

НЕОДНОЗНАЧНОСТИ ЛОКУСОВ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ HLA-ТИПИРОВАНИЯ ПО ТЕХНОЛОГИИ SSO И ПОПЫТКА ИХ РАЗРЕШЕНИЯ

Логинова М.А., Парамонов И.В., Трофимова Н.П.

ФГУ «ПОМЦЭКПКИФДП Росздравнадзора», Киров

Проведено HLA-типирование 705 потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток, проживающих на территории Приволжского федерального округа, по локусам (HLA)-A, B, DRB1 и 155 из их числа по локусу HLA-C. 48 образцов не могут быть внесены в базу данных по причине выявления аллельных неоднозначностей по HLA-локусам I класса – HLA-A, HLA-B. Для раскрытия неоднозначностей использовали наборы реагентов AlleleSEQR HLA Sequencing, которые позволили раскрыть неоднозначности по локусу HLA-A в 44% случаев, по локусам HLA-B и HLA-C – в 40% случаев. Применение программного обеспечения HARPs Finder показало возможность раскрытия всех выявленных аллельных неоднозначностей (исключение неоднозначности типов – A*03/A*32 или A*74:13/A*32:04 и A*01/A*11 или A*36:04/A*11) при дополнении базовых наборов AlleleSEQR HLA Sequencing наборами реагентов AlleleSEQR HARPs.

Ключевые слова: HLA-типирование.

AMBIGUITY OF LOCI DURING HLA-TYPING ON SSO TECHNOLOGY AND ATTEMPT TO RESOLVE THEM

Loginova M.A., Paramonov I.V., Trofimova N.P.

Volga Federal District Medical Center of Expertise of Blood Products Quality and Investigation of Donor Plasma Fractionation

Sequence specific oligonucleotides typing was used to identify human leukocyte antigen (HLA)-A, B, DRB1 alleles from 705 recruited volunteers with Volga Federal District for unrelated hematopoietic stem cell registry and 155 of their number at locus HLA-C. 48 samples cannot be entered into the database because of ambiguities in the identification of allelic loci on HLA-class I – HLA-A, HLA-B. To resolution of ambiguity use reagents kits AlleleSEQR HLA Sequencing, which allowed to reveal the ambiguity of the locus HLA-A, 44% of cases, the loci HLA-B and HLA-C – 40% of cases. Application software HARPs Finder showed the possibility of resolution of all identified allelic ambiguities (with the exception of types of ambiguity – A*03/A*32 or A*74:13/A*32:04 and A*01/A*11 or A*36:04/A*11) with the addition of basic kits AlleleSEQR HLA Sequencing reagents kit AlleleSEQR HARPs.

Key words: HLA-typing.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы трансплантация кроветворных стволовых клеток как метод лечения успешно стала применяться при лечении тяжелых заболеваний системы крови, опухолевых, наследственных и других болезней.

Пересадка кроветворных стволовых клеток показана более чем при 60 заболеваниях лимфатической и кроветворной тканей и спасает 3000 боль-

ных в год. Однако только для 30% больных, нуждающихся в трансплантации кроветворных стволовых клеток, удастся найти донора-родственника; в остальных случаях необходим поиск неродственного донора, совместимого с реципиентом по системе HLA (human leukocyte antigen) [4, 7].

Развитие неродственных трансплантаций стимулировало прогресс развития техники проведения HLA-типирования для поиска совместимого

Статья поступила в редакцию 09.08.10 г.

Контакты: Логинова Мария Александровна, канд. биол. наук, биолог лаборатории HLA-типирования.

Тел. (8332) 36-80-77, **e-mail:** Loginova-MA@rosplasma.ru

донора, поскольку известно, что степень несовместимости между донором и реципиентом влияет на успешное проведение трансплантации и снижение посттрансплантационных рисков [6, 8, 9].

В настоящее время HLA-типирование проводится двумя методами – серологическим и молекулярно-генетическим. Классический серологический метод HLA-типирования основан на микролимфоцитотоксическом тесте, а молекулярные методы используют проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР) [5]. Все чаще различные лаборатории HLA-типирования делятся не слишком успешным опытом использования серологического метода типирования в своей практике [2, 3], и все большее развитие получают молекулярно-генетические методы.

Среди молекулярно-генетических методов различают технологии SSP (sequence specific primers), SBT (sequence-based typing) и SSO (sequence specific oligonucleotides) [1, 5].

Технология SSP позволяет производить типирование образцов как на низком, так и на высоком уровне разрешения, но основным недостатком этой технологии является ее низкая производительность. Эта технология хорошо применима в небольших лабораториях, где потребность в проведении HLA-типирования – примерно 3–5 образцов в день [1, 5].

Технология SSO отличается относительно низкой трудоемкостью и высокой производительностью, при этом позволяет также определять точечные мутации генов HLA, то есть практически обладает потенциалом технологии SBT. Именно эта технология наиболее востребована при формировании регистров доноров, так как для создания регистра доноров костного мозга в базе должны быть накоплены данные о типировании десятков тысяч доноров [1, 5].

Технология SBT, основанная на определении полной нуклеотидной последовательности (секвенировании) ДНК-мишени, обладает максимальной разрешающей способностью, но является самой дорогой из имеющихся на сегодняшний день и в связи с этим самой малораспространенной [1, 5]. В современной лаборатории данная технология применяется чаще всего в тех случаях, когда возникают сложности с интерпретацией результатов исследования при использовании других технологий.

Целью данной работы являлась оценка эффективности использования наборов реагентов Allele-SEQR HLA Sequencing (технология SBT) для раскрытия аллельных неоднозначностей, выявленных в генотипах потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток при типировании по технологии SSO.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено HLA-типирование 705 человек, являющихся потенциальными донорами гемопоэтических стволовых клеток, проживающих на территории Приволжского федерального округа.

Препараты ДНК для проведения HLA-типирования были получены из замороженных образцов цельной крови (антикоагулянт – ЭДТА) методом колоночной фильтрации с помощью станции QIAcube с использованием наборов реагентов QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) и станции BioRobot MDx с использованием наборов реагентов QIAamp DNA Blood BioRobot MDx Kit (QIAGEN). Концентрация препаратов ДНК, определенная на спектрофотометре UV-1800, составляла в среднем 15–30 нг/мкл при соотношении $A_{260}/A_{280} = 1,65/1,90$.

HLA-типирование по локусам HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 (до второго знака) было осуществлено по технологии гибридизации с олигонуклеотидными зондами, иммобилизованными на микросферах (SSO), с использованием наборов реагентов LABType SSO (One Lambda, США) с разрешением метода от среднего к высокому. Интенсивность флуоресценции фикоэритрина по каждому типу микросфер идентифицировали с использованием системы диагностической Luminex 200 (в модификации LABScan 200 с XY платформой), интегрированной в рабочую станцию для автоматизации постаплификационных этапов мультипараметрического флуоресцентного анализа LABXpress. Обработка данных, полученных на проточном флуориметре Luminex 200, производилась с помощью программного обеспечения HLA Fusion v.1.2.

Результаты случаев гомозиготности были подтверждены наборами реагентов AlleleSEQR HLA Sequencing (Abbott). Капиллярный электрофорез осуществляли на четырехкапиллярном генетическом анализаторе ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, США), полученные сиквенсы просматривали в программном обеспечении Sequencing Analysis v.5.2, анализировали в программном обеспечении Assign SBT v.3.5.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе исследования проведено HLA-типирование по двум локусам I класса (HLA-A и HLA-B) и локусу II класса – HLA-DRB1 705 человек, 155 из них дополнительно типированы по локусу HLA-C. Применение наборов реагентов LABType SSO (и в целом технологии SSO) в лабораториях HLA-типирования, деятельность которых направлена на создание баз данных доноров органов и тканей, имеет существенные преимущества – высо-

кую производительность и низкую трудоемкость – по сравнению с технологиями SSP (sequence specific primers) и SBT (sequence-based typing).

Однако в результате проведенных исследований было выявлено, что наборы реагентов LABType SSO с разрешением от среднего к высокому не позволяют в 100% случаев определять аллельный генотип до второго знака, что заявлено в инструкции по применению наборов реагентов фирмой-производителем – OneLambda, США. Так, в ряде генотипов по локусам I класса – A, B и C были выявлены неоднозначности («двойности»). Типы неоднозначностей, выявленные в ходе экспериментов, представлены в табл. 1.

Наибольшим показателем неоднозначности характеризуется локус HLA-C (6,45%), для локусов HLA-A и HLA-B этот показатель равен 4,82 и 2,13% соответственно; также необходимо отметить, что при изучении локуса HLA-DRB1 (II класс) неоднозначностей выявлено не было.

Наличие аллельных неоднозначностей в ряде генотипов существенно снижает эффективность работы лаборатории HLA-типирования, деятельность которой направлена на формирование регистра доноров, потому что внесение таких образцов в базу данных не представляется возможным. Так, согласно данным, представленным в табл. 1, из 705 образцов 48 (один из образцов одновременно имеет неоднозначности по локусам HLA-A и HLA-B) не будут внесены в базу данных по причине наличия неоднозначностей в генотипах по локусам HLA-A и HLA-B, которые наряду с локусом HLA-DRB1 являются обязательными для типирования, согласно международным стандартам [10, 11].

Вышеизложенное определяет необходимость поддержания в лаборатории второго метода HLA-типирования для разрешения выявляемых неоднозначностей. В нашем случае для разрешения неоднозначностей были использованы наборы реагентов AlleleSEQR HLA Sequencing. Результаты исследований по раскрытию выявленных неоднозначностей по локусам HLA-A, HLA-B и HLA-C представлены в табл. 2, 3 и 4 соответственно.

Из данных, представленных в табл. 2, следует, что только в 44% случаев выявленные типы аллельных неоднозначностей были раскрыты с использованием базовых наборов реагентов AlleleSEQR HLA Sequencing; при этом для 9 образцов из 34 исследованных генотип по локусу HLA-A был определен до шестого знака. Неоднозначности типов – A*03/A*32 или A*74:13/A*32:04 и A*01/A*11 или A*36:04/A*11 раскрыты не были. В дополнение к базовым наборам реагентов AlleleSEQR HLA Sequencing фирма-производитель рекомендует использовать наборы реагентов AlleleSEQR HARPs

(Heterozygous ambiguity resolution primers – праймеры для разрешения гетерозиготных неоднозначностей). Несомненным преимуществом наборов реагентов AlleleSEQR HARPs является возможность ретроспективного анализа образцов в программном обеспечении Assign SBT v.3.5.

Таблица 1

Типы неоднозначностей и показатели неоднозначности локусов

HLA-локус	Тип неоднозначности	Число образцов с данным типом неоднозначности	Показатель неоднозначности, %
HLA-A	A*23/A*24 или A*24:13/A*24:71	3	4,82
	A*01/A*26 или A*36:04/A*26:29	8	
	A*24/A*33 или A*31:08/A*33:19	4	
	A*03/A*32 или A*74:13/A*32:04	11	
	A*01/A*11 или A*36:04/A*11	8	
HLA-B	B*07/B*41 или B*40:32/B*42:01	3	2,13
	B*15/B*40 или B*46:16/B*40	4	
	B*07/B*48 или B*81/B*48:08	3	
	B*18/B*55 или B*18:15/B*56:19N	1	
	B*44/B*50:01 или B*44:09/B*49:02	2	
	B*13/B*56 или B*13:03/B*55:02	1	
	B*13/B*50:01 или B*13:09/B*49:02	1	
HLA-C	C*05/C*12 или C*08:12/C*12:21	4	6,45
	C*05:20/C*12 или C*08/C*12	1	
	C*05:20/C*08 или C*08/C*08	1	
	C*04/C*05:20 или C*04/C*08	1	
	C*05:20/C*14 или C*08/C*14	1	
	C*05/C*05:20 или C*05/C*08	1	
	C*05:20/C*06 или C*08/C*06	1	

Примечание. Показатель неоднозначности локуса рассчитывали как отношение количества образцов с выявленными неоднозначностями к общему числу образцов.

Таблица 2

Сравнение результатов HLA-типирования по технологиям SSO и SBT по локусу HLA-A

№ п/п	Результаты типирования по технологии SSO		Число образцов	Результаты типирования по технологии SBT		Число образцов
1	A*23 A*24:13	A*24 A*24:71	3	A*23:01:01 A*23:17	A*24:02:01 A*24:02:01	3
2	A*01 A*36:04	A*26 A*26:29	8	A*01:01:01	A*26:01:01	8
3	A*24 A*31:08	A*33 A*33:19	4	A*24:02:01	A*33:01:01	1
				A*24:02:01 A*24:03:01 A*24:34	A*33:03:01 A*33:10 A*33:11	3
4	A*03 A*74:13	A*32 A*32:04	11	A*03:01:01 A*03:08 A*74:13	A*32:01:01 A*32:17 A*32:04	11
5	A*01 A*36:04	A*11 A*11	8	A*01:01:01 A*01:13 A*01:17 A*01:25 A*36:04	A*11:01:01 A*11:40 A*11:19 A*11:44 A*11:39	8

Таблица 3

Сравнение результатов HLA-типирования по технологиям SSO и SBT по локусу HLA-B

№ п/п	Результаты типирования по технологии SSO		Число образцов	Результаты типирования по технологии SBT		Число образцов
1	B*07 B*40:32	B*41 B*42:01	3	B*07:02:01 B*07:61 B*40:32	B*41:02:01 B*41:02:01 B*42:01:01	3
2	B*15 B*46:16	B*40 B*40	4	B*15:01:01 B*15:01:01 B*15:30 B*15:63 B*15:78 B*15:117	B*40:01 B*40:02 B*40:52 B*40:38 B*40:87 B*40:63	4
3	B*07 B*81	B*48 B*48:08	3	B*07:02:01 B*07:61 B*81:01 B*81:02	B*48:01:01 B*48:01:01 B*48:08 B*48:08	3
4	B*18 B*18:15	B*55 B*56:19N	1	B*18:01:01 B*18:03 B*18:15 B*18:17N	B*55:01:01 B*55:31 B*55:02 B*55:01:01	1
5	B*44 B*44:09	B*50:01 B*49:02	2	B*44:02:01 B*44:09 B*44:48 B*44:79 B*44:91	B*50:01:01 B*49:02 B*50:04 B*45:04 B*50:02	2
6	B*13 B*13:03	B*56 B*55:22	1	B*13:02:01 B*13:09	B*56:01:01 B*56:07	1
7	B*13 B*13:09	B*50:01 B*49:02	1	B*13:02:01 B*13:09	B*50:01:01 B*49:02	1

Для определения возможности использования наборов реагентов AlleleSEQR HARPs для раскрытия неоднозначностей типов – A*03/A*32 или A*74:13/A*32:04 и A*01/A*11 или A*36:04/A*11 применяли программное обеспечение HARPs Finder,

доступное в режиме on-line на сайте www.harpfinder.conexio-genomics.com. Анализ вышеуказанных типов неоднозначностей показал, что полное их разрешение, даже с применением HARPs, невозможно. Однако необходимо отметить, что в случае неодно-

Таблица 4

Сравнение результатов HLA-типирования по технологиям SSO и SBT по локусу HLA-C

№ п/п	Результаты типирования по технологии SSO		Число образцов	Результаты типирования по технологии SBT		Число образцов
1	C*05 C*08:12	C*12 C*12:21	4	C*05:01:01 C*05:08 C*08:02:01 C*08:05	C*12:03:01 C*12:24 C*12:04:02 C*12:05	4
2	C*05:20 C*08	C*08 C*08	1	C*08:01 C*08:02	C*08:02 C*08:22	1
3	C*05:20 C*08	C*12 C*12	1	C*08:02 C*08:29	C*12:03 C*12:24	1
4	C*04 C*04	C*05:20 C*08	1	C*04:01:01 C*04:09N C*04:10 C*04:30 C*04:33 C*04:29	C*08:02 C*08:02 C*08:05 C*08:02 C*08:28 C*05:01:01	1
5	C*05:20 C*08	C*14 C*14	1	C*08:02:01	C*14:02:01	1
6	C*05 C*05	C*05:20 C*08	1	C*05:01:01	C*08:02:01	1
7	C*05:20 C*08	C*06 C*06	1	C*05:01:01 C*08:02 C*08:29	C*06:11 C*06:02 C*06:06	1

значности типа A*03/A*32 или A*74:13/A*32:04 постановка одной дополнительной сиквенсовой реакции (HARP – A2R311T) позволит раскрыть аллели A*74:13/A*32:04, и генотип образца может быть определен до второго знака. В случае неоднозначности типа A*01/A*11 или A*36:04/A*11 постановка дополнительной сиквенсовой реакции (HARP – A2F203G) позволяет раскрыть аллели A*01:13/A*11:40 и A*01:17/A*11:19.

По локусу HLA-B были раскрыты только три типа неоднозначностей из выявленных семи, что следует из данных табл. 3. При этом использование программного обеспечения HARP Finder показало, что для полного разрешения трех типов неоднозначностей B*07/B*41 или B*40:32/B*42:01, B*07/B*48 или B*81/B*48:08 и B*13/B*50:01 или B*13:09/B*49:02 достаточно постановки одной дополнительной сиквенсовой реакции – HARPs – A2F98A, A2F261C и A2F98A соответственно. Для раскрытия неоднозначности типа B*44/B*50:01 или B*44:09/B*49:02 существует необходимость в постановке двух дополнительных сиквенсовых реакций (HARPs – A2F98A, B3F357C).

Из данных табл. 4 следует, что только в 40% случаев аллельная неоднозначность по локусу HLA-C раскрыта, при этом в двух случаях – до шестого знака. Для оценки возможности раскрытия неоднозначностей, обозначенных в табл. 4 номерами 1, 4 и 7, также использовали программное обеспечение HARP Finder. Во всех трех случаях полное разре-

шение (до четвертого знака) неоднозначностей возможно, но с постановкой соответствующего числа дополнительных сиквенсовых реакций: для неоднозначности C*05/C*12 или C*08/C*12 (порядковый номер 1 в табл. 4) – трех (HARPs – A3F363G, C3F361T, C2F176G); для C*04/C*05 или C*04/C*08 (порядковый номер 4 в табл. 4) – двух (HARPs – A2F98A, C2F176G); для C*06/C*05 или C*06/C*08 (порядковый номер 7 в табл. 4) – двух (HARPs – A2F98A, C2F176G).

Необходимо отметить еще одно преимущество наборов реагентов AlleleSEQR HARPs – это их универсальность, то есть один и тот же HARP можно использовать для разрешения различных неоднозначностей, например: HARP A2F98A позволяет разрешать неоднозначности B*07/B*41 или B*40:32/B*42:01, B*13/B*50:01 или B*13:09/B*49:02, C*04/C*05 или C*04/C*08, C*06/C*05 или C*06/C*08. Таким образом, в зависимости от неоднозначностей, распространенных в данной популяции, есть возможность формирования небольшого набора типов HARPs в условиях одной лаборатории и использования их при необходимости.

Подводя итоги, можно сказать, что базовые наборы AlleleSEQR HLA Sequencing не могут являться «золотым стандартом» для раскрытия неоднозначностей, выявляемых при использовании технологии SSO, однако дополнение базовых наборов наборами реагентов AlleleSEQR HARPs позволяет практически во всех случаях определять ге-

нотип до четвертого аллельного знака и разрешать все выявляемые неоднозначности (исключение составляют неоднозначности типов – A*03/A*32 или A*74:13/A*32:04 и A*01/A*11 или A*36:04/A*11).

Следующим этапом развития нашей лаборатории HLA-типирования должен стать опыт использования наборов реагентов LABType SSO с высоким разрешением. Наличие в лаборатории автоматической станции LABXpress позволит без снижения скорости и качества исследований перевести лабораторию, деятельность которой направлена на создание базы данных генетически охарактеризованных доноров органов и тканей, на новый уровень, позволяющий осуществлять высокоразрешающее типирование в короткие сроки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Блау И.В. Изучение HLA и подбор донора для неродственной трансплантации стволовых гемопоэтических клеток // Вестник гематологии. 2009. Т. V. № 4. С. 10–11.
2. Головкина Л.Л., Кутыина Р.М., Пушкина Т.Д. Оптимальный метод тканевого типирования больных заболеваниями систем крови и доноров гемопоэтических стволовых клеток // Вестник гематологии. 2009. Т. V. № 4. С. 21–22.
3. Еlicheва З.М., Усманова И.З., Куликова С.Н. Сравнительный анализ серологического и молекулярно-генетического методов HLA-типирования // Вестник гематологии. 2009. Т. V. № 4. С. 29–30.
4. Иоффе Ю.Г. Современное состояние неродственного донорства гемопоэтических стволовых клеток в Российской Федерации // Клиническая онкогематология. 2009. Т. 2. № 3. С. 344–346.
5. Laboratory Manual American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. – 4th edition.
6. Lee S.J., Klein J., Haagenson M. et al. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation // Blood. 2007. № 110. P. 4576–4583.
7. Mackay I., Rosen F.S. The HLA system // The New England Journal of Medicine. 2000. Vol. 343. № 11. P. 782–787.
8. Petersdorf E.W., Gooley T.A., Anasetti C. et al. Optimizing outcome after unrelated marrow transplantation by comprehensive matching of HLA class I and II alleles in the donor and recipient // Blood. 1998. № 98. P. 3515–3520.
9. Sasazuki T., Juji T., Morishima Y. et al. Effect of matching of class HLA alleles on clinical outcome after transplantation of hematopoietic stem cells from unrelated donor // The New England Journal of Medicine. 1998. Vol. 339. № 17. P. 1177–1186.
10. Standards for Accredited Laboratories American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. 2009. <http://www.ashi-hla.org/lab-center/accreditation/forms/standards/>.
11. Standards for histocompatibility testing. European Federation for Immunogenetics. 2008. Vol. 5.6.