

Федеральное медико-биологическое агентство

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Российский научно-исследовательский институт гематологии и
трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства России»
(ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России)**

Диагностика антигенов тромбоцитов методом ПЦР в реальном времени

Методические рекомендации
Рег.№ - 2014

Санкт-Петербург
2014

Предисловие

1. Разработаны в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России).
191024, Санкт-Петербург, ул.2-я Советская, 16

Директор – д.м.н., профессор

Заместитель директора, д.м.н., профессор



А.В. Чечеткин

С.С. Бессмельцев

2. Исполнители:

Научный руководитель – руководитель лаборатории изосерологии,

д.б.н., профессор

н.с., к.б.н.

н.с.

м.н.с.

Н.В. Минеева

И.И. Кробинец

В.В. Бурылев

С.В. Гавровская

3. Введение в действие – с момента утверждения.

4. Введены впервые.

Содержание

| | |
|---|----|
| 1 Область применения | 5 |
| Введение | 6 |
| Основные нормативные положения | 7 |
| 1 Методика проведения исследования | 7 |
| 1.1 Материалы исследования | 7 |
| 1.2 Реактивы и оборудование | 7 |
| 1.3 Подготовка к выполнению исследования | 8 |
| 1.4 Проведение исследования | 8 |
| 1.5 Обработка результатов | 9 |
| 1.6 Контроль точности | 9 |
| 1.7 Учет результатов | 9 |
| 1.7.1 Учет результатов на приборе АНК-32 | 10 |
| 1.7.2 Учет результатов на приборе ДТ-96 | 12 |
| 1.7.3 Учет результатов на приборе Rotor Gene 6000 | 13 |
| 1.7.4 Учет результатов на приборе iCycler iQ5 | 13 |
| Библиография | 15 |
| Список исполнителей | 16 |

Термины, определения, обозначения и сокращения

| | |
|-------------------------------|---|
| АБТ | буфер с ферментом Таq-полимераза |
| Ген | единица наследственной информации, детерминирующая развитие того или иного признака, неделимая в функциональном отношении |
| ДНК | дезоксирибонуклеиновая кислота |
| ПЦР | полимеразная цепная реакция |
| НРА (human platelet antigens) | антигены тромбоцитов человека |

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель руководителя
Федерального медико-биологического агентства



Диагностика антигенов тромбоцитов методом ПЦР в реальном времени

Методические рекомендации

1 Область применения

Настоящий документ может быть применен:

1. Для типирования антигенов тромбоцитов доноров, с целью создания регистров разных уровней.
2. Для типирования антигенов тромбоцитов пациентов, которым могут понадобиться многократные трансфузии тромбоцитов, либо уже получавшим такие трансфузии, с целью подбора совместимых тромбоцитов доноров.
3. Для типирования родителей и новорожденных с целью выявления возможной несовместимости по антигенам тромбоцитов и диагностики аллоиммунной тромбоцитопении у детей.

Методические рекомендации предназначены для врачей клинической лабораторной диагностики. Уровень внедрения: многопрофильные больницы.

Введение

В последние годы значительно возросло количество трансфузий тромбоцитов. Однако на практике после трансфузии у больных часто наблюдается отсутствие клинического эффекта и прироста числа тромбоцитов. Одной из причин этого является несовместимость донора и реципиента по антигенам тромбоцитов (НРА – human platelet antigens, антигены тромбоцитов человека) [1]. К настоящему времени описано шесть основных систем антигенов тромбоцитов человека (НРА1-5,15) и несколько редко встречающихся антигенов, которые кодируются генами, различающимися между собой заменой одного нуклеотида в ДНК. Замена нуклеотида приводит к замещению одной аминокислоты на другую в полипептидной цепи при синтезе антигена, в результате чего обеспечивается разнообразие антигенов тромбоцитов [2,3,4].

Учитывая определенные трудности типирования тромбоцитарных антигенов серологическими методами из-за отсутствия антисывороток, в последние годы с этой целью применяются молекулярно-генетические методы, основанные на использовании полимеразной цепной реакции (ПЦР) [5]. В большинстве случаев детекция результатов ПЦР проводится с использованием электрофореза.

Для типирования антигенов тромбоцитов нами представлена тест-система на основе метода ПЦР в реальном времени [6]. Это позволяет значительно упростить процесс и сократить время исследования [7,8]. В основе ее действия лежит известный процесс детекции продукта ПЦР с использованием зонда типа TaqMan, содержащего на одном конце флуорофор, на другом – гаситель его флуоресценции. Расщепление этого зонда вследствие 5'-нуклеазной активности Taq-полимеразы приводит к разделению флуорофора и гасителя и соответственно флуоресцентному сигналу.

Тест-система для типирования антигенов тромбоцитов на основе этого метода была зарегистрирована в России в декабре 2011 года (ТУ на набор реагентов ТромбоГенТест 9398-007-01966456-2011, рег. уд. ФСР-2011/12472 от 12.12.2011). Система используется в 4-канальном аппарате для ПЦР в реальном времени (детектирующий термоциклер) и приспособлена для работы на аппаратах, зарегистрированных и распространённых в России – АНК-32 (Синтол, Россия), ДТ-96 (ДНК-технология, Россия), Rotor Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) и iCycler iQ5 (Bio-Rad, США).

Основные нормативные положения

1 Методика проведения исследования

1.1 Материалы исследования

Анализ проводится на образцах венозной крови, стабилизированной любым антикоагулянтом, полученной отбором в специальные вакуумные пробирки или иным способом. Возможно использование образцов крови, оставшихся после серологических или биохимических исследований.

Для улучшения результатов рекомендуется центрифугировать пробирку с кровью на гематокритной центрифуге и отбирать для анализа материал в месте белого слоя лейкоцитов, заметного на границе фракций плазмы и клеток крови.

1.2 Реактивы и оборудование

- Аппарат для ПЦР в реальном времени;
- пробирки для ПЦР 0,2 мл (Ахуген, США, кат. № PCR-02D-C);
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объемом со сменяемыми наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,5–10 мкл, 5–40 мкл, 40–200 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (ошибка не более 3%); и подходящие к ним наконечники с фильтрами;
- центрифуга гематокритная;
- микроцентрифуга, развивающая ускорение 12 000 g;
- смеситель вихревой;
- твердотельный термостат типа «Термит» (ДНК-технология, Россия), поддерживающий заданную температуру до 100⁰С;
- пробирки пластиковые вместимостью 500 мкл;
- пробирки пластиковые вместимостью 1500 мкл;
- штативы для пробирок «рабочее место»;
- холодильник бытовой с морозильной камерой, обеспечивающий поддержание температуры –20⁰С;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- перчатки резиновые хирургические.

Исследование антигенов тромбоцитов проводится с использованием набора реагентов для типирования антигенов тромбоцитов человека НРА-1, -2, -3, -4, -5, -15 методом ПЦР в режиме реального времени (ТромбоГенТест).

Состав набора:

1. Комплект для выделения геномной ДНК из цельной крови или лейкося, включающий:

- гемолитик, готов к использованию - 1 флакон (45 мл);

- цитолизин, готов к использованию - 1 флакон (4 мл).

2. Комплект для проведения реакции ПЦР, включающий:

- буфер с ферментом Таq-полимеразой (АБТ) – 4 пробирки по 1150 мкл;

- амплификационный реагент аНР1-15 для типирования а- и b-аллелей генов НРА-1 и НРА-15, готов к использованию, 1 пробирка (530 мкл);

- амплификационный реагент аНР2-5 для типирования а- и b- аллелей генов НРА-2 и НРА-5, готов к использованию, 1 пробирка (530 мкл);

- амплификационный реагент аНР3-4 для типирования а- и b- аллелей генов НРА-3 и НРА-4, готов к использованию, 1 пробирка (530 мкл).

1.3 Подготовка к выполнению исследования

Выделение ДНК из цельной крови или лейкося.

В пластиковые пробирки вместимостью 1500 мкл, пронумерованные по числу проб, внести по 100 мкл цельной крови или лейкося. Добавить в каждую по 400 мкл гемолитика и перемешать на вихревом смесителе, оставить на 3-5 мин. Вследствие осмотического лизиса эритроцитов образуется темно-красный прозрачный раствор.

Центрифугировать 5 мин при 3000 об/мин, отобрать супернатант.

К осадку добавить 500 мкл гемолитика и перемешать на вортке до равномерности.

Центрифугировать 5 мин при 3000 об/мин, отобрать супернатант как можно полное.

Добавить к осадку 70 мкл цитолизина и тщательно суспензировать его пипетированием.

Инкубировать 10 мин при 60⁰С, перемешать встряхиванием и инкубировать еще 15 мин при 95⁰С.

Центрифугировать 5 мин при 13000 об/мин для отделения осадка. Супернатант представляет собой препарат ДНК для генотипирования, допускается его хранение при -20⁰С не менее года и транспортировка в течение 3 суток при температуре не более 25⁰С.

1.4 Проведение исследования

Для каждого из препаратов ДНК подготовить 3 пробирки для ПЦР. В каждую из них внести по 30 мкл реагента АБТ. Добавить в первую пробирку амплификационный реагент аНР1-15, во вторую пробирку - реагент аНР2-5 и в третью пробирку – реагент аНР3-4. Общее число образцов ДНК не может превышать 10 для одной постановки на аппарате АНК-32, имеющем 32 ячейки для пробирок.

В каждую из трёх пробирок с разными амплификационными реагентами внести по 2 мкл анализируемого препарата ДНК.

Программа ПЦР: 95⁰С 5 мин, далее 40 циклов 94⁰С 15 сек, 60⁰С 30 сек с детекцией по четырем флуорофорам, указанным в таблице 1. Она должна быть записана в управляющую программу по инструкции к используемому прибору. Объем реакционной смеси должен быть установлен 50 мкл (кроме АНК-32, где этот объём не выставляется). Запуск программы проводится по инструкции к прибору, в его ходе для Rotor Gene следует выставить уровень сигнала в каналах Green – 6, Yellow – 9, Orange – 10, Red – 10.

Таблица 1 - Сигналы ПЦР типирования НРА в реальном времени на аппарате АНК-32

| Амплификационный реагент | Определяемые генотипы НРА | Сигналы в каналах прибора | | Определяемые генотипы НРА | Сигналы в каналах прибора | |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|-----|---------------------------|---------------------------|-----|
| | | ROX | Су5 | | FAM | R6G |
| Пробирка 1 aHP1-15 | 1aa | - | + | 15aa | + | - |
| | 1bb | + | - | 15bb | - | + |
| | 1ab | + | + | 15ab | + | + |
| Пробирка 2 aHP2-5 | 5aa | - | + | 2aa | - | + |
| | 5bb | + | - | 2bb | + | - |
| | 5ab | + | + | 2ab | + | + |
| Пробирка 3 aHP3-4 | 4aa | - | + | 3aa | - | + |
| | 4bb | + | - | 3bb | + | - |
| | 4ab | + | + | 3ab | + | + |

Примечание – «+» - наличие сигнала флюоресценции, «-» - отсутствие сигнала флюоресценции.

1.5 Обработка результатов

Все сигналы должны иметь характерную S-образную форму с пороговым циклом от 17 до 28. Визуальное сравнение кривых накопления продукта для пар флуорофоров FAM-R6G и ROX-Су5 позволяет однозначно определить a-b формы всех антигенов, и при отсутствии сомнений может быть выдан результат анализа. Как правило, результаты обрабатываются автоматически с помощью соответствующих опций программы как изложено ниже с генерацией отчета, который может быть сохранен как наглядный конечный результат.

1.6 Контроль точности

Искажения характерного S-образного вида сигналов ПЦР в реальном времени, независимо от выданных компьютерной программой результатов, являются основанием для отбраковки результата и перестановки анализа.

1.7 Учет результатов

Управляющие программы всех приборов создают исходный файл результатов, который

должен быть обязательно сохранён. Кроме того, могут быть сохранены обработанные файлы результатов.

1.7.1 Учет результатов на приборе АНК-32

В опции «Настройки-Компенсация» установить матрицу пересчета:

и установить флажок «Включить матрицу в расчет». В двух колонках левее не менять значения по умолчанию, в них не должно быть флажка «Включить в расчет».

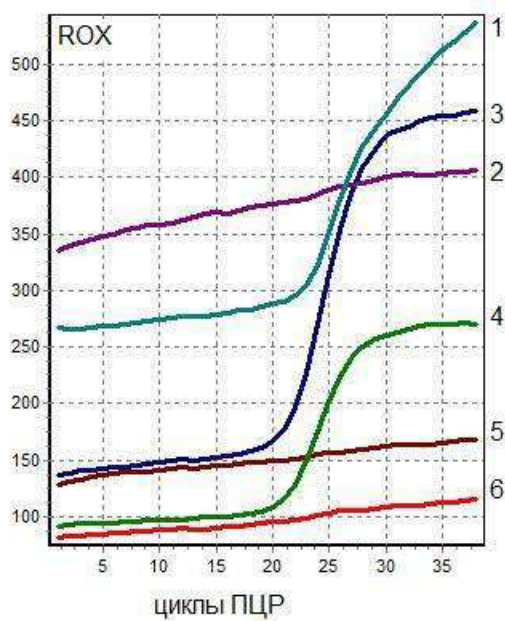
| | | | |
|-----|-----|-----|---|
| 1 | 0.2 | 0 | 0 |
| 0.1 | 1 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 1 | 0 |
| 0 | 0 | 0.1 | 1 |

В опции «Настройки-Расчет» установить «отношение максимум/минимум больше чем» (верхняя строка) 1.200 в каналах 1 и 2, 1.100 в каналах 3 и 4, во 2-й строке ничего не менять (везде 2.100), в 3-й строке «абсолютный рост по амплитуде больше чем» 100 для каналов 1, 2 и 4; 50 для канала 3. Все другие значения оставить по умолчанию.

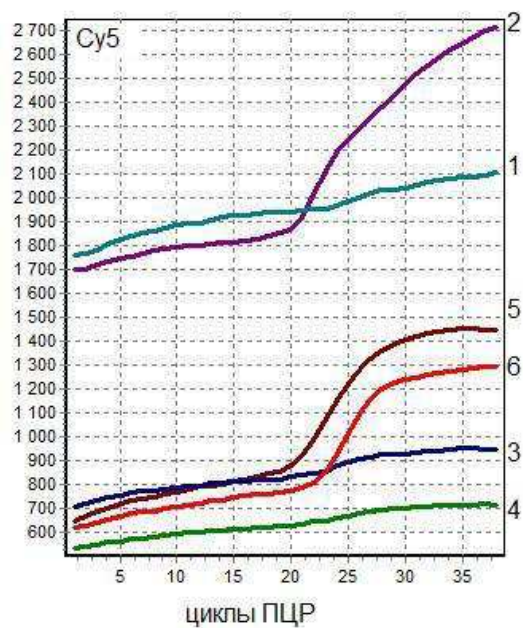
После проведения ПЦР или считывания файла при нажатии кнопки «Расчет» выдается результат.

Примеры сигналов, полученные при типировании образцов ДНК, содержащих разные гены тромбоцитов, приведены на рисунке 1.

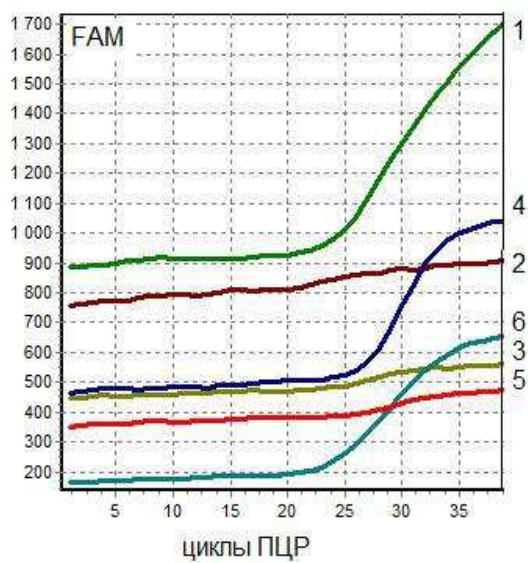
А



Б



В



Г

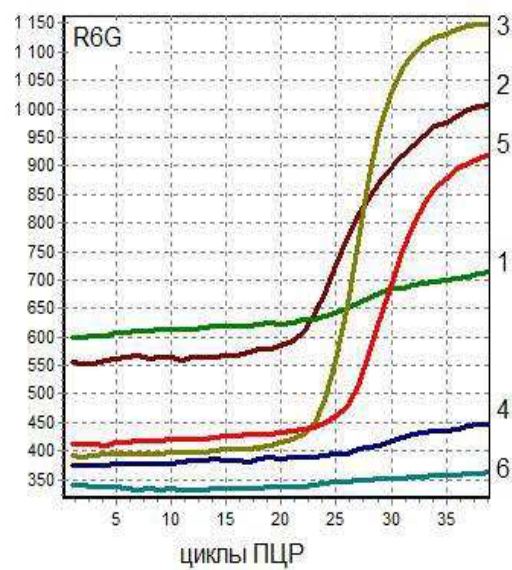


Рисунок 1 - Флуоресцентные сигналы разных генов НРА – кривые накопления продуктов ПЦР в реальном времени.

А-Б – сигналы образцов ДНК в каналах ROX-Cy5: генотип НРА-5 bb - положительный сигнал в канале ROX, отрицательный в канале Cy5 (1); генотип 5aa - отрицательный сигнал в канале ROX, положительный в канале Cy5 (2); генотип 4bb - положительный сигнал в канале ROX, отрицательный в канале Cy5 (3); генотип 1bb - положительный сигнал в канале ROX, отрицательный в канале Cy5 (4); генотип 4aa - отрицательный сигнал в канале ROX, положительный в канале Cy5 (5); генотип 1aa - отрицательный сигнал в канале ROX, положительный в канале Cy5 (6).

В-Г – сигналы образцов ДНК в каналах FAM-R6G: генотип НРА-15aa - положительный сигнал в канале FAM, отрицательный сигнал в канале R6G (1); генотип 15bb - положительный сигнал в канале R6G, отрицательный сигнал в канале FAM (2); генотип 2aa - отрицательный сигнал в канале FAM, положительный сигнал в канале R6G (3); генотип 2bb - положительный сигнал в канале FAM, отрицательный сигнал в канале R6G (4); генотип 3aa - отрицательный сигнал в канале FAM, положительный сигнал в канале R6G (5); генотип 3bb - положительный сигнал в канале FAM, отрицательный сигнал в канале R6G (6).

Наиболее удобным файлом результатов являются копии экрана в виде jpg-файлов. Возможно также сохранение результата в виде текстового файла в формате .txt .

1.7.2 Учет результатов на приборе ДТ-96

Для прочтения результатов на этом приборе следует войти во вкладку «Параметры анализа» и установить там «Критерий положительного результата» (п.1) 70% и нижнюю границу/порог положительного результата (п.3) равную 10% F(Cp) . Другие установки не менять. Нажать “Ok”, далее выбрать «Тип анализа» - «St(Cp) для всех каналов» и «Метод» - «Геометрический (Cp)». Справа при этом появится таблица результатов, в которой при наличии сигнала флуорофора в данной пробирке указана величина порогового цикла, а при отсутствии сигнала ничего не указано.

По полученным данным следует прочитать в соответствии с таблицей 1 результаты для всех антигенов кроме НРА-2. Затем изменить нижнюю границу по п.3 «Параметров анализа» с 10% до 25% и прочитать результаты только по НРА-2, на изменения результатов по другим антигенам внимания не обращать. Результаты могут быть сохранены в виде двух файлов формата .rtf, .pdf, .jpg или .htm для двух разных настроек.

1.7.3 Учет результатов на приборе Rotor Gene 6000

После проведения ПЦР или открытия файла войти в опцию «Анализ» и выбрать вкладку «Генотипирование» (обычно через вкладку «Другие»). В появившемся малом окне выделить (щелкнуть левой кнопкой мыши при нажатой клавише Ctrl) все блоки результатов: Cycling A.Green, Cycling A.Orange, Cycling A.Red, Cycling A.Yellow. Нажать кнопку «Показать». Появляется «пучок» всех кривых ПЦР в реальном времени.

Нажать кнопку «Устранение выбросов» и установить величину «Порог фона (NTS)» равную 10%. Установить порог типирования чуть выше нулевой линии (перетащить мышью или набрать число). Появляется таблица результатов, в которой «Реакция» означает наличие данной формы антигена НРА, а «Нет реакции» - её отсутствие. На записи в колонке «Генотип» внимания не обращать.

Аналогично ДТ-96, для «Порог фона (NTS)» 10% прочитываются в соответствии с таблицей 1 результаты для всех антигенов кроме НРА-2. Затем «Порог фона (NTS)» повышают до 25% и прочитывают результаты только по НРА-2, не обращая внимания на изменения результатов по другим антигенам. Результаты могут быть сохранены в виде двух файлов формата Word для двух разных настроек.

1.7.4 Учет результатов на приборе iCycler iQ5

Для этого аппарата не всегда возможно выставить все необходимые настройки без привлечения представителя фирмы, и потому данные могут быть искажены из-за эффекта «опрокидывания кривых». В этом случае результаты можно оценить только визуально (но вполне однозначно) по исходным кривым в режиме “Background Subtrated”. Если «опрокидывания кривых» нет, то можно провести анализ в опции “PCR Quant” как указано далее.

Через кнопку “Analyse wells” выделить ячейки для одного из трех амплификационных реагентов для дальнейшего анализа одной из пар антигенов (1 и 15, или 2 и 5, или 3 и 4).

Вывести кривые ПЦР для пары флуорофоров FAM-HEX, нажав соответствующие кнопки. Появятся S-образные кривые сигналов и неспецифические кривые около нулевой линии. С помощью мыши поднять линии пределов для каждого из двух флуорофоров выше неспецифических кривых.

Вывести кривые ПЦР как указано выше для пары флуорофоров ROX-Cy5, предварительно отключив FAM и HEX.

Включить все флуорофоры и нажать “Results”. В появившейся под кривыми таблице просмотреть результаты: при наличии сигнала в колонке “Threshold cycle (Ct)

указана величина порогового цикла, при отсутствии – N/A. Обработанный результат может быть сохранен как в виде файла управляющей программы, так и в формате Word.

Выделить через “Analyse wells” ячейки для второго и затем третьего амплификационных реагентов, прочитав и сохранить результат как сказано выше.

Библиография

- [1] Norton, A. Review: Platelet alloantigen and antibodies and their clinical significance/ A. Norton, D. Allen, M. Murphy //Immunohematology. -2004. -20. -Vol. 2. - P.89-102.
- [2] Metcalfe, P. HPA-1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP): a rapid and simple technique/ P. Metcalfe, A.H. Waters // Br. J. Haematol. –1993.- Vol. 85. -P. 227-231.
- [3] Зотиков, Е.А. Тромбоциты и антитромбоцитарные антитела / Е.А. Зотиков, А.Г. Бабаева, Л.Л. Головкина. - М.: Монолит, 2003. – 128с.
- [4] Prenatal management of alloimmune thrombocytopenia of the fetus. International forum // Vox Sang. - 2003.- Vol. 84. -P. 142-149.
- [5] Красняков, В.К. Полиморфизм генов тромбоцитов у доноров крови Санкт-Петербурга /В.К. Красняков, И. Е. Павлова, Л. Н. Бубнова //Вестник Санкт-Петербургского университета. -2009. - Сер.11. - Вып.2. - С.115-119.
- [6] Ёлов, А.А. Типирование антигенов тромбоцитов методом ПЦР в реальном времени: Молекулярная диагностика – 2010 / А.А. Ёлов, В.В. Бурыйлёв., Н.В. Минеева, С.В. Гавровская, В.Н.Чеботкевич // Сб. тр. VII всерос. науч.-практич. конф. с международ. участием. – Т. 3. - С. 60-61.
- [7] Ruan, Li. Multicolor real-time polymerase chain reaction genotyping of six human platelet antigens using displacing probes / L.Ruan, P. Bin, L. Qingge // Transfusion. - 2007.- Vol. 47. - P.1637-1642.
- [8] Минеева Н.В., Ёлов А.А., Бурыйлёв В.В., Гавровская С.В., Чеботкевич В.Н. Типирование антигенов тромбоцитов доноров и пациентов методом ПЦР в реальном времени. WWW.MEDLINE.RU. – 2011. – Т.12. – С. 936-947.

Список исполнителей

Федеральное медико-биологическое агентство

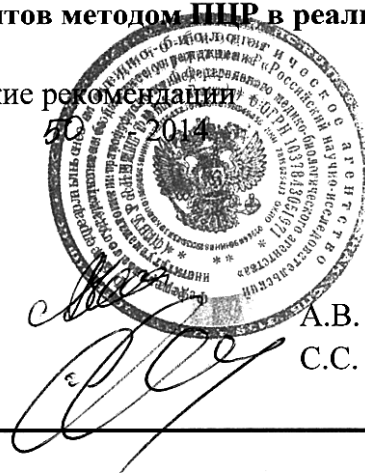
Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии
Федерального медико-биологического агентства России»

Диагностика антигенов тромбоцитов методом ПЦР в реальном времени

Методические рекомендации

Рег.№

50 2014



Директор – д.м.н., профессор
Заместитель директора, д.м.н., профессор

А.В. Чечеткин
С.С. Бессмельцев

Исполнители:

Научный руководитель – руководитель
лаборатории изосерологии,
д.б.н., профессор
н.с., к.б.н.
н.с.
м.н.с.

Н.В. Минеева
И.И. Кробинец
В.В. Бурyleв
С.В. Гавровская