



NGS-технология «HLA-эксперт» и трансплантация гемопоэтических стволовых клеток

Маргарита Николаевна Болдырева,
Татьяна Эдуардовна Янкевич
«ДНК-Технология» (Москва)



STANDARDS FOR HISTOCOMPATIBILITY & IMMUNOGENETICS TESTING

Version 8.0

E 5.3.4.3

Требования к HLA-типированию при пересадке гемопоэтических стволовых клеток от неродственного донора:

- должно быть использованы методы ДНК-типирования, включая, как минимум, **HLA-A / B / C и DRB1 на уровне высокого разрешения**
- в случае требований трансплантационного протокола, включают дополнительные HLA-локусы и более высокий уровень разрешения



STANDARDS FOR HISTOCOMPATIBILITY & IMMUNOGENETICS TESTING

Version 8.0

F1.1.4

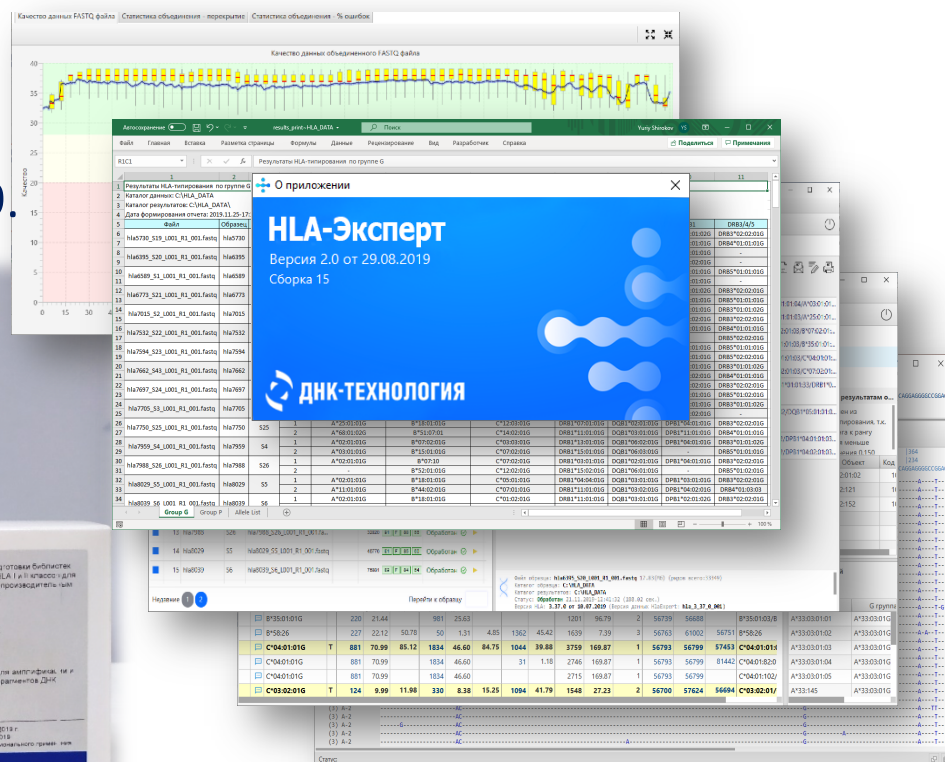
Требования к типированию на уровне высокого разрешения:

- Определение всех HLA-аллелей, кодирующих одинаковую последовательность белка в антигенсвязывающем домене.
- HLA аллели должны быть определены на уровне первого и второго поля в соответствии с номенклатурой ВОЗ.
- Для этого должны быть разрешены все неоднозначности в пределах **2 и 3 экзонов для HLA I класса** и **2 экзона для HLA II класса**, исключая нулевые аллели, имеющие полиморфизмы при отсутствии экспрессии кодируемого белка на клетке.

Какое количество локусов является оптимальным?

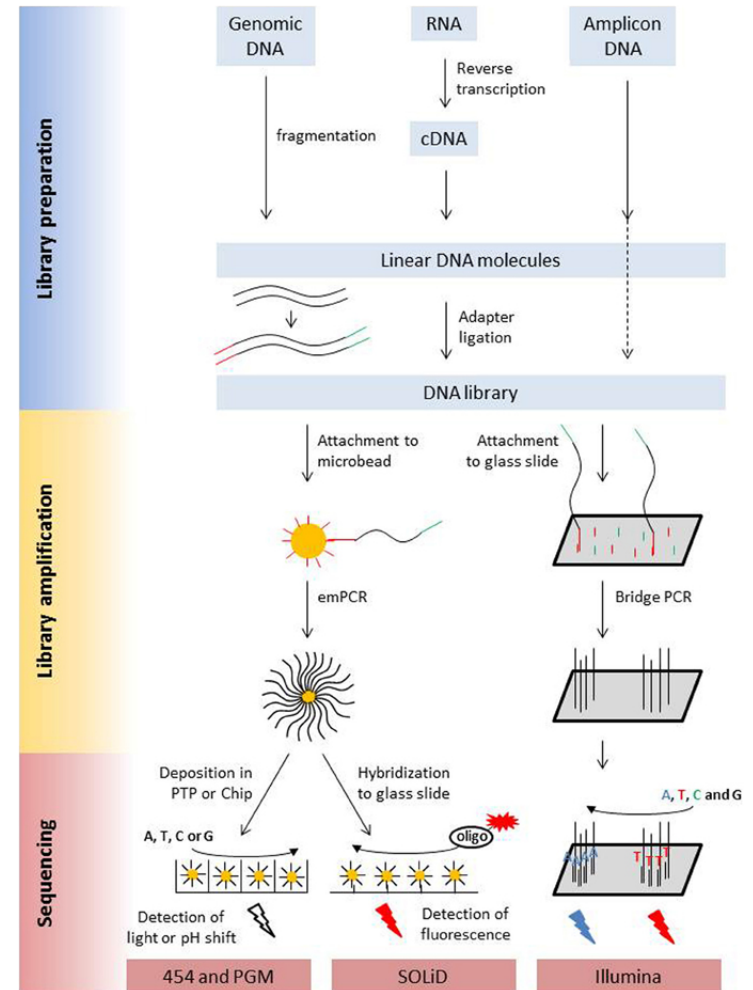
Локусы	Минимум 4 локуса (EFI)	5 локусов (принято в России)	6 локусов (принято за рубежом)	9 локусов (HLA- Эксперт)	11 локусов (максималь- ный набор)
A	●	●	●	●	●
B	●	●	●	●	●
C	●	●	●	●	●
DRB1	●	●	●	●	●
DRB3/4/5				● ● ●	● ● ●
DQB1		●	●	●	●
DPB1			●	●	●
DQA1					●
DPA1					●

Регистрационное
удостоверение
№ РЗН 2019/9208 от 08.11.2019.



Общая последовательность этапов высокопроизводительного секвенирования для наиболее популярных технологических вариантов (платформ):

1. Выделение ДНК;
2. Подготовка библиотеки;
3. Клональная амплификация;
4. Проведение секвенирования;
5. Регистрация и обработка результатов;
6. Анализ полученных данных.



Состав набора

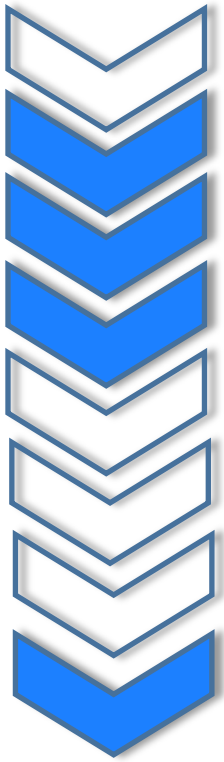
Набор реагентов рассчитан на 288 исследований

- 1) Комплект реагентов для амплификации и подготовки библиотек фрагментов ДНК;
- 2) Комплект индексов для подготовки библиотек фрагментов ДНК;
- 3) Комплект реагентов для очистки библиотек фрагментов ДНК;
- 4) Комплект реагентов для проведения секвенирования; **Illumina**
- 5) Дистрибутив с программным обеспечением «HLA-Эксперт» (версия 2.0).

В двух форматах: ручном и автоматизированном.

6 вариантов комплектации, в зависимости от наличия «базовой» химии для Illumina.

РАБОЧИЙ ПРОЦЕСС



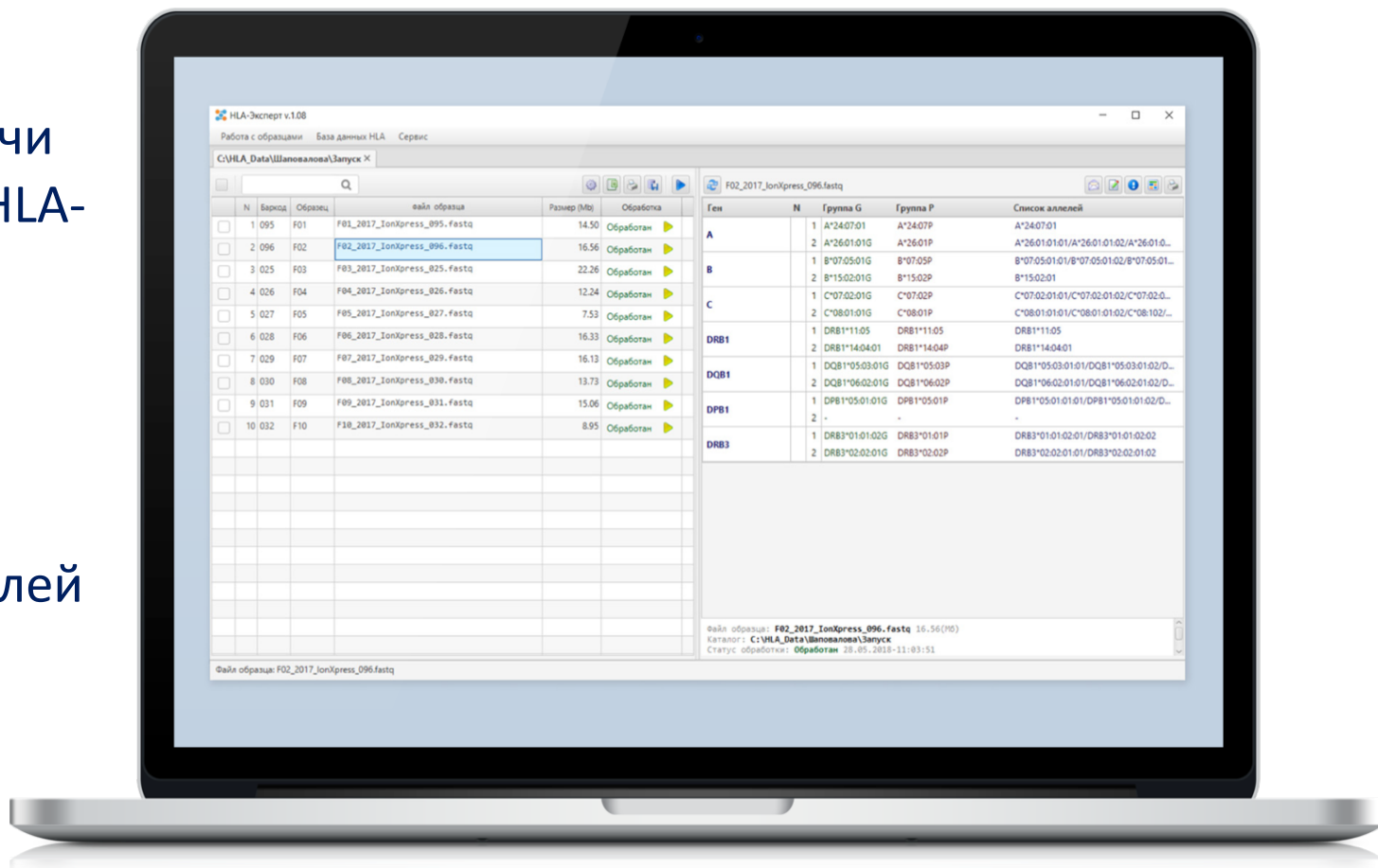
- Выделение ДНК (1 ч 30 мин);
- Оценка качества и нормализация ДНК (2 часа);
- Амплификация в 2 пробирках (1 час 10 минут);
- Подготовка библиотеки (3-4 часа);
- Оценка качества и количества библиотеки (15 минут);
- Мостиковая ПЦР, секвенирование, обработка результатов (44-48 часов);
- Расчет генотипа (обычный компьютер 1-5 мин на 1 образец).

- Время подготовки библиотек для 288 образцов – 1-2 рабочих дня
- Время с момента выделения и до получения результата – 4 дня.

Программное обеспечение «HLA-Эксперт»

Формат выдачи
результатов HLA-
типирования:

- группы G
- группы P
- список аллелей



Валидация системы HLA-Эксперт

Валидирована на 80 образцах ДНК, охарактеризованных на уровне высокого разрешения, в рамках участия во внешнем контроле качества HLA-типирования (External Proficiency Testing CET2011-2018)

Certificate of Participation

Attn. Dr. Margarita Boldyreva
Institute of Immunology
Immunogenetics Department
Kashirskoye shosse, 24-2
115478 Moscow

	Unterzeichner	Dr. Gottfried Fischer
	Datum/Zeit-UTC	2019-01-15T07:43:38+01:00
	Prüfinformation	Informationen zur Prüfung der elektronischen Signatur finden Sie unter: https://www.signaturpruefung.gv.at
Hinweis	Dieses mit einer qualifizierten elektronischen Signatur versehene Dokument ist gemäß EU Verordnung Nr. 910/2014 (eIDAS) einem handschriftlich unterzeichneten Dokument grundsätzlich rechtlich gleichgestellt.	

The HLA-Laboratory with the code
RUMOBO

participated in an External Proficiency Testing Exercise organised
by Dr. Gottfried Fischer and Ingrid Faé, Department for Blood
Group Serology and Transfusion Medicine, Medical University of
Vienna, covering the period

01.01.2018 - 31.12.2018

with 10 DNA samples being sent to the participants.

Locus, Resolution	Results Submitted (n)	Discrepancies with the Organiser's Typing (n)
HLA-A, high resolution	10	0
HLA-B, high resolution	10	0
HLA-C, high resolution	10	0
HLA-DRB1, high resolution	10	0
HLA-DRB3/4/5, high resolution	10	0
HLA-DQB1, high resolution	10	0
HLA-DPB1, high resolution	10	0
HLA-DQA1, high resolution	0	0

Vienna, 13.01.2019



Опыт типирования системой «HLA-Эксперт»

Протестировано:

- ❖ 2500 образцов собственных коллекции, предварительно охарактеризованных на низком разрешении;
- ❖ 164 образца Казанский федеральный университет в рамках валидационных испытаний, предварительно охарактеризованных на высоком разрешении;
- ❖ 96 образцов ФГБУ Кировский НИИ гематологии и переливания крови ФМБА России в рамках клинических испытаний, предварительно охарактеризованных на высоком разрешении;
- ❖ 384 образца ФГБУ "НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова" Минздрава России, не охарактеризованных.

По итогам тестирования были внесены изменения в набор и ПО.

Технологические плюсы

- ❖ использование RealTime-ПЦР для определения количества и качества геномной ДНК с целью последующего выравнивания концентраций ДНК перед амплификацией целевых продуктов
- ❖ амплификация целевых продуктов в двух пробирках по одной программе за счет мультиплексирования
- ❖ использование интеркалятора позволяет оценивать результаты ПЦР при постановке амплификации на приборе для RT-ПЦР без использования электрофореза (для других приборов – ЭФ)
- ❖ индексы раскапаны в планшеты и высушены
- ❖ пулирование образцов проводят сразу после присоединения индексов, что позволяет значительно снизить трудоемкость и время очистки библиотек: 192 образца – 12 пробирок, 288 образцов – 18 пробирок.

Технологические плюсы

- ❖ сервисная программа для сопровождения образца и выполнения необходимых расчетов по всем процедурам подготовки библиотек.
- ❖ возможность автоматизации (дозирующее устройство «ДТстрим, пр-во ДНК-Технология »).
- ❖ большое количество образцов в одном запуске:
 - MiSeq Reagent Kit v2 (500 cycles) – 192 образца;
 - MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycle) – 288 образцов.



Спасибо за внимание!