA-типирование методами NGS (next generation sequencing) - секвенирования нового поколения

Определение последовательности нуклеиновых кислот методами высокопроизводительного секвенирования представляет собой одновременное (параллельное) прочтение последовательности нескольких миллионов разных фрагментов исходной ДНК. Общая последовательность этапов высокопроизводительного секвенирования для наиболее популярных технологических вариантов:

1. Выделение нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК).
2. Разрушение НК с помощью химических (ферментативных) или физических методов, для получения фрагментов определенной длины или амплификация продуктов определенной длины (таргетное секвенирование). Большинство методов высокопроизводительного секвенирования использует таргетное секвенирование, основанное на классической ПЦР целевых регионов для дальнейшего массового параллельного секвенирования.
3. Присоединение синтетических олигонуклеотидных адаптеров по краям фрагментов (приготовление библиотеки).

4. Клональная амплификация. Нарботка каждого фрагмента ДНК, например, в отдельном микрореакторе с микрочастицей (эмульсионная ПЦР) и/или непосредственно на поверхности предметного стекла (мостиковая ПЦР).

5. Определение последовательности фрагментов ДНК-методами, предложенными производителями приборов.

6. Биоинформационный анализ данных.

Преимуществом технологии NGS является секвенирование одноцепочечной молекулы ДНК в сочетании с большим количеством прочтений, что исключает возникновение гетерозиготных неоднозначностей. Наиболее распространены в настоящее время две основные технологии - Illumina (секвенирование синтезом) и Ion Torrent (полупроводниковое секвенирование). Значительное количество наборов для типирования генов HLA методом NGS различных производителей для разных технологических платформ значительно упростило и удешевило HLA-типирование большого потока образцов с высоким/аллельным разрешением.

Приложение 4.

Рекомендуемый перечень оборудования лаборатории HLA-типирования

Метод	Наименование оборудования	Кол-во, шт	Назначение
Выделение и очистки нуклеиновых кислот («чистая» зона)	Низкотемпературный морозильник с температурным режимом от минус 40 до минус 86 °С, объемом камеры не менее 500 л	1	Хранение архивных образцов ДНК
	Холодильник с морозильной камерой с температурным режимом холодильной камеры от плюс 2 до плюс 8 °С, морозильной камеры не выше минус 18 °С	1	Хранение образцов ДНК до момента внесения в амплификационную смесь, хранение реагентов
	Автоматическая станция для выделения нуклеиновых кислот, обеспечивающая работу с первичными пробирками с биологическим материалом, с загрузкой образцов не менее 96 образцов за цикл	1	Выделение геномной ДНК из образцов биологического материала доноров ГСК в автоматическом режиме
	Автоматическая станция для выделения нуклеиновых кислот с возможностью работы с небольшими количествами образцов (от 1 до 12)	1	Выделение геномной ДНК из образцов биологического материала доноров ГСК в случае перестановок отдельных образцов
	Спектрофотометр	1	Измерение концентрации и показателя чистоты препаратов ДНК
	Флуориметр	1	Измерение концентрации ДНК
	Набор одноканальных автоматических дозаторов с объемами дозирования 0,5-10 мкл, 2-20 мкл, 10-100 мкл, 100-1000 мкл, 500-5000 мкл	2	Дозирование образцов, реагентов

	Микроцентрифуга-вортекс с роторами для микроцентрифужных пробирок объемом 0,5; 1,5; 2,0 мл	1	Перемешивание, встряхивание образцов, реагентов
	Центрифуга с ротором для планшетов, обеспечивающая скорость вращения 3000g	1	Осаждение реакционных смесей
	ПЦР-бокс	1	Сборка реакционной смеси
Сборка ПЦР («чистая» зона)	Холодильник с морозильной камерой с температурным режимом холодильной камеры от плюс 2 до плюс 8 °С, морозильной камеры не выше минус 18 °С,	1	Хранение реагентов
	Морозильник с температурным режимом до минус 40	1	Хранение реагентов
	Автоматизированная система дозирования жидкостей для раскапывания ПЦР-смесей	1	Сборка реакционной смеси
	Набор одноканальных автоматических дозаторов с объемами дозирования 0,5-10 мкл, 2-20 мкл, 10-100 мкл, 100-1000 мкл	2	Дозирование реагентов
	Степпер электронный, 1 мкл-50 мл	1	Автоматическое диспенсирование одинаковых объемов
	Микроцентрифуга-вортекс с роторами для микроцентрифужных пробирок объемом 0,5; 1,5; 2,0 мл	1	Перемешивание реагентов
«Грязная» зона ПЦР+детекция			



Для лаборатории, работающей методом SSP	Микроцентрифуга-вортекс с роторами для микроцентрифужных пробирок объемом 0,5; 1,5; 2,0 мл	1	Перемешивание реагентов
	Амплификатор	4	Проведение реакций таргетной амплификации
	Оборудование для проведение горизонтального электрофореза в агарозных гелях с системой гель-документации	1	Анализ данных
	Весы	1	Приготовление буфера и агарозного геля
Для лаборатории, работающей методом SSO по технологии Lumiplex xMAP (а)	Амплификатор	1	Проведение реакций таргетной амплификации, гибридизации
	Набор одноканальных автоматических дозаторов с объемами дозирования 0,5-10 мкл, 2-20 мкл, 10-100 мкл, 100-1000 мкл, 500-5000 мкл	1	Дозирование образцов, реагентов
	Набор многоканальных автоматических дозаторов с объемами дозирования 0,5-10 мкл, 2-20 мкл, 10-100 мкл, 30-300 мкл	1	Дозирование образцов, реагентов
	Микроцентрифуга-вортекс с роторами для микроцентрифужных пробирок объемом 0,5; 1,5; 2,0 мл	1	Перемешивание реагентов
	Твердотельный термостат с функцией охлаждения и нагрева, для пробирок объемом от 0,5 до 2 мл	1	Подготовка реагентов
	Мультипараметрический флуоресцентный анализатор	1	Анализ результатов
Для лаборатории, работающей	Набор одноканальных автоматических дозаторов с объемами дозирования 0,5-10 мкл, 2-20 мкл, 10-100 мкл, 100-1000 мкл, 500-5000 мкл, 1000-5000 мкл	1	Дозирование образцов, реагентов

методом SSO с использованием автоматического анализатора для HLA-типирования Mr.SPOT Processor (6)	Амплификатор	1	Проведение реакций таргетной амплификации, гибридизации
	Автоматический анализатор для HLA-типирования Mr.SPOT Processor	1	Анализ результатов
	Комплект расходный материалов к Mr.SPOT Processor	1	Анализ результатов
Для лаборатории, работающей методами SBT/NGS	Магнитный штатив для 96-ти лучного планшета	1	Проведение очистки с использованием магнитных частиц на этапе приготовления библиотек
	Магнитный штатив для одной пробирки 1,5/2,0 мл	1	Проведение очистки с использованием магнитных частиц на этапе финальной очистки библиотек
	Флуориметр	1	Измерение концентрации ДНК
	Набор одноканальных автоматических дозаторов с объемами дозирования 0,5-10 мкл, 2-20 мкл, 10-100 мкл, 100-1000 мкл, 500-5000 мкл	1	Дозирование образцов, реагентов
	Набор многоканальных автоматических дозаторов с объемами дозирования 0,5-10 мкл, 2-20 мкл, 10-100 мкл, 30-300 мкл	1	Дозирование образцов, реагентов

Микроцентрифуга-вортекс с роторами для микроцентрифужных пробирок объемом 0,5; 1,5; 2,0 мл	1	Перемешивание реагентов
Центрифуга с ротором для планшетов с охлаждением, обеспечивающая скорость вращения 3000g	1	Осаждение реакционных смесей
Центрифуга-вортекс для 96-луночных планшетов	1	Перемешивание реакционных смесей при приготовлении библиотек
Амплификатор с “режимом эмуляции 9600” – 0,8 °C/сек на нагрев; 1,6 °C/сек на охлаждение	1	Проведение реакций таргетной амплификации, гибридизации, лигирования, аденилирования
Секвенатор капиллярный	1	Для секвенирования по Сэнгеру
Прибор MiSeq System	1	Массовое параллельное секвенирование библиотек