

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ



Заместитель Министра – Главный
государственный санитарный врач
Республики Беларусь

А.А. Тарасенко

« 06 » 2022 г.

Регистрационный № 024-1221

МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ АЛЛЕЛЯ 57:01 ЛОКУСА В ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА
ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ ЧЕЛОВЕКА (HLA В*57:01)

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ - РАЗРАБОТЧИК:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр
эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ:

д-р. биол. наук, доц. Гасич Е.Л., Бунас А.С., Булда К.Ю., Белякова Е.С.,
Гудель А.С.

Минск, 2022

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра – Главный
государственный санитарный врач
Республики Беларусь

_____ А.А. Тарасенко

10.06.2022

Регистрационный № 024-1221

МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ АЛЛЕЛЯ 57:01 ЛОКУСА В ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА
ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ ЧЕЛОВЕКА (HLA B*57:01)

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ - РАЗРАБОТЧИК:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр
эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ:

д-р. биол. наук, доц. Гасич Е.Л., Бунас А.С., Булда К.Ю., Белякова Е.С.,
Гудель А.С.

Минск, 2021

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод выявления аллеля 57:01 локуса В главного комплекса гистосовместимости человека (HLA В*57:01) в клиническом материале.

У пациентов с носительством аллеля HLA В*57:01 высок риск развития реакции гиперчувствительности на фоне приема абакавира – нуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы ВИЧ-1, применяющегося в схемах АРВТ. Повышенный риск развития данной реакции не зависит от гомо- или гетерозиготного состояния аллеля и проявляется в любом случае.

Инструкция предназначена для врачей-вирусологов и иных специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с ВИЧ-инфекцией.

1. ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Для оказания комплекса медицинских услуг, направленных на диагностику ВИЧ-инфекции (МКБ10 – В20).

2. ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Отсутствуют.

3. ПЕРЕЧЕНЬ ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ, РЕАКТИВОВ, РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Изделия медицинской техники:

термоциклер для проведения ПЦР;

центрифуга для микропробирок;

центрифуга с охлаждением для микропробирок на 14000 об/мин;

ламинарные боксы;

аппарат для горизонтального электрофореза в агарозном геле с источником питания;

гельдокументирующая система;

дозаторы механические переменного объема, комплект (от 0,1 до 10 мкл, от 20 до 200 мкл, от 100 до 1000 мкл);
вортекс;
твердотельный термостат;
холодильник с морозильной камерой (от +4⁰С до +8⁰С, от минус 18⁰С до минус 20⁰С);
бактерицидная лампа.

Изделия медицинского назначения:

пробирки стерильные пластиковые типа «Эппендорф» (1,5 мл);
микропробирки для проведения ПЦР (0,2 мл), стерильные, свободные от нуклеаз;
вакутайнеры с ЭДТА для забора крови;
наконечники полимерные для дозаторов пипеточных с фильтром, стерильные, свободные от нуклеаз;
набор реагентов для выделения РНК;
реагенты для проведения ПЦР (5 ед/мкл Taq полимераза; 10х для полимеразы, хлорид магния 25 мМ, смесь дНТФ 2 мМ, олигонуклеотидные праймеры 10мМ, вода стерильная, свободная от нуклеаз);
реагенты для проведения электрофоретической детекции (агароза для электрофореза, маркер молекулярного веса 50-1500 п.о., ТАЕ-буфер, бромистый этидий);
штативы для пробирок;
халаты, перчатки резиновые;

Качество используемых реагентов должно соответствовать техническим требованиям, предъявляемым к реагентам для проведения молекулярно-генетических исследований.

4. ТЕХНОЛОГИЯ МЕТОДА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АЛЛЕЛЯ 57:01 ЛОКУСА В ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ ЧЕЛОВЕКА (HLA B*57:01)

Этап 1. Получение, транспортировка и хранение биологического материала.

Взятие периферической венозной крови производят натошак или через 3 часа после приема пищи из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8-1,1 мм) в специальную вакуумную систему типа Vacutainer (6% ЭДТА). Условия хранения материала: образцы цельной крови: при температуре от 20°C до 25°C хранятся в течение 6 часов с момента получения материала; при температуре от 2°C до 8°C – не более одних суток. Замораживание образцов цельной крови не допускается.

Плазму крови получают путем центрифугирования пробирки с цельной кровью в течение 10-20 минут при 3000 об/мин., после чего плазму отбирают наконечниками (на 1 мл) с аэрозольным барьером и переносят в пробирки типа «эппендорф». Допускается однократное замораживание-оттаивание материала. Образцы плазмы крови хранятся в течение 5 суток при температуре от 2°C до 8°C или при температуре от (-16°C) до (-20°C) – в течение года.

Забор крови и ее транспортировка производят в соответствии с СанПиН «Требования безопасности при осуществлении работ с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению их учета, хранения, передачи и транспортировки», утверждёнными постановлением Министерства Здравоохранения Республики Беларусь 6 января 2017 г., № 2.

Этап 2. Молекулярно-генетические исследования с целью выявления аллеля 57:01 локуса В главного комплекса гистосовместимости человека (HLA B*57:01).

1. Экстракция ДНК человека из лейкоцитарного кольца

Выделение ДНК человека из лейкоцитарного кольца проводят в соответствии с инструкцией коммерческой тест-системы, предназначенной для

выделения нуклеиновых кислот из клинического материала.

2. Выявление полиморфизма (гомозиготы/гетерозиготы) аллеля *HLA-B*57:01*.

Для получения комплементарной ДНК и накопления ДНК-продукта гена аллеля HLA-B*57:01, используют специфические праймеры, представленные в таблице 1.

Таблица 1 – Схема праймеров для генотипирования аллеля HLA-B*57:01

№ п/п	Последовательности
Праймеры первого раунда ПЦР	
1. HLA57 F	5'–GTCTCACATCATCCAGGT–3'
2. HLA57 R	5'–CGTCTCCTTCCCGTTCTC–3'
3. INT F	5'–GCAGAAGGGCGCATTATAGC–3' (Внутренний контроль LOXL – 1)
4. INT R	5'– CATGTGAGTACACTCAGCTTG–3' (Внутренний контроль LOXL – 1)
Праймеры второго раунда ПЦР	
5. HLA5701F	5'– GTCTCACATCATCCAGGT –3'
6. HLA5701R1	5'– ATCCTTGCCGTCGTAGGCGG –3'
7. HLA5701R2	5'– ATCCTTGCCGTCGTAGGCAG –3'

Для амплификации фрагмента аллеля HLA-B*57 проводят «гнездовую» ПЦР.

1 раунд ПЦР.

Состав ПЦР-смеси: 10х ПЦР-буфер, 2 мМ дНТФ, 15мМ праймеры HLA57F и HLA57R, 15мМ праймеры внутреннего контроля INT-F и INT-R, 25 мМ MgCl₂, 5 ед/мкл Taq-полимераза, вода для ПЦР.

Используют следующие временные и температурные режимы:

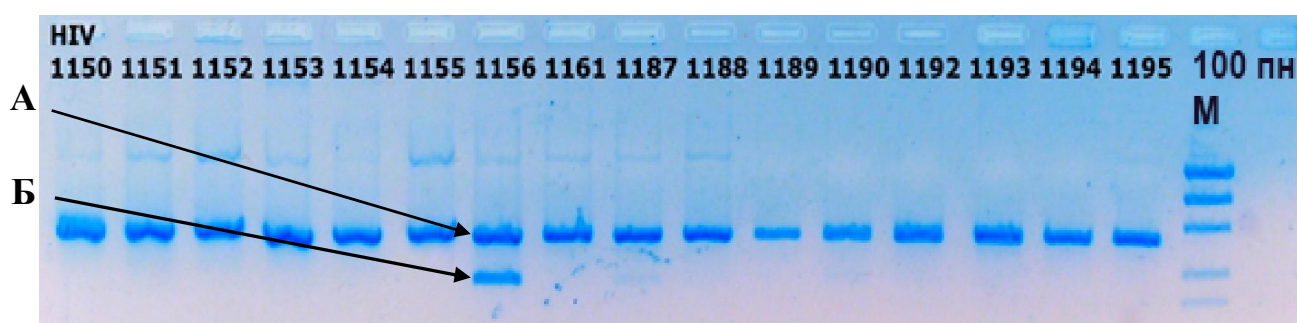
Этап	Температура	Время	32 цикла
Начальная денатурация	95□	4 минуты	
Денатурация	95□	30 секунд	
Отжиг праймеров	60□	30 секунд	
Элонгация	72□	1 минута	
Финальная элонгация	72□	5 минут	

После первого раунда ПЦР по причине низкого процента встречаемости аллеля HLA-B*57 проводят электрофоретическую детекцию продуктов ПЦР в следующих условиях: 2,0% агарозный гель, 20 минут, маркер молекулярного веса 100 пар нуклеотидов.

Интерпретация результатов первого раунда ПЦР

Положительный результат тестирования будет получен в случае наличия аллеля HLA-B*57:01 как в гомозиготном, так и в гетерозиготном состоянии; таким образом, в обоих случаях будет повышен риск возникновения реакция гиперчувствительности к абакавиру.

Образцы, в которых обнаружен один продукт ПЦР размером 444 пары нуклеотидов (внутренний контроль, фрагмент LOXL-1) считают отрицательными. Положительными считают образцы, в которых обнаружено два продукта ПЦР размерами 444 и 262 пары нуклеотидов (внутренний контроль, фрагмент LOXL-1, и фрагмент HLA-B*57:01 соответственно). Пример электрофоретической детекции изображен на рисунке 1.



А – фрагмент LOXL-1 размером 444 bp;

Б – фрагмент HLA-B*57:01 размером 262 bp

Рисунок 1 – Электрофоретическая детекция 1 раунда ПЦР. В образце HIV_1156 обнаружена аллель HLA-B*57:01, такой образец считается положительным.

В случае обнаружения аллеля HLA-B*57:01 проводят второй раунд ПЦР с целью определения наличия аллеля HLA-B*57:01:01

2 раунд ПЦР.

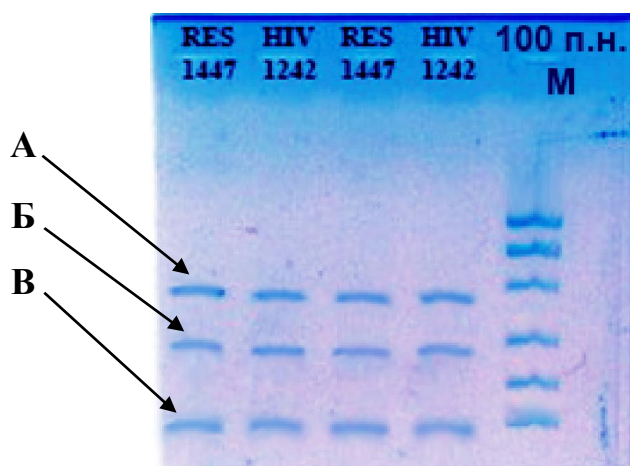
Состав ПЦР-смеси: 10x ПЦР-буфер, 2 mM дНТФ, 15mM праймеры: HLA5701F, HLA5701R1, HLA5701R2 25 mM MgCl₂, 5 ед/мкл Taq-полимераза,

вода для ПЦР.

Используют следующие временные и температурные режимы:

Этап	Температура	Время	30 циклов
Начальная денатурация	95□	5 минут	
Денатурация	95□	30 секунд	
Отжиг праймеров	60□	1 минута	
Элонгация	72□	1 минута	
Финальная элонгация	72□	10 минут	

После второго раунда ПЦР также проводят электрофоретическая детекция с использованием тех же параметров (2,0% агарозный гель, 20 минут, маркер молекулярного веса 100 bp). Пример детекции изображен на рисунке 2.



А – фрагмент LOXL-1 размером 444 bp; Б – фрагмент HLA-B*57:01 размером 262 bp; В – фрагмент HLA-B*57:01:01 размер 94 bp

Рисунок 2 – Электрофоретическая детекция 2 раунда ПЦР

Интерпретация результатов второго раунда ПЦР

Положительным считают образец, при электрофоретической детекции которых было обнаружено три продукта ПЦР размерами 444, 262 и 94 пары нуклеотидов.

Обнаружение аллеля HLA-B*57:01:01 свидетельствует о высокой вероятности наличия у пациента реакций гиперчувствительности к абакавиру.

3. Заключение

Результаты молекулярно-генетических исследований полиморфизма аллеля 57:01 локуса В главного комплекса гистосовместимости человека (HLA B*57:01) позволяют персонифицировать и оптимизировать схемы лечения ВИЧ-инфекции, избегая возникновения реакций гиперчувствительности, связанных с абакавиром, включая опасные для жизни кожные заболевания, синдром Стивенса-Джонсона и токсико-эпидермальный некролиз.

4. Перечень возможных ошибок, ограничений и пути их устранения

Проблемы и методические ошибки, которые могут возникать при выполнении метода с описанием причин возникновения и путей их устранения представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Возможные ошибки или осложнения при выполнении метода и пути их устранения

Проблема	Возможная причина	Пути устранения
Отсутствие ПЦР-продуктов при электрофоретической детекции	Дегградация ДНК и/или низкое содержание исходной ДНК	Использовать только свежие образцы биологического материала для выделения ДНК.
	Дегградация ДНК	Использовать пробы ДНК сразу после выделения.
	Погрешности в проведении реакции амплификации	Контроль качества реагентов путём использования в реакции контрольных образцов.
Наличие ПЦР-продукта с молекулярным весом, отличным от указанного в инструкции	Частичная дегградация ДНК	Использовать пробы ДНК сразу после выделения.

