

Иммуногенетическое обеспечение трансплантации солидных органов

Рекомендации.

Авторы: О.Я. Волкова, М.Г. Вершинина, А.П. Полякова, Л.Н. Бубнова, И.Е.Павлова, Н.В. Боровкова, О.В. Гулидова, Н.Г. Дмитриева, М.Н. Болдырева.

Рекомендации включают в себя основные правила проведения исследований для лабораторий трансплантационной диагностики и иммуногенетики, осуществляющих HLA-типирование, определение антител к антигенам главного комплекса гистосовместимости, а также оценку перекрестной совместимости доноров и реципиентов при трансплантации солидных органов.

Содержание:

Список сокращений	3
1. Введение.	4
2. Требования к лабораториям, выполняющим иммуногенетическое обследование доноров и реципиентов при трансплантации органов.	5
3. Преаналитический этап иммуногенетических исследований.	7
4. HLA-типирование реципиентов и доноров перед трансплантацией органов	8
5. Определение антител к HLA.	12
6. Перекрестная проба на совместимость (cross-match).	13
7. Протокол обследования реципиентов перед трансплантацией.	16
8. Критерии потенциального соответствия донора.	17
9. Посттрансплантационный мониторинг.	18
10. Заключение.	19
11. Библиография.	20
12. Приложения.	21

Список сокращений

ЛПУ – лечебно-профилактическое учреждение
ЭДТА – этилендиаминтетраацетат (соль этилендиаминтетрауксусной кислоты)
СОП – стандартная операционная процедура
ЛИС – лабораторная информационная система
ПЦР – полимеразная цепная реакция
HLA – система лейкоцитарных антигенов человека
CDC - комплемент-зависимая цитотоксичность
SSO - сиквенс-специфические олигонуклеотиды
SSP - сиквенс-специфические праймеры
RT – реальное время
SBT – типирование методом секвенирования
NGS – секвенирование нового поколения
PRA – панель-реактивные антигены
MFI – усредненный индекс флуоресценции

1. ВВЕДЕНИЕ

Трансплантация стала достаточно широко распространенным методом лечения заболеваний, связанных с утратой функций жизненно важных органов. Успешное приживление трансплантата во многом зависит от совместимости донора и реципиента по антигенам главного комплекса гистосовместимости человека – системы HLA (*от англ. Human Leukocyte Antigens* – человеческие лейкоцитарные антигены (см. Приложение № 1)). Эти антигены играют ключевую роль в иммунном ответе организма, участвуя непосредственно в процессе представления чужеродного антигена эффекторному звену иммунитета.

Различия между антигенами системы HLA донора и реципиента при трансплантации приводит к тому, что иммунная система пациента распознает «чужую ткань» и отторгнет пересаженный орган. Хотя несоответствия по системе HLA провоцируют мощный иммунный ответ, существует ряд других антигенов, способных вызвать клинически значимую иммунную реакцию.

После переливания крови, беременности или неудавшейся трансплантации у пациентов могут вырабатываться антитела к HLA. Кроме того, на сегодняшний день признано, что у некоторых пациентов имеются «естественные» антитела к HLA, а также антитела к HLA, индуцированные инфекцией. Трансплантация органа, несущего антигены, к которым у реципиента имеются активные циркулирующие антитела, может привести к развитию сверхострого или острого отторжения и утрате этого органа.

Отторжение трансплантата происходит в том случае, когда иммунная система реципиента атакует пересаженный орган. Это обусловлено основной функцией иммунной системы, направленной на элиминацию из организма чужеродного генетического материала. Иммунный ответ во время отторжения опосредован Т-лимфоцитами и гуморальными иммунными механизмами (продукция антител).

Принято выделять три вида реакции отторжения в зависимости от скорости его развития: сверхострое, острое отторжение и хроническая дисфункция трансплантата (или хроническая нефропатия трансплантата в случае трансплантации почки). Острое отторжение в свою очередь подразделяют на острое гуморальное и острое клеточное.

Настоящие рекомендации обобщают требования к анализу на иммунологическую и генетическую совместимость доноров и реципиентов при аллогенной трансплантации органов, основные положения о проведении иммуногенетического типирования по системе HLA, скринингу и идентификации предсуществующих антител к HLA у реципиента, а также к выполнению перекрестных проб на совместимость для исключения возможности получения реципиентом несовместимого органа и развития отторжения в посттрансплантационном периоде.

2. ТРЕБОВАНИЯ К ЛАБОРАТОРИЯМ, ВЫПОЛНЯЮЩИМ ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОБСЛЕДОВАНИЕ РЕЦИПИЕНТОВ И ДОНОРОВ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ОРГАНОВ

Лаборатория, выполняющая иммуногенетическое обследование реципиентов и доноров при трансплантации солидных органов, должна отвечать требованиям национальных стандартов, методических указаний и иных нормативных документов, применимых для клинических лабораторий и лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот. Вся документация, содержащая информацию с результатами выполненных в лаборатории тестов должна храниться в конфиденциальном режиме.

2.1. Требования к помещениям и оборудованию.

2.1.1. Лаборатория должна иметь достаточный набор оборудованных рабочих помещений, в соответствии с задачами и объемом выполняемых работ. (см Приложение № 5)

2.1.2. Организация работ в лаборатории должна отвечать принципу поточности лабораторных исследований (см. Приложение № 6).

2.1.3. Перечень необходимого оборудования определяется задачами, методами работы и объемом исследований, выполняемых лабораторией (см. Приложение № 7,8)

2.1.4. Оборудование, подлежащее проверке, используемое в лаборатории, должно проходить регулярные проверки (не реже 1 раз в год) и техническое обслуживание (периодичность определяется производителем оборудования, но не реже 1 раза в год). Результаты проверки и технического обслуживания оборудования должны регистрироваться в журнале «Проверки и технического обслуживания оборудования».

2.2. Требования к персоналу.

2.2.1. Заведующий лабораторией. На должность заведующего лабораторией назначается специалист с высшим медицинским, либо иным образованием, имеющий сертификат специалиста и стаж практической работы в лаборатории по профилю иммуногенетических исследований не менее 5 лет.

2.2.2. Врач лаборатории. На должность врача назначается специалист с высшим медицинским образованием, имеющий сертификат специалиста по специальности. «Клиническая лабораторная диагностика», «Лабораторная генетика», «Иммунология и аллергология» и др., имеющий подготовку по профилю иммуногенетических исследований.

2.2.3. Биолог. На должность биолога может быть назначен специалист с высшим профессиональным образованием (академическая квалификация: магистр или специалист) по специальности «Биология», «Биохимия», «Биофизика», «Генетика», «Микробиология», «Фармация», прошедший профессиональную подготовку по специальности «Клиническая лабораторная диагностика» и имеющий подготовку по профилю иммуногенетических исследований.

2.2.4. Средний медицинский персонал. В качестве среднего медицинского персонала в лаборатории может работать специалист, имеющий среднее медицинское образование и сертификат специалиста по специальности «Лабораторная диагностика».

2.2.5. Все сотрудники лаборатории должны непрерывно повышать свой профессиональный уровень в соответствии с требованиями, предъявляемыми к специалистам с высшим и средним медицинским и немедицинским образованием.

2.3. Требования к реагентам.

2.3.1. Все реагенты должны быть промаркированы и храниться в условиях, рекомендованных производителем.

2.3.2. При необходимости на реактивах должна быть указана концентрация, титр, либо другая специфическая информация.

2.3.3. На реактивах, требующих разведения до рабочей концентрации, необходимо указывать дату приготовления рабочего раствора.

2.3.4. Для исключения контаминации реактивов они должны храниться отдельно от исследуемых образцов биологического материала.

2.4. Контроль качества лабораторных исследований.

2.4.1. В лаборатории должен проводиться постоянный контроль качества лабораторных исследований.

2.4.2. Для проведения иммуногенетических исследований в лаборатории должны использоваться качественные реагенты:

2.4.2.1 Использование реактивов с истекшим сроком годности, либо хранившихся в ненадлежащих условиях не допускается.

2.4.2.2. Перед началом использования новой серии реагентов должно проводиться сравнение ее функциональной активности и диагностической чувствительности с ранее используемой серией путем параллельного тестирования известного образца.

2.4.2.3. Результаты проверки новых серий реагентов и выявленные ошибки должны быть документированы в журнале «Проверка новых серий реагентов».

2.4.3. Выполнение всех диагностических методик и манипуляций должно быть детально отражено в стандартных операционных процедурах (СОП):

2.4.3.1. Стандартные операционные процедуры разрабатываются старшим медицинским и/или немедицинским персоналом, непосредственно выполняющим диагностическую методику, и утверждаются заведующим (директором) лабораторией.

2.4.3.2. Обновление СОП выполняется не реже 1 раза в 2 года.

2.4.3.3. В случае внесения каких-либо изменений в диагностические методики, они должны быть записаны в СОП и утверждены заведующим (директором) лабораторией.

2.4.3.4. СОП должны быть доступны на рабочих местах и использоваться для непосредственного выполнения диагностических методик.

2.4.4. В лаборатории должен проводиться внутрилабораторный контроль качества лабораторных исследований:

2.4.4.1. Внутрилабораторный контроль качества проводится по всем диагностическим методикам, используемым в лаборатории.

2.4.4.2. Для внутрилабораторного контроля качества используются образцы биологического материала с известными иммуногенетическими характеристиками.

2.4.4.3. В проведении внутрилабораторного контроля качества участвуют все сотрудники лаборатории. Контроль выполнения и анализ результатов внутрилабораторного контроля качества осуществляет заведующий (директор) лабораторией, либо иное доверенное лицо.

2.4.4.4. Результаты внутрилабораторного контроля качества регистрируются в соответствующем журнале.

2.4.5. Лаборатория, выполняющая иммуногенетическое обследование доноров и реципиентов солидных органов, должна участвовать во внешнем (национальном и/или международном) контроле качества лабораторных исследований:

2.4.5.1. Внешний контроль качества проводится по всем диагностическим методикам, используемым в лаборатории.

2.4.5.2. Исследуемые образцы для внешнего контроля качества предоставляются лабораторией-организатором внешнего контроля качества.

2.4.5.3. В проведении внешнего контроля качества участвуют все сотрудники лаборатории. Контроль выполнения и анализ результатов внешнего контроля качества осуществляет заведующий лабораторией, либо иное доверенное лицо.

2.4.5.4. Результаты внешнего контроля качества регистрируются в соответствующем журнале.

2.4.6. В лабораториях, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, должен проводиться контроль контаминации (Wipe-test):

2.4.6.1. Рутинный Wipe-test должен охватывать зону пре-амплификации и находящееся в ней лабораторное оборудование. Другие рабочие зоны могут быть обследованы при необходимости.

2.4.6.2. Контроль контаминации проводится каждые 2 месяца.

2.4.6.3. Для выполнения Wipe-test используются методы, не менее чувствительные, чем рутинно применяемые в лаборатории.

2.4.6.4. Wipe-test должен включать положительный контроль и контроль содержания ингибиторов.

2.4.6.5. Результаты контроля контаминации и проводимые деконтаминационные мероприятия регистрируются в соответствующем журнале.

3. ПРЕАНАЛИТИЧЕСКИЙ ЭТАП ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ.

Преаналитический этап состоит из внелабораторной и лабораторной составляющей. Подробное изложение требований внелабораторного и внутрилабораторного преаналитического этапа приведено в Приложении №3.

3.1 Внелабораторный преаналитический этап

Внелабораторный преаналитический этап включает:

- Назначение исследования лечащим (дежурным) врачом.
- Составление заявки на лабораторное исследование и оформление бланка-направления для пациентов.
- Подготовку пациента к исследованию.
- Идентификацию пациента.
- Процедуру взятия и маркировки образца крови для исследования;
- Хранение материала в отделении и его доставка в лабораторию.

3.2 Внутрिलाбораторный преаналитический этап.

Внутрिलाбораторный преаналитический этап состоит из процедур:

- Регистрация и маркировка доставленного в лабораторию образца крови
- Пробоподготовка образца крови к исследованиям (центрифугирование, аликвотирование и маркировка, доставка биоматериала на рабочие места)
- Хранение пробирки с биоматериалом.

4. HLA-ТИПИРОВАНИЕ РЕЦИПИЕНТОВ И ДОНОРОВ ПЕРЕД ТРАНСПЛАНТАЦИЕЙ ОРГАНОВ.

HLA-типирование – метод определения антигенов (генов) главного комплекса тканевой совместимости пациента. Объем иммуногенетического обследования реципиента и донора определяется трансплантационным протоколом ЛПУ. Минимальный объем исследований включает в себя:

1. Для реципиента в «листе ожидания» трансплантации органов:
 - a. HLA-типирование на уровне базового (низкого) разрешения любым доступным в лаборатории методом. Исследование генов HLA I класса (HLA-A и HLA-B) может выполняться молекулярно-генетическим, либо серологическим методом, исследование генов HLA II класса (HLA-DRB1) – молекулярно-генетическим методом.
2. Для донора органов:
 - a. HLA-типирование на уровне базового (низкого) разрешения. Исследование генов HLA I класса (HLA-A и HLA-B) может выполняться молекулярно-генетическим, либо серологическим методом, исследование генов HLA II класса (HLA-DRB1 и HLA-DQB1) – молекулярно-генетическим методом.

*Для иммуногенетического обследования реципиентов и доноров органов используют коммерчески доступное оборудование и наборы реагентов зарегистрированных и разрешенных к применению на территории РФ

4.1 Серологическое HLA-типирование по реакции комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC)

Серологическое HLA-типирование – метод комплемент зависимой цитотоксичности. В основе метода лежит способность специфичного распознавания сывороточными HLA-антителами соответствующих HLA-антигенов на клеточной поверхности. В присутствии комплемента образовавшийся комплекс запускает реакцию клеточного лизиса. Результаты реакции детектируются визуально, при помощи фазово-контрастной или люминесцентной микроскопии с применением соответствующих красителей.

Основные характеристики метода:

- Типируемые HLA-локусы – HLA-A,B,C
- Разрешение метода – низкое (на уровне аллеля)
- Материал для анализа – лимфоциты выделенные из свежей крови

Основные ограничения метода

- Метод не пригоден для типирования по HLA класса II (DR, DQ)
- Невозможно проводить документирование и архивацию результатов типирования
- Низкая чувствительность, специфичность и воспроизводимость метода
- Метод не подлежит автоматизации
- Сложность транспортировки и хранения серологических панелей (поставляются и хранятся только в замороженном виде при температуре минус 50–70 °С)
- Ограниченная возможность для участия лаборатории в межлабораторном контроле качества, так как нет возможности типировать замороженные контрольные образцы крови

4.2 Молекулярно-генетическое ПЦП-SSP HLA-типирование

ПЦП-SSP (sequence specific primers) – метод основан на использовании аллель- и группоспецифичных праймеров, комплементарных специфическим участкам исследуемой ДНК. В случае совпадения нуклеотидной последовательностей праймеров и специфических участков ДНК пациента происходит их отжиг. В присутствии фермента Taq-полимеразы запускается амплификация (многократное увеличение количества копий ДНК). Амплифицированные продукты ДНК визуализируют с помощью электрофореза в агарозном геле.

Основные характеристики метода:

- Типируемые HLA-локусы – HLA-A,B,C,DR,DQ (и другие)
- Разрешение метода – низкое и высокое (на уровне аллеля и аминокислотной последовательности белка)
- Материал для анализа – ДНК выделенная из свежей и замороженной крови

Основные ограничения метода

- Низкая пропускная способность

- Невозможность регистрировать новые варианты аллельных полиморфизмов

4.3 Молекулярно-генетическое SSO HLA-типирование

ПЦР-SSO (sequence specific oligonucleotides). Метод основан на использовании специфических олигонуклеотидных зондов. На первом этапе SSO-анализа амплификации подвергается весь HLA локус. Затем полученные ампликоны денатурируют до одноцепочечных фрагментов ДНК, которые добавляют к микросферам или микрочипам, содержащим специфические SSO-зонды. Комплементарные последовательности ампликонов гибридизуются с соответствующими зондами. Комплекс ампликон-зонд затем визуализируют с помощью колориметрической реакции или флуоресценции.

Основные характеристики метода:

- Типируемые HLA-локусы – HLA-A,B,C,DR,DQ (и другие)
- Разрешение метода – низкое и среднее.
- Материал для анализа – ДНК выделенная из свежей и замороженной крови, слюны, букальных соскобов.

Основные ограничения метода

- Неоднозначности при анализе результатов на высоком разрешении (на уровне аминокислотной последовательности)
- Невозможность регистрировать новые варианты аллельных полиморфизмов

Основные преимущества метода

- Высокая производительность и скорость получения результата
- Низкая себестоимость
- Продвинутое возможности для анализа и архивации данных

4.4 Молекулярно-генетическое ПЦР-RT(real-time) HLA- типирование.

ПЦР-RT (real-time) – в основе метод SSP (sequence specific primers). Дополнительно в реакционную смесь добавлен искусственно синтезированный олигонуклеотидный зонд, меченный флюоресцентным красителем и комплементарный амплифицируемому участку ДНК. В процессе реакции амплификации зонд с красителем разрушается taq-полимеразой, в результате чего флюоресцентный краситель переходит в активное состояние, а флюоресцентный сигнал автоматически регистрируется специализированным прибором, в котором проходит реакция амплификации. Каждый цикл положительной реакции амплификации сопровождается пропорциональным увеличением флюоресцентного сигнала.

Основные характеристики метода:

- Типируемые HLA-локусы – HLA-A,B,C,DR,DQ (и другие)
- Разрешение метода – низкое и среднее (на уровне групп аллелей и некоторых отдельных аллелей)
- Материал для анализа – ДНК, выделенная из свежей и замороженной крови

Основные ограничения метода:

Возможность одновременного типирования ограниченного количества образцов

Основные преимущества метода:

Возможность быстрого получения результата. Автоматическая обработка результата типирования, возможность автоматической передачи данных в ЛИС, возможность автоматизации. Низкий риск контаминации

4.5 Молекулярно-генетическое ПЦП-SBT (sequence based technologies) HLA- типирование.

ПЦП-SBT (sequence based technologies) – метод HLA-типирования на основе реакции секвенирования по Сэнгеру. На первом этапе проводится HLA полокусная амплификация. Продукты амплификации подвергаются очистке, после чего проводится секвенирующая ПЦП, в результате которой амплификации подвергаются целевые экзоны отдельного HLA локуса. Продукты реакции после повторной очистки подвергаются разгонке методом капиллярного электрофореза. Полученные данные интерпретируются программным обеспечением.

Основные характеристики метода:

- Типируемые HLA-локусы – HLA-A,B,C,DR,DQ,DP (и другие)
- Разрешение метода – высокое (на уровне аминокислотной последовательности).
- Материал для анализа – ДНК выделенная из свежей и замороженной крови, слюны, букальных соскобов, тканей.

Основные ограничения метода

- Невысокая производительность
- Высокая стоимость
- Длительность процедуры (более суток)

Основные преимущества метода

- Референсный метод определения первичной последовательности ДНК

4.6 Молекулярно-генетическое ПЦП-NGS (new generation sequences) HLA- типирование.

ПЦП-NGS (new generation sequences) – метод HLA-типирования на основе реакции секвенирования нового поколения. На первом этапе проводится HLA полокусная или мультиплексная амплификация. Из полученных ампликонов готовится библиотека ДНК. В ходе процедуры приготовления библиотеки ампликоны подвергаются фрагментации, отбору оптимальных по длине фрагментов, индексированию, и пулированию. Готовая библиотека загружается в NGS секвенатор. Полученные данные интерпретируются программным обеспечением.

Основные характеристики метода:

- Типируемые HLA-локусы – HLA-A,B,C,DR,DQ,DP,G (и другие)
- Разрешение метода – высокое (на уровне экзонного и интронного полиморфизма).
- Материал для анализа – ДНК выделенная из свежей и замороженной крови, слюны, букальных соскобов, тканей.

Основные ограничения метода

- Длительность процедуры (более суток)

Основные преимущества метода

- Референсный метод определения первичной последовательности ДНК
- Очень высокая производительность
- Низкая себестоимость
- Гибкость загрузки образцов

5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИТЕЛ К HLA

Всем пациентам, которым планируется трансплантация солидного органа, проводится определение антител к HLA с помощью скрининговых методик и профиля антител, при их наличии. Периодичность исследования антител определяется протоколом обследования кандидатов на трансплантацию солидного органа, принятого в трансплантационном центре, но не реже 1 раза в 3 месяца для пациентов, находящихся в «листе ожидания». Для сенсibilизированных пациентов из «листа ожидания», а также для пациентов перенесших гемотрансфузию, мониторинг антител к HLA проводится чаще.

5.1. Определение антител к HLA – скрининг

Первичное обследование реципиентов на антитела к HLA включает в себя два этапа. На первом этапе при помощи коммерчески доступных наборов в формате ИФА или Lumiplex выявляется наличие или отсутствие антител к HLA I и II класса.

В случае положительного результата скрининга по одному или по обоим классам HLA-антител проводится тест на их идентификацию (см. Приложение №4).

5.2. Тестирование методом единичных антигенов с помощью Lumiplex (идентификация антител)

Этот метод применяют для сенсibilизированных реципиентов, а также при повторной трансплантации органа. В этом случае важно выявить наиболее реактивные антитела, а также определить наличие возможных антигенов, к которым у реципиента не выработались антитела к HLA, с целью подбора соответствующих HLA-генотипов донора.

Метод единичных антигенов (Luminex Single) основан на использовании микросфер, покрытых очищенными рекомбинантными HLA-антигенами для определения

антител. В одной суспензии для единичного теста можно комбинировать до 100 различных флуоресцентно-меченных микросфер (до 100 различных HLA-антигенов по каждому классу).

По результатам этого теста для каждого сенсibilизированного (положительного по результатам теста) реципиента прописывается карта недопустимых донорских антигенов HLA по классу I (локусы HLA-A, B, C) и по классу II (локусы HLA-DR, DQ) для проведения виртуального кросс-матча, а также рассчитывается индекс PRA (%) (панель-реактивных антител в процентах).

Физический смысл индекса PRA (%) состоит в том, что он показывает, какой процент потенциальных доноров будет иметь с данным реципиентом положительную реакцию в прямой перекрестной пробе (cross-match). Это позволяет прогнозировать вероятность и скорость подбора донора для каждого реципиента.

Индекс PRA (%), как правило, рассчитывается автоматически программным обеспечением, прилагаемым к коммерчески доступным наборам реагентов ИФА или Lumineх. Расчёт PRA (%) базируется на том, к каким HLA-антигенам выработаны антитела у реципиента и какова популяционная частота встречаемости каждого антигена.

При создании списка потенциальных реципиентов будет отклонен любой потенциальный реципиент, у которого имеются антитела к антигенам HLA пересаживаемого органа (совпадение с HLA-генотипом донора). Информационная карта профиля HLA-антител реципиента минимизирует время холодовой ишемии, а также снижает вероятность разочарования пациента при вызове для трансплантации и последующем отклонении в связи с положительной пробой на перекрестную совместимость (cross-match).

Для устранения разночтений в результатах анализа (если необходимо) могут быть использованы дополнительные методы, например, твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) и скрининг методом комплемент-зависимой цитотоксичности (ЛЦТ).

Комментарий:

Комплемент-зависимый скрининг (ЛЦТ) с помощью планшетов Терасаки выявляет только комплементфиксирующие антитела. Наличие этих антител приводит к сверхострому отторжению, если антитела направлены против антигенов донора. Однако в комплемент-зависимой цитотоксичности могут участвовать различные антитела не-HLA специфичности, приводя к ложноположительным результатам.

Методики ИФА и Lumineх более чувствительны и позволяют выявить комплементсвязывающие и не связывающие комплемент HLA-антитела. В настоящее время точно установлено, что донор-специфические антитела, выявляемые этими методами, свидетельствуют о значительном риске острого гуморального отторжения, часто устойчивого к лечению.

6. ПЕРЕКРЕСТНАЯ ПРОБА НА СОВМЕСТИМОСТЬ (CROSS-MATCH)

Перекрестную пробу проводят перед трансплантацией с целью гарантировать отсутствие у реципиента антител к антигенам донора. Для исследования используют лимфоциты, полученные из периферической крови или лимфоузлов/селезенки донора. Используют последний образец сыворотки потенциального реципиента (полученный не ранее 48 часов перед трансплантацией), также при необходимости могут быть включены несколько «архивных» образцов (с положительным результатом на наличие антител).

Поскольку существует множество методов, которые можно использовать, и каждый обладает уникальным клиническим назначением, мы даем описательную интерпретацию этих тестов.

6.1 Метод комплемент-зависимой лимфоцитотоксичности (ЛЦТ-тест)

Этот стандартный тест перекрестной совместимости основан на комплемент-опосредованной цитотоксичности. Оценка базовой перекрестной совместимости проводится с помощью лимфоцитов донора. В этой реакции выявляются антитела к I классу HLA. Осуществляют инкубацию сыворотки пациента с клетками донора, а затем добавляют комплемент. Если в сыворотке пациента содержится антитела, направленные против HLA-антигенов донора, то это вызовет лизис клеток, свидетельствуя о положительном результате перекрестной пробы (**положительный cross-match**). Если антитела к антигенам донора отсутствуют, клетки остаются интактными, и перекрестная проба считается отрицательной (**отрицательный cross-match**).

6.2 Оценка перекрестной совместимости с помощью проточной цитометрии

Анализ перекрестной совместимости с помощью проточной цитометрии – это более чувствительный метод по сравнению с ЛЦТ-тестом. Он позволяет определить специфичные антитела IgG к HLA класса I и/или II донора. Тест выявляет не связывающие комплемент антитела, которые могут остаться незамеченными в методе ЛЦТ, а также антитела, содержащиеся в низком титре. При проведении этой пробы сыворотку пациента инкубируют с лимфоцитами донора. Затем клетки окрашивают флуоресцентными красителями, которые выявляют человеческие антитела IgG на T (CD3+)- и B (CD19+)-клетках.

Оценка перекрестной совместимости с помощью проточной цитометрии плохо стандартизирована между разными лабораториями, поэтому интерпретировать полученные данные надо с осторожностью.

6.3 Оценка перекрестной совместимости с помощью Luminex (виртуальный cross-match)

Анализ перекрестной совместимости с помощью технологии Luminex – наиболее точный и чувствительный метод, позволяющий определять специфичные антитела IgG к HLA класса I и II донора непосредственно до трансплантации, а также проводить мониторинг анти-донорских антител в посттрансплантационном периоде. Также как и при

цитометрическом определении, Luminex выявляет комплементфиксирующие и не фиксирующие комплемент антитела.

Процедура виртуального кросс-матча, заключается в сопоставлении HLA-антигенов донора с профилем специфичностей HLA-антител реципиента.

В случае, когда анти-донорские антитела не обнаружены – виртуальный кросс-матч отрицательный. При совпадении специфичностей HLA-антител с антигенами донора виртуальный кросс-матч положительный.

Для того, чтобы виртуальный cross-match обладал максимальной информативностью, донора необходимо типировать по всем значимым HLA-антигенам: HLA-A, B, C, DR, DQ.

Сыворотку реципиента тестируют на наличие анти-донорских HLA-антител при помощи панелей единичных антигенов LSA класс I и класс II. Затем проводят сопоставление результатов генотипирования донора и профиля антител реципиента (см. Приложение №2).

6.4 Интерпретация результатов перекрестной пробы на совместимость (cross-match)

Трансплантация органа реципиенту с циркулирующими комплементсвязывающими антителами к HLA-антигенам донора приведет к сверхострому отторжению и немедленной потере органа. Трансплантация пациенту, у которого имеются специфичные не связывающие комплемент антитела, сопровождается острым гуморальным отторжением и высоким риском потери трансплантата. Оценка перекрестной совместимости перед трансплантацией выявляет любые антитела к антигенам донора и предотвращает сверхострое отторжение, а также в значительной степени снижает вероятность острого гуморального отторжения.

Антигены, выявляемые на различных типах лимфоцитов:

- на Т-клетках – антигены HLA класса I, аутоантигены и различные Т-клеточные маркеры;
- на В-клетках – антигены HLA класса I и II, аутоантигены и различные маркеры В-клеток.

Таким образом, антитела к HLA класса I должны связываться с Т- и В-клеткам, а антитела к HLA класса II связываются только к В-клеткам. Следует отметить, что В-клетки экспрессируют антигены класса I более интенсивно, чем Т-клетки. Следовательно, они более чувствительны, чем Т-клетки при определении антител к HLA класса I с меньшей концентрацией. Это может осложнить интерпретацию положительных проб на перекрестную совместимость с В-лимфоцитами.

Использование текущих и архивных сывороток при определении перекрестной совместимости важно по следующим причинам:

- анамнестические антитела свидетельствуют о сенсибилизации пациента к антигенам донора и, следовательно, о наличии Т- и В-клеток памяти,

которые могут привести к быстрому иммунологическому ответу при повторном воздействии на пациента того же антигена;

- текущие антитела, направленные против антигенов HLA донора, присутствующих в трансплантате, могут вызывать сверхострое отторжение органа или острое гуморальное отторжение.

При положительной перекрестной пробе трансплантацию почки, поджелудочной железы, сердца и легких не проводят. Трансплантации печени при положительной перекрестной пробе возможна после обсуждения с хирургом, и при условии проведения десенсибилизирующей терапии.

6.5 Аутосовместимость

Эта проба оценивает перекрестную совместимость лимфоцитов реципиента с аутологичной (собственной) сывороткой и проводится с целью идентификации любых аутореактивных антител, которые могут развиваться в результате аутоиммунного расстройства, например, при системной красной волчанке, заболеваниях соединительной ткани, вирусной инфекции и/или воздействии определенных препаратов.

Существует много вариантов проведения теста на аутосовместимость, который позволяет выявить природу антител. Информация о наличии и типе аутоантител может быть крайне полезна при интерпретации положительного теста на перекрестную совместимость и гарантирует, что пациенты не пропустят потенциально подходящие органы в результате ложноположительной пробы на перекрестную совместимость.

7. ПРОТОКОЛ ОБСЛЕДОВАНИЯ РЕЦИПИЕНТОВ ПЕРЕД ТРАНСПЛАНТАЦИЕЙ

7.1 Реципиенты почки, поджелудочной железы, сердца, легких

При включении пациента в «лист ожидания» проводят:

- HLA-типирование
- определение группы крови по системе ABO и резус – принадлежности Rh(D)
- выявление антител к HLA с помощью методов Luminex или ИФА (скрининг)

Для сенсibilизированных реципиентов выполняется идентификация антител к HLA с заполнением карты профиля антител для проведения виртуального кросс-матча. (см. Приложение №4)

Примечание: идентификацию антител к HLA обязательно проводят также реципиентам, ожидающим повторную трансплантацию органа, даже если скрининговое исследование не выявило наличие антител к HLA. Всем пациентам в «листе ожидания» желательно проводить исследование методом единичных антигенов (идентификация

антител) хотя бы 1 раз, так как метод более чувствительный и позволяет выявить наличие антител, которые не определяются при скрининге.

Архивация сыворотки для проведения финальной перекрестной пробы непосредственно перед трансплантацией.

Для всех реципиентов, стоящих в «листе ожидания», ежемесячно проводят обновление сывороток.

Всем пациентам после переливания крови необходимо предоставить в лабораторию образец сыворотки через 14 дней после гемотрансфузии.

Непосредственно перед трансплантацией у пациента забирают кровь для проведения скрининга антител (0 точка) с целью выбора оптимальной иммуносупрессивной терапии.

7.2 Реципиенты печени

Пациентам, ожидающим трансплантацию печени, проводят HLA-типирование по локусу В. После трансплантации у пациента выполняют полное HLA-типирование (по локусам HLA-A, -B, -DR), если донор полностью совпадает по В-локусу. Далее дают заключение о риске развития РТПХ (реакция «трансплантат против хозяина»), который зависит от степени совпадения по локусам.

8. КРИТЕРИИ ПОТЕНЦИАЛЬНОГО СООТВЕТСТВИЯ ДОНОРА

1) Совместимость по группе крови

Совместимость групп крови по системе АВО и резус – принадлежности Rh(D) донора и реципиента.

2) Совместимость тканевого типа (HLA-генотипа)

Наилучшая совместимость между донором и реципиентом наблюдается при совпадении по всем шести генам (HLA-A, -B, -DR).

3) Виртуальная перекрестная совместимость

Оценка виртуальной перекрестной совместимости – метод, с помощью которого HLA-генотип потенциального донора по всем протипированным HLA-локусам сравнивают с соответствующим профилем антител к HLA у реципиента. Если у пациента нет каких-либо анти-HLA антител к HLA-антигенам потенциального донора, виртуальная перекрестная совместимость считается отрицательной и данные потенциального донора можно передавать для дальнейшей обработки. Если у пациента есть циркулирующие анти-HLA антитела к HLA-антигенам потенциального донора, то следующим этапом проводится оценка риска развития отторжения.

4) Оценка риска

Оценку риска проводят для потенциальных живых доноров. Это подразумевает подробный анализ любой несовместимости по антителам между реципиентом и потенциальным донором с присвоением степени риска того, что трансплантат (в случае его пересадки) будет подвержен повреждению в результате воздействия иммунной

системы. Пара донор-реципиент, у которой нет несовместимости по антителам, получает степень «стандартный риск», а все случаи несовместимости по антителам потенциальных трансплантатов расценивают относительно этой степени.

9. ПОСТТРАНСПЛАНТАЦИОННЫЙ МОНИТОРИНГ.

9.1 Пациенты после трансплантации почки или поджелудочной железы.

После трансплантации помимо мониторинга концентрации иммуносупрессоров в крови реципиентам проводят определение антител к HLA. В течение первого месяца сроки проведения скрининга антител определяются наличием антител к HLA до трансплантации и функцией трансплантата.

У пациентов без антител к HLA до трансплантации и при благоприятном течении посттрансплантационного периода скрининг антител проводят на 14 сутки, через 3 месяца после пересадки органа и далее ежегодно.

У пациентов без антител к HLA, но при отсроченной функции трансплантата, скрининг проводят не ранее 5-7 суток после трансплантации.

У реципиентов с предшествующей сенсибилизацией при первичной функции трансплантата исследование рекомендуется выполнять на 7 сутки после операции, при отсроченной – на 3-4 сутки. Повышение MFI при скрининге антител к HLA методом мультиплексного анализа на Luminex следует расценивать как неблагоприятный фактор в плане развития реакции отторжения трансплантата, что в свою очередь поможет скорректировать иммуносупрессивную терапию и обосновать целесообразность комплексной десенсибилизирующей терапии.

В посттрансплантационном периоде антитела к HLA определяют также для оценки эффективности иммуносупрессивной терапии и методов экстракорпоральной гемокоррекции.

Тест на идентификацию антител I и II класса проводят методом LSA класс I и II. Обнаруженные антитела сравнивают с данными индивидуальной карты профиля HLA-антител до трансплантации и с HLA генотипом донора. В случае появления в профиле антител специфичностей донорского HLA-генотипа и нарастании их титра немедленно сообщают лечащему врачу для коррекции иммуносупрессии.

9.2 Кардиоторакальные пациенты

Образец сыворотки берут каждый раз при проведении биопсии (как при биопсии согласно протоколу, так и при биопсии с целью оценки возможного отторжения). Далее желательно получать образец сыворотки при обычном поступлении пациента в клинику (каждые несколько месяцев в течение первого года и ежегодно в будущем).

Исследование на антитела проводится на всех посттрансплантационных сыворотках, полученных через 1 месяц, и максимально близко к сроку 3 месяца или при известных эпизодах отторжения.

При появлении любых новых положительных результатов или усилении положительной реакции необходимо немедленно информировать лечащего врача.

9.3 Пациенты после трансплантации печени

Если лейкоциты из донорской печени реагируют с тканями реципиента, они могут разрушать эти ткани. Этот феномен известен как реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ) и может нести существенные риски для пациентов после трансплантации печени. Доноры, гомозиготные по всем локусам HLA, несут большой риск развития реакции РТПХ. Обнаружение значительного химеризма лимфоцитов донора может помочь при обследовании пациентов с подозрением на РТПХ. Хотя это не всегда возможно, особенно при хорошей совместимости донора и реципиента по генам HLA. HLA-типирование с помощью ПЦР-SSP по периферической крови реципиента может выявить антигены HLA донора. В случае подозрения на РТПХ следует немедленно связаться с иммунологом-консультантом.

10. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Отсутствие единых стандартов иммуногенетических исследований доноров и реципиента при аллогенной трансплантации солидных органов в РФ приводит к тому, что каждый трансплантационный центр действует в соответствии со своим видением различных международных документов. При этом нередко встречаются принципиально разные подходы к требованиям преаналитического этапа, трактовке результатов, а главное к объему и периодичности проведения иммуногенетических исследований. Это является источником большого количества ошибок в результатах анализов как для реципиентов, так и доноров. Кроме того, отсутствие единых нормативных документов затрудняет открытие новых лабораторий трансплантационной иммуногенетики, создает препятствия к их оснащению современным оборудованием и реагентами, а также внедрению в практическую работу более информативных методов исследования и контролю качества выполняемых тестов. Таким образом, в нашей стране сложилась ситуация, когда существует большое количество трансплантационных центров, где функционируют лаборатории HLA-типирования, но их работа не регламентирована никакими нормативными документами.

Предложенные рекомендации по правильной организации в ЛПУ иммуногенетического типирования по системе HLA доноров и реципиентов при аллогенной трансплантации органов, скринингу и идентификации предсуществующих антител к HLA у реципиента, а также по выполнению перекрестных проб на совместимость, будут способствовать сокращению количества ошибок, улучшению качества результатов выполненных тестов и, таким образом, обеспечению совместимости для реципиента трансплантируемых органов.

11. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Стандарт Национальной службы гистосовместимости и иммуногенетики для трансплантации солидных органов (The National Histocompatibility And Immunogenetics Service For Solid Organ Transplantation – NHISSOT), 8 издание.
2. European Federation for Immunogenetics STANDARDS FOR HISTOCOMPATIBILITY & IMMUNOGENETICS TESTING Version 7.0
3. ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003). Национальный стандарт Российской Федерации «Лаборатории медицинские. Требования безопасности»
4. ГОСТ Р 53079.4-2008. Национальный стандарт Российской Федерации. «Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа»
5. ГОСТ Р 52623.4-2015 Национальный стандарт Российской Федерации «Технологии выполнения простых медицинских услуг инвазивных вмешательств». Часть 9 «Взятие крови из периферической вены»
6. Методические указания МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I - IV групп патогенности»

12. ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение №1.

Современная HLA-номенклатура.

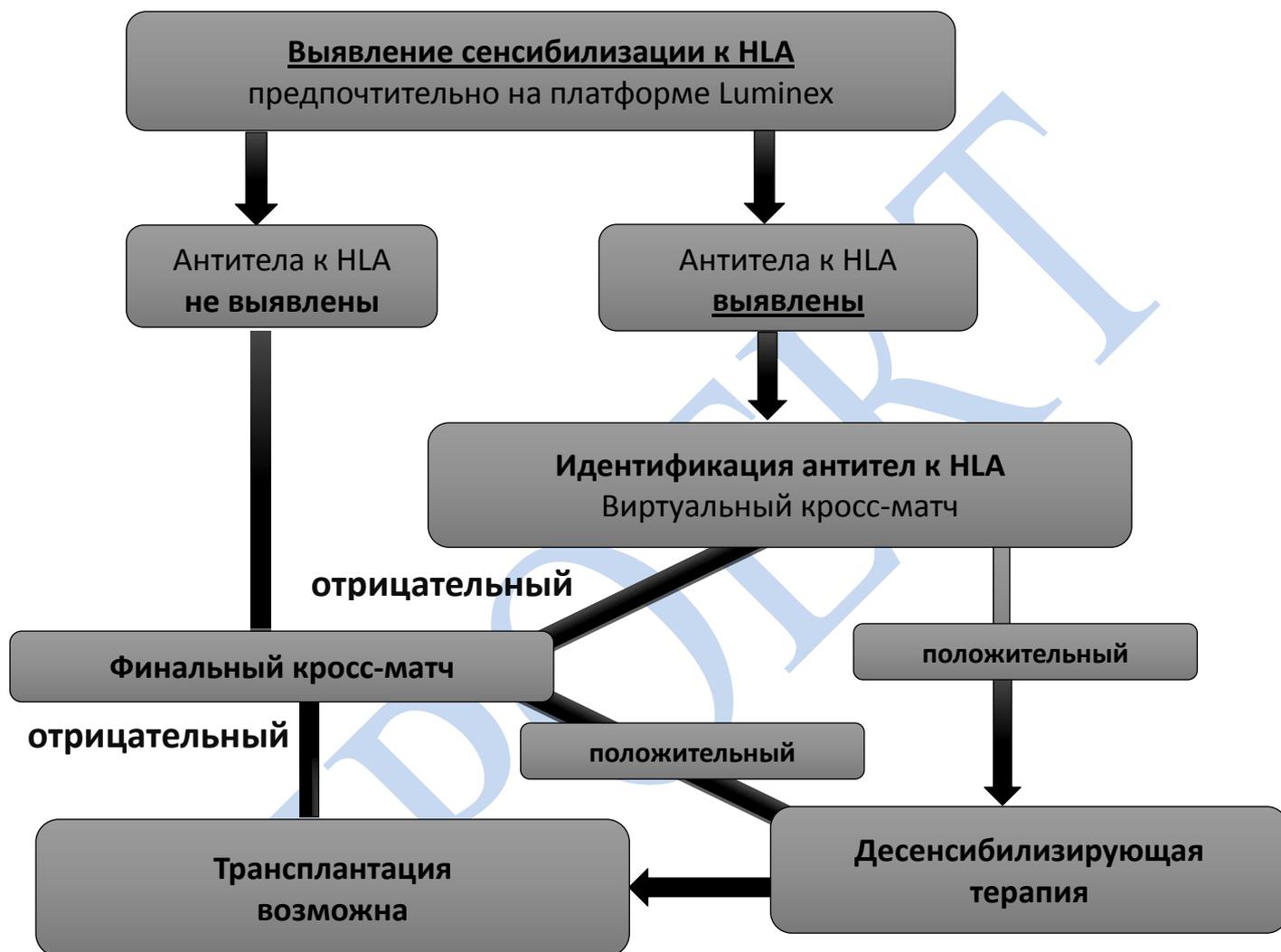
HLA-A*02:101:01:02N

Номенклатура	Основные значения номенклатуры
<u>HLA</u>	Гены главного комплекса гистосовместимости человека
HLA- <u>A</u>	Конкретный ген (локус) HLA (например, HLA-A)
HLA-A* <u>02</u>	Группа аллелей, кодирующая A2 антиген (антигенный эпитоп, узнаваемый специфическими HLA-антителами) (низкое разрешение)
HLA-A*02: <u>01</u>	Конкретная специфичность HLA-аллели, соответствующая определенной аминокислотной последовательности белка в антигенсвязывающем участке. Нуклеотидная замена в этом поле приводит к изменению структуры белка (высокое разрешение)
HLA-A*02:01: <u>02</u>	Однонуклеотидная замена в экзоне (кодирующей области) по сравнению с диким типом A*02:01:01. Не приводит к замене аминокислоты
HLA-A*13:01:01: <u>02</u>	Однонуклеотидная замена в интроне (некодирующая область) по сравнению с диким типом A*02:01:01:01. Не приводит к замене аминокислоты
HLA-A*24:09 <u>N</u>	Означает нулевой аллель (Null allele), который не экспрессируется
HLA-A* <u>30:14L</u>	Обозначает аллель, кодирующий в значительной степени редуцированный белок на клеточной поверхности (Low)
HLA-A* <u>24:02:01:02L</u>	Обозначает аллель, кодирующий в значительной степени редуцированный белок на клеточной поверхности, где мутация найдена за пределами кодирующей области (экзона)
HLA-B*44:02:01:02 <u>S</u>	Аллель кодирует белок, который экспрессируется только как секреторная молекула
HLA-A*32:11 <u>Q</u>	Известно, что белок экспрессируется, однако локализация его экспрессии остается под вопросом

Номенклатура HLA неоднократно претерпевала изменения и дополнения, что связано, во-первых с переходом от серологического типирования поверхностных клеточных антигенов к молекулярным исследованиям полиморфных ДНК последовательностей (аллелей), во-вторых с открытием новых аллельных вариантов HLA-генов, установлением полиморфизмов в экзонных и интронных областях генов HLA. Различия в уровнях экспрессии HLA-антигенов повлекли за собой необходимость так или иначе отразить это в современной номенклатуре. Современная HLA-номенклатура представлена на веб-ресурсе международной ассоциации иммуногенетиков (<http://hla.alleles.org/nomenclature>).

ПРОЕКТ

Алгоритм обследования реципиентов для внесения в «лист ожидания» и перед трансплантацией.



Требования выполнению преаналитического этапа иммуногенетических исследований.

3.1. Внелабораторный преаналитический этап

3.1.1. Назначение, составление заявки на иммуногенетическое исследование и оформление бланка-направления.

Преаналитический этап начинается с назначения исследования, на основании чего составляют заявку на его проведение. Биологический материал направляется в лабораторию вместе с бланком-направлением, оформленным согласно требованиям, с заполнением всех граф: дата и время взятия крови, фамилия, имя отчество больного, возраст, пол, отделение, палата, № истории болезни (амбулаторной карты), перечень требуемых исследований, подпись специалиста, проводившего взятие образца крови.

Факторы, способные повлиять на результаты назначенного исследования, должны быть указаны в направлении. К таковым относятся проводимая гемокомпонентная терапия, дата последней трансфузии гемокомпонентов, особенности образца (донорская селезенка и т.д.), диагноз и пр.

Направления и пробирки с биоматериалом должны быть идентично маркированы в присутствии пациента. У доноров образец крови для иммуногенетических исследований заготавливается аналогично и маркируется в соответствии с данными истории болезни.

В записанном в историю болезни назначении должны быть четко обозначены иммуногенетические параметры, которые необходимо определить в биологическом материале.

3.1.2. Подготовка к исследованию

Для получения достоверных результатов анализов большое значение имеет подготовка пациента к лабораторным исследованиям.

Брать кровь у пациента для исследований рекомендуется в ранние утренние часы после 12-часового ночного голодания (базовое состояние). От 7 до 10 часов утра - оптимальное время для взятия проб крови на лабораторные анализы.

Если больному требуется переливание гемокомпонентов, образец крови для иммуногенетических исследований берут до начала трансфузии.

3.1.3. Идентификация пациента или донора

Необходимо убедиться, что взятие крови будет проведено у пациента или донора указанного в направлении. Для идентификации пациента необходимо спросить его фамилию, имя, отчество, дату рождения и сравнить полученную информацию с указанной в направлении для пациентов.

Для идентификации донора или пациента без сознания информация направления проверяется по данным истории болезни.

3.1.4. Заготовка и маркировка образца крови

Для иммуногенетических исследований молекулярно-биологическими методами венозная кровь с помощью вакуумной системы заготавливается в отдельную пробирку с K_2 /ЭДТА/ K_3 /ЭДТА/ Na_2 /ЭДТА, цветовая кодировка пробирки – фиолетовая (рис. 1, 2). Объем взятой крови должен строго соответствовать объему пробирки для соблюдения правильного соотношения кровь/антикоагулянт. Для выполнения иммуногенетических исследований достаточно 3-5 мл крови.



Рис. 1. Вакуумная пробирка с K_2 /ЭДТА



Рис. 2. Вакуумная система для отбора проб крови

Непосредственно после взятия крови образец обязательно перемешать. Не встряхивать! Пробирку необходимо только плавно перевернуть на 180° 8-10 раз (рис.3). Интенсивное перемешивание с образованием пены может вызвать гемолиз, недостаточное перемешивание ведет к образованию сгустков. Пробирки с видимыми сгустками крови для исследования не принимаются.

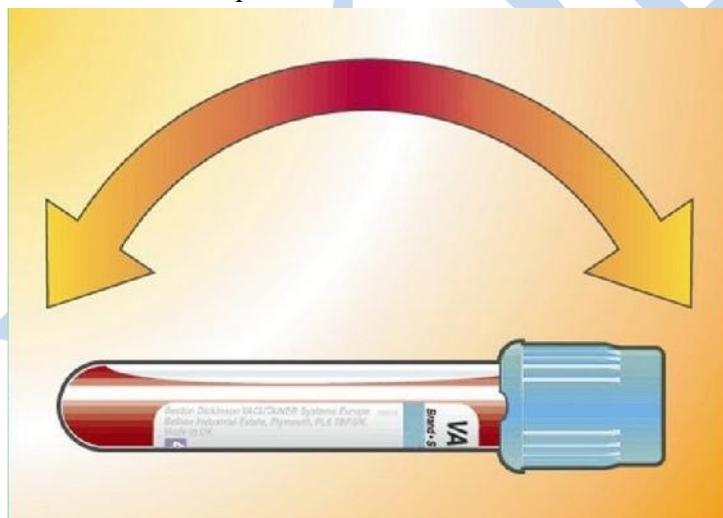


Рис. 3. Правильное перемешивание пробы крови

При взятии крови из катетера, находящегося в сосуде, с помощью шприца или пустой вакуумной пробирки необходимо отобрать и удалить 3- 5 мл крови, смешанной с последним введенным раствором или гепарином, во избежание контаминации образца этими растворами.

Категорически запрещается применение для молекулярно-биологических исследований образцов крови, взятых в пробирки с разделительным гелем, а также использование в качестве антикоагулянта гепарина.

Для определения антител к HLA используется сыворотка венозной крови, которая с помощью вакуумной системы заготавливается в отдельную пробирку без антикоагулянта в объеме 2-5 мл (можно использовать пробирку с активатором свертываемости). Цветовая кодировка пробирки – красная.

При формировании и обновлении «листа ожидания» образцы крови пациента для выявления антител отправляются в лабораторию в плановом порядке не реже одного раза в месяц.

Перед трансплантацией заготавливается свежий образец крови пациента в пробирку без антикоагулянта для проведения перекрестной пробы на совместимость (cross-match). Для выполнения этого исследования необходим также фрагмент селезенки или лимфоузла донора или его кровь, взятая в вакуумную пробирку с антикоагулянтом (ЭДТА, цитратом натрия или гепарином), в объеме до 5 мл.

Все пробирки с биоматериалом должны быть стандартно маркированы и содержать следующую информацию: фамилия, имя, отчество больного, отделение, дата и время получения материала. Маркировка должна быть устойчива к механическим и другим видам повреждений и полностью соответствовать содержанию пунктов бланка – направления. Штрих-кодирование дополняет, но не заменяет маркировку пробирки и направления.

Биоматериал в пробирках, маркировка которых не соответствует требованиям, не должен приниматься лабораторией к исследованиям.

3.1.5.. Хранение материала и его доставка в лабораторию

Образец крови должен быть доставлен в лабораторию в максимально короткий срок после получения. Для срочных исследований кровь в лабораторию доставляется непосредственно после взятия. Если доставить образец сразу невозможно (кровь взята в ночное время, выходные и праздничные дни и т.д.), его необходимо хранить в холодильнике при температуре +2-8 °С. Образцы крови для молекулярно-генетических исследований можно хранить до доставки в лабораторию в замороженном состоянии (-20 °С).

Недопустимо замораживание биологического материала, предназначенного для исследований серологическими методами (определение антител, перекрестная проба на совместимость).

Образцы крови для перекрестной пробы на совместимость, необходимо хранить при температуре +4 – 8°С не более 4 часов. При увеличении времени доставки образца в лабораторию (более 4-х часов) в кровь следует добавить физиологический раствор (0,9% NaCl) в соотношении 1:1 и транспортировать в специальных контейнерах с холодowymi элементами при температуре 8 – 10°С.

Транспортировка должна осуществляться только в специальных маркированных небьющихся контейнерах. Образцы доставляются вместе с оформленными по правилам направлениями, которые должны быть в упаковке, исключающей возможность их контаминации кровью.

3.2 Внутрилабораторный преаналитический этап.

3.2.1. Прием, регистрация и маркировка образцов биоматериала, доставленных в лабораторию

В лаборатории проводятся регистрация, центрифугирование, аликвотирование биоматериала и последующая его передача сотрудникам для проведения назначенных исследований.

Регистрация образцов биологического материала в лаборатории производится путем занесения данных образцов в журнал либо электронный журнал в лабораторной информационной системе – ЛИС. При необходимости дополнительной лабораторной маркировки, ее данные указываются на пробирке с образцом, направлении и в журнале (электронном журнале в ЛИС).

Критерии для отказа в приеме лабораторией биоматериала на исследования:

- отсутствие маркировки (штрих-кода, надписи на емкостях, контейнерах, пробирках и т.д.);
- неправильная маркировка (несоответствие маркировки бланка-направления и пробирки);
- неправильно заполненный бланк-направление (нет сведений в некоторых графах) или его отсутствие;
- неправильно заготовленный образец крови (малый объем, наличие сгустков и т.п.);
- несоблюдение сроков и условий хранения материала до момента доставки в лабораторию (замораживание, перегрев, утрата части материала при опрокидывании пробирки и т.д.);
- видимые повреждения емкости с биоматериалом.

В указанных случаях исследование биоматериала не производится.

Сотрудник лаборатории заносит информацию о причине отказа в выполнении исследования в компьютер (журнал), оперативно информирует лечащего врача по телефону и фиксирует эту информацию в бланке-направлении, который отправляется в отделение.

3.2.2. Подготовка образцов крови для иммуногенетических исследований

Основным биоматериалом для иммуногенетических исследований является венозная кровь, взятая в пробирки с антикоагулянтом K_2 ЭДТА/ K_3 ЭДТА/ Na_2 ЭДТА (в исключительных случаях используются пробирки с другим антикоагулянтом). После регистрации и лабораторной маркировки образец крови подвергается обязательному центрифугированию в течение 10 минут при 1300 g*. Для выполнения иммуногенетических исследований обычно используют среднюю порцию крови – лейко-тромбо- слой, который находится между плазмой и эритроцитами. Его отбирают в чистую пробирку и обязательно маркируют.

При использовании замороженного образца крови его размораживают при комнатной температуре (+15-25°C), центрифугировать его не требуется.

Если образец венозной крови заготовлен в пробирку без антикоагулянта, его оставляют при комнатной температуре (15-25°C) в течение 20-60 минут для спонтанного образования сгустка. После ретракции сгустка образец обязательно центрифугируют 10 минут при 1300 g. для отделения сыворотки. Сыворотку отбирают в чистую сухую пробирку, маркируют и замораживают.

*Примечание: К паспорту центрифуги должна прилагаться таблица, указывающая связь между числом оборотов в минуту и величиной центробежной силы (g).

3.2.3 Оценка пригодности крови и сыворотки для исследования.

Образцы крови, заготовленные с антикоагулянтом, оценивают визуально, в проходящем свете при покачивании на наличие сгустков. Если сгустки обнаружены – кровь использовать нельзя. В этом случае для иммуногенетических исследований запрашивается новый образец крови. Отметку о непригодности образца обязательно делают в направлении и журнале (электронном журнале).

Сыворотка крови с признаками гемолиза непригодна для анализа. При наличии признаков гемолиза запрашивается новый образец крови для анализа. Если гемолиз вызван не нарушениями на этапе взятия и транспортировки образца, а обусловлен особенностями состояния больного, исследования гемолизированного образца выполняют с обязательной отметкой о гемолизе в направлении и журнале (электронном журнале).

При липемии происходит помутнение сыворотки вследствие высокого содержания хиломикронов. Для удаления хиломикронов возможно поместить пробирку на 18-24 часа в холодильник (+2-8 °C) для отстаивания сыворотки, либо отцентрифугировать образец сыворотки, отделенный от сгустка, на максимальной скорости (около 13000-14000 оборотов в минуту) в течение 10 минут, затем удалить хилезный слой пипеткой. Отметка о «хилезе» в направлении и журнале (электронном журнале) обязательна.

Мутность сыворотки может быть вызвана ростом бактерий, попавших в пробу, особенно при несоблюдении временных и температурных условий транспортировки и хранения биоматериала. В этих случаях образец непригоден для анализа.

3.2.4. Хранение образца крови

Хранение образцов крови до осуществления серологических методов исследования не должно превышать 72 часов при температуре +2 -8°C. Аликвотированную сыворотку для выявления антител можно замораживать и хранить до 3 месяцев при -20 °C.

Для молекулярно-биологических методов исследования возможно замораживание образца и хранение его до 1 месяца при -20 °C, 1 года при -40 °C и бессрочно при -90 °C.

Приложение №4.

Схема HLA антиген-антитело кросс-реагирующих групп (CREG)

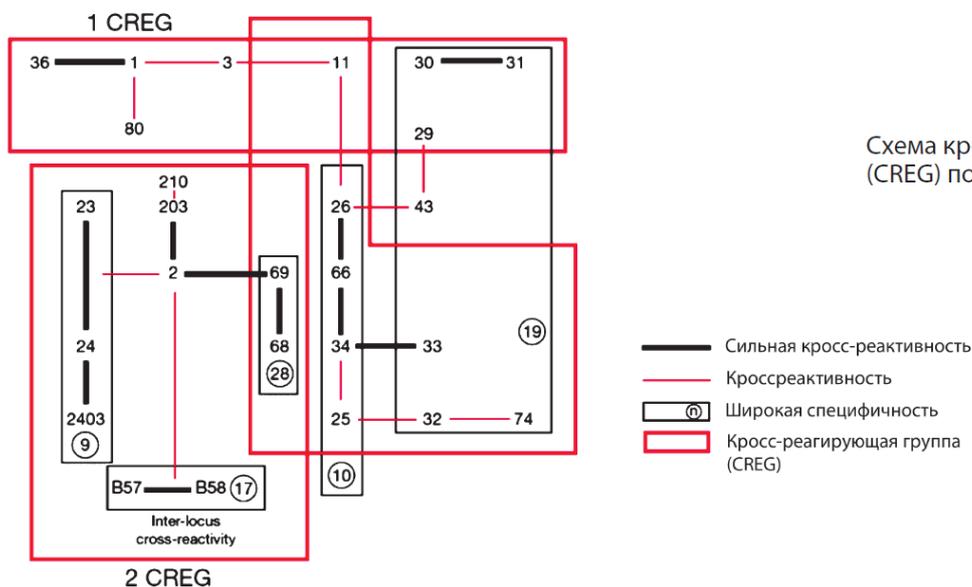


Схема кросс-реагирующих групп (CREG) по локусу HLA-A.

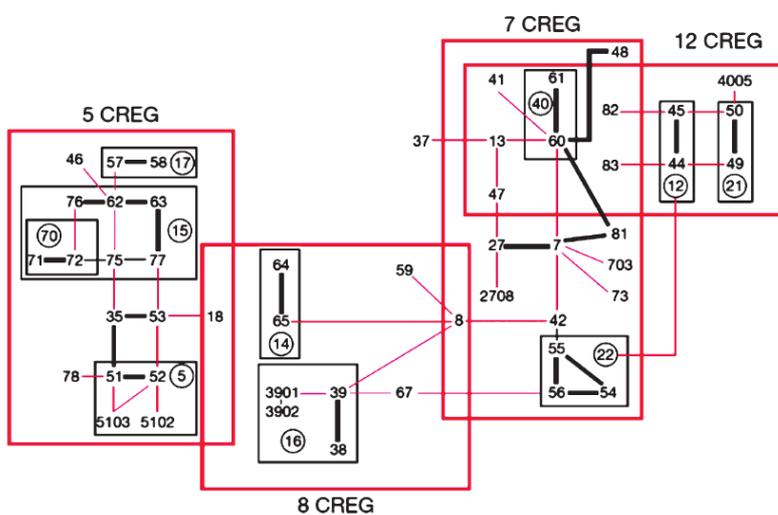


Схема кросс-реагирующих групп (CREG) по локусу HLA-B.

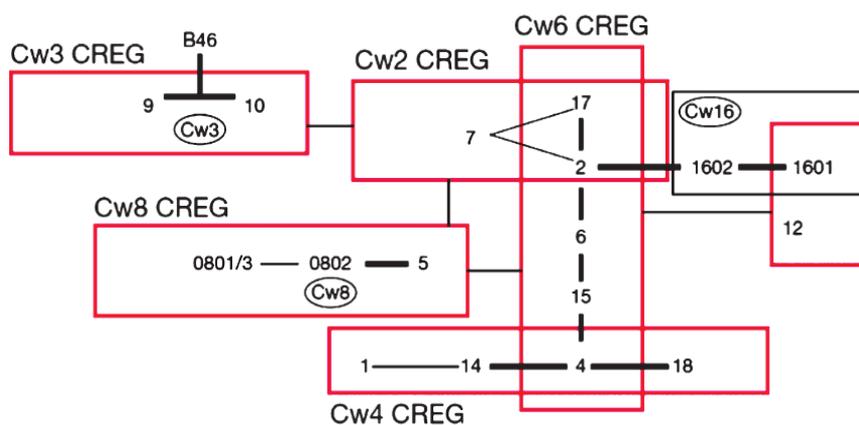


Схема кросс-реагирующих групп (CREG) по локусу HLA-Cw.

ПРОЕКТ

Требования к помещениям для иммуногенетических лабораторий, использующих молекулярно-генетические методы исследования.

Размещение помещений лаборатории допускается в отдельно стоящем здании или в виде отдельного блока.

1. Помещения лаборатории должны быть боксированными (боксы с предбоксами), соответствующим образом промаркированы (нумерация или название рабочих зон) и оборудованы приточно-вытяжной вентиляцией, водопроводом, канализацией, электричеством и отоплением, средствами пожаротушения, естественным и искусственным освещением.
2. Внутреннюю отделку помещений должна быть выполнена материалами, устойчивыми к действию моющих и дезинфицирующих средств, поверхности стен, пола и потолка в лабораторных помещениях должны быть гладкими, без щелей, легко обрабатываемыми.
3. В помещениях рабочих зон должны быть установлены бактерицидные лампы.
4. Окна должны быть плотно закрыты, возможно, использование светозащитных пленок из материала, устойчивого к действию используемых дезинфицирующих средств. Использование жалюзи (из-за адсорбции ими пыли) запрещено.
5. Архитектурно-планировочные решения и размещение оборудования должны обеспечивать поточность движения исследуемого материала.
6. Лаборатория в соответствии с этапами проведения анализа должна включать следующий набор последовательно расположенных самостоятельных помещений – рабочих зон (РЗ):
 - приема, регистрации, разбора и первичной обработки материала (РЗ 1);
 - выделения нуклеиновых кислот (РЗ 2);
 - сборки реакционных смесей для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) (РЗ 3);(РЗ 2 и РЗ 3 являются пре-ПЦР зоной)
 - проведения ПЦР (помещение, в котором размещены амплификаторы (РЗ 4);
 - визуализации результатов ПЦР методом гель-электрофореза (РЗ 5);
 - гибридизации для проведения ПЦР с сиквенс-специфическими олигонуклеотидными зондами с последующим гибридизационно-ферментным методом детекции, или методом мультиплексного флуоресцентного анализа (РЗ 6);
 - секвенирования (РЗ 7);РЗ 4, РЗ 5, РЗ 6, РЗ 7 являются пост-ПЦР зоной.
 - регистрации результатов в электронной базе данных (РЗ 8).

7. В состав лаборатории могут быть включены вспомогательные помещения (комнаты персонала, кабинет заведующего лабораторией, раздевалки для сотрудников, комната приема пищи, туалет, подсобные (складские) помещения, которые должны быть вынесены за пределы рабочих зон.

7.1 В РЗ 1 осуществляют внесение персональных сведений о донорах в электронную базу данных с присвоением индивидуального номера, прием материала, его маркировку, регистрацию в специальном журнале, штрих-кодирование, разделение проб на аликвоты, хранение проб, обеззараживание остатков исследуемого материала.

7.2 В пре-ПЦР-зоне выполняются следующие виды работ:

7.2.1 В РЗ 2 проводят выделение геномной ДНК человека из проб, подготовленных в РЗ 1, оценивают качество и количество выделенной ДНК.

7.2.2 В РЗ 3 осуществляют сборку реакционных смесей (без внесения ДНК), для проведения ПЦР. Внесение ДНК в реакционную смесь должно осуществляться в РЗ 1.

При необходимости, возможно совмещение РЗ 2 и РЗ 3 в одном помещении при наличии в нем отдельных боксов биологической безопасности II класса для каждой из рабочих зон.

7.3. В пост-ПЦР зоне выполняют следующие виды работ:

7.3.1 В РЗ 4 размещаются амплификаторы для проведения ПЦР и реакции секвенирования.

7.3.2 В РЗ 5 проводится детекция продуктов ПЦР методом горизонтального электрофореза и фотоархивирование электрофореграмм

7.3.3 В РЗ 6 проводится гибридизация продуктов амплификации с сиквенспецифическими олигонуклеотидными зондами с последующим калориметрическим методом детекции, или методом мультиплексного флуоресцентного анализа.

7.3.4 В РЗ 7 проводится очистка продуктов амплификации, проведение пробоподготовки для проведения реакции секвенирования, визуализация результатов реакции секвенирования с помощью секвенатора и последующая интерпретация результатов реакции секвенирования с помощью программного обеспечения.

7.4 Внесение полученных результатов в электронную базу данных осуществляется в отдельном помещении (РЗ 8)

8. Каждая самостоятельная РЗ должна быть оснащена набором соответствующего лабораторного оборудования в зависимости от их функционального назначения и риска контаминации, необходимым комплектом мебели, пластиковой и стеклянной посуды, расходных материалов, защитной одежды, используемых только в данном помещении. Необходимо иметь отдельный уборочный инвентарь с соответствующей маркировкой в пре-ПЦР и пост-ПЦР зонах

8.1 Необходимый комплект лабораторного оборудования определяют с учетом используемых методов HLA-типирования.

8.2 Лабораторная мебель, оборудование и принадлежности каждой рабочей зоны должны иметь маркировку указанной зоны (помещения), их применение в других рабочих зонах (помещениях) или для других видов исследований не допускается.

8.3 Лабораторная мебель, поверхность используемого оборудования должны быть устойчивы к действию моющих и дезинфицирующих средств, ультрафиолетового излучения, поверхность столов не должна иметь трещин и швов.

8.4 Оборудование и измерительные приборы, используемые в работе лаборатории, должны быть зарегистрированы в установленном порядке и исправны, иметь технический паспорт и рабочую инструкцию по эксплуатации, соответствовать нормам безопасности и электромагнитной совместимости. Не реже 1 раза в год измерительные приборы должны подвергаться метрологическому контролю (поверке).

9. Лаборатория должна быть обеспечена аптечкой стандартной комплектации для оказания первой медицинской помощи при авариях в соответствии с действующими санитарными правилами, регламентирующими безопасность работ с микроорганизмами I-IV групп патогенности.

Требования к проведению работ

Исследование материала осуществляют специалисты с высшим или средним медицинским или биологическим образованием, получившие дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по иммуногенетике. Все этапы исследования должны быть изложены в виде стандартных операционных процедур, которые ежегодно утверждаются заведующим лабораторией и доводятся до сведения всех сотрудников. Описания стандартных операционные процедуры должны находиться на соответствующих рабочих местах.

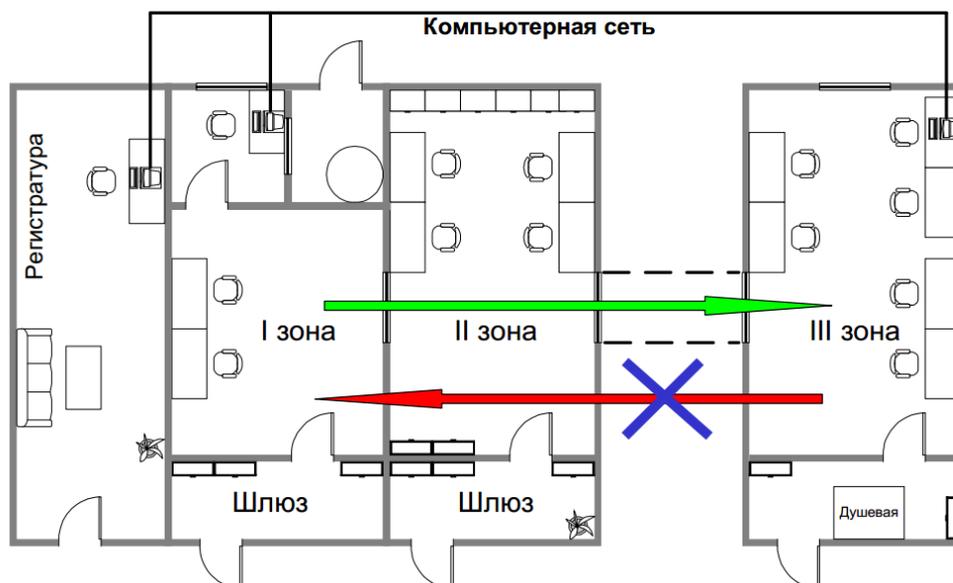
Требования к защитной одежде

1. Каждая РЗ обеспечивается необходимым количеством комплектов спецодежды. Следует использовать спецодежду разного цвета в помещениях пре-ПЦР и пост-ПЦР зон. Использование одежды из другой зоны запрещено. Рекомендуется использование одноразовой одежды.

2. Надевание и снятие защитной одежды производят в предбоксах. В каждом из них должен быть отдельный комплект защитной одежды. Наиболее загрязненной продуктами амплификации считается защитная одежда РЗ 5, особенно, латексные (резиновые) перчатки, которые снимают в первую очередь.

Принцип «поточности» помещений для иммуногенетических лабораторий, использующих молекулярно-генетические методы исследования.

Организация ПЦР-лаборатории



Приложение №7.

Примерные перечни оборудования для иммуногенетических лабораторий.

Перечень оборудования и расходных материалов для постановки прямой перекрестной пробы (cross-match) методом комплемент-зависимой цитотоксичности и серологического HLA-типирования.

1. Инвертированный микроскоп для светлого поля или флуоресценции
2. Пластиковые планшеты «Терасаки» на 72 или 96 лунок
3. Центрифуга лабораторная
4. Микрошприцы или дозаторы для дозирования малых и сверхмалых объемов
5. Пастеровские пипетки
6. Лабораторные морозильные камеры на -65С

Перечень оборудования для постановки прямой перекрестной пробы (cross-match) методом проточной цитометрии

1. Центрифуга для микропробирок
2. Проточный цитофлуориметр
3. Персональный компьютер для анализа и учета результатов
4. Лабораторные морозильные камеры на -20С
5. Лабораторные холодильники на +4 +8С

Перечень оборудования для анализа HLA-антител методом флуоресцентной детекции на микросферах

1. Центрифуга для микропробирок
2. Шейкер для микропланшет
3. Мультипараметрический флуоресцентный анализатор
4. Система вакуумной фильтрации для работы с микропланшетами
5. Лабораторные морозильные камеры на -20С
6. Лабораторные холодильники на +4 +8С
7. Персональный компьютер для анализа и учета результатов скрининга и идентификации HLA-антител

Перечень оборудования для молекулярно-генетического SSP HLA-типирования

1. Оборудование для ручного или автоматического выделения ДНК из образцов цельной крови, букальных соскобов, слюны, тканей.
2. ПЦР бокс для сборки ПЦР смеси
3. Спектрофотометр для измерения качества и количества выделенной ДНК

4. Амплификатор (термоциклер) планшетного формата
5. Оборудование для горизонтального электрофореза (электрофоретическая ячейка, источник тока)
6. Система для просмотра и документирования продуктов электрофореза в геле
7. Персональный компьютер для анализа и учета результатов генетического типирования
8. Набор микродозаторов для зон Пре и Пост- ПЦР с переменными объемами в диапазоне от 1 мкл до 1000 мкл
9. Лабораторный вортекс с осадителем
10. Лабораторная центрифуга для микропробирок
11. Термостат суховоздушный для микропробирок
12. Штативы лабораторные для пробирок типа Эппендорф и микропробирок для ПЦР
13. Лабораторные морозильные камеры на -20С
14. Лабораторные холодильники на +4 +8С

Перечень оборудования для молекулярно-генетического Real Time HLA-типирования

1. Оборудование для ручного или автоматического выделения ДНК из образцов цельной крови, букальных соскобов, слюны, тканей.
2. ПЦР бокс для сборки ПЦР смеси
3. Спектрофотометр для измерения качества и количества выделенной ДНК
4. Амплификатор с детекцией результатов в режиме реального времени (не менее 3-х каналов детекции).
5. Персональный компьютер для анализа и учета результатов генетического типирования
6. Набор микродозаторов для зон Пре и Пост- ПЦР с переменными объемами в диапазоне от 1 мкл до 1000 мкл
7. Лабораторный вортекс с осадителем
8. Лабораторная центрифуга для микропробирок
9. Термостат суховоздушный для микропробирок
10. Штативы лабораторные для пробирок типа Эппендорф и микропробирок для ПЦР
11. Лабораторные морозильные камеры на -20С
12. Лабораторные холодильники на +4 +8С

Перечень оборудования для молекулярно-генетического SSO HLA-типирования

1. Оборудование для ручного или автоматического выделения ДНК из образцов цельной крови, букальных соскобов, слюны, тканей.
2. ПЦР бокс для сборки ПЦР смеси
3. Спектрофотометр для измерения качества и количества выделенной ДНК
4. Амплификатор (термоциклер) планшетного формата
5. Мультипараметрический флуоресцентный анализатор
6. Персональный компьютер для анализа и учета результатов генетического типирования
7. Набор микродозаторов для зон Пре и Пост- ПЦР с переменными объемами в диапазоне от 1 мкл до 1000 мкл
8. Лабораторный вортекс с осадителем для зоны Пре и Пост-ПЦР
9. Лабораторная центрифуга для микропробирок
10. Термостат суховоздушный для микропробирок
11. Штативы лабораторные для пробирок типа Эппендорф и микропробирок для ПЦР
12. Лабораторные морозильные камеры на -20С
13. Лабораторные холодильники на +4 +8С

Перечень оборудования для молекулярно-генетического SBT HLA-типирования

1. Оборудование для ручного или автоматического выделения ДНК из образцов цельной крови, букальных соскобов, слюны, тканей.
2. ПЦР бокс для сборки ПЦР смеси
3. Спектрофотометр для измерения качества и количества выделенной ДНК
4. Амплификатор (термоциклер) планшетного формата
5. Анализатор генетический для секвенирования ДНК по методу Сенгера
6. Персональный компьютер для анализа и учета результатов генетического типирования
7. Набор микродозаторов для зон Пре и Пост- ПЦР с переменными объемами в диапазоне от 1 мкл до 1000 мкл
8. Лабораторный вортекс с осадителем для зоны Пре и Пост-ПЦР
9. Лабораторная центрифуга с ротором для микропробирок
10. Лабораторная центрифуга с ротором для микропланшет
11. Термостат суховоздушный для микропробирок
12. Штативы лабораторные для пробирок типа Эппендорф и микропробирок для ПЦР

13. Лабораторные морозильные камеры на -20С
14. Лабораторные холодильники на +4 +8С

Перечень оборудования для молекулярно-генетического NGS HLA-типирования

1. Оборудование для ручного или автоматического выделения ДНК из образцов цельной крови, букальных соскобов, слюны, тканей.
2. ПЦР бокс для работы в Пре-ПЦР зоне
3. Амплификатор (термоциклер) планшетного формата
4. Оборудование для ручного или автоматизированного приготовления библиотек ДНК:
5. Спектрофотометр для измерения концентрации ДНК
6. Флюориметр для измерения концентрации ампликонов
7. Оборудование для проведение фрагментации библиотеки
8. Оборудование для процедуры разделения фрагментов по размеру
9. Оборудование для проведения индексирования
10. Оборудование для оценки финальной концентрации функциональной библиотеки
11. Оборудование для автоматизации процесса приготовления библиотек
12. Анализатор генетический для секвенирования ДНК методом NGS
13. Персональный компьютер для анализа и учета результатов генетического типирования
14. Набор микродозаторов для зон Пре и Пост- ПЦР с переменными объемами в диапазоне от 1 мкл до 1000 мкл
15. Лабораторный вортекс с осадителем для зоны Пре и Пост-ПЦР
16. Лабораторная центрифуга с ротором для микропробирок
17. Лабораторная центрифуга с ротором для микропланшет
18. Термостат суховоздушный для микропробирок
19. Шейкер для микропланшет
20. Штативы лабораторные для пробирок типа Эппендорф и микропробирок для ПЦР
21. Лабораторные морозильные камеры на -20С
22. Лабораторные холодильники на +4 +8С

Приложение №8.

Примерный перечень распределения оборудования по зонам помещений для иммуногенетических лабораторий, использующих молекулярно-генетические методы исследования.

№ п/п	Оборудование	Количество комплектов	Назначение
Помещение Пре-ПЦР («чистая зона»)			
1.	Ламинарный шкаф или ПЦР-бокс, оснащенный встроенной ультрафиолетовой лампой	1	Служит рабочей поверхностью оператору при сборке ПЦР-смеси.
2.	Холодильник с температурным режимом от 2 до 6 ⁰ С	1	Предназначен для хранения реагентов с температурным режимом от 2 до 6 ⁰ С.
3.	Холодильник с температурным режимом от минус 15 до минус 25 ⁰ С	1	Предназначен для хранения реагентов с температурным режимом от минус 15 до минус 25 ⁰ С.
4.	Морозильник низкотемпературный с температурным режимом от минус 30 до минус 90 ⁰ С	1	Предназначен для хранения реагентов с температурным режимом от минус 30 до минус 90 ⁰ С.
5.	Термостат твердотельный	1	Предназначен для размораживания компонентов ПЦР-смеси.
6.	Микроцентрифуга/Вортекс	1	Предназначена для перемешивания компонентов ПЦР-смеси.
7.	Комплект одноканальных механических дозаторов: - с режимом дозирования 0,5-10 мкл; - с режимом дозирования 1-20 мкл; - с режимом дозирования 20-200 мкл; - с режимом дозирования 100-1000 мкл	2	Предназначены для дозирования компонентов ПЦР-смеси; наличие дозаторов с четырьмя режимами дозирования позволит готовить ПЦР-смеси для любой технологии проведения НЛА-типирования. 1 комплект – в работе, 2 комплект – на проверке. Запрещено менять местами дозаторы из различных помещений!
8.	Шкаф лабораторный	1	Предназначен для хранения расходных материалов с температурным режимом хранения – при комнатной температуре.
9.	Станция водоподготовки	1	Вода необходима для

Иммуногенетическое обеспечение трансплантации солидных органов.
Рекомендации

	(дистиллятор)		приготовления ПЦР-смесей. В данном помещении можно иметь установку с самой минимальной производительностью, но обязательно для получения деионизированной воды.
Помещение выделения ДНК			
1.	Ламинарный шкаф или ПЦР-бокс, оснащенный встроенной ультрафиолетовой лампой	1	Служит рабочей поверхностью оператору при подготовке пробирок с биоматериалом для постановки в прибор.
2.	Холодильник двухкамерный с температурным режимом одной камеры от 2 до 6 ⁰ С, с температурным режимом и другой камеры – от минус 15 до минус 25 ⁰ С	1	Камера с температурным режимом от 2 до 6 ⁰ С предназначена для хранения разведенной протеиназы, размораживания пробирок с биоматериалом. Камера с температурным режимом от –15 до –25 ⁰ предназначена для промежуточного хранения пробирок с биоматериалом, хранения образцов ДНК.
3.	Морозильник низкотемпературный с температурным режимом от минус 30 до минус 90 ⁰ С	1	Предназначен для архивного хранения образцов ДНК.
4.	Автоматическая станция для выделения нуклеиновых кислот, работающая с первичными пробиркам и позволяющая выделять до 96 образцов за 1 запуск.	1	Предназначена для выделения ДНК из биоматериала при скрининговом типировании (большое количество образцов за короткий период).
5.	Автоматическая станция для выделения нуклеиновых кислот, позволяющая работать в формате выделения от 1 до 12 образцов.	1	Предназначена для выделения ДНК при перестановках или при небольшой загруженности лаборатории.
6.	Термостат твердотельный	1	Предназначен для размораживания препаратов ДНК для внесения в ПЦР-смесь.
7.	Микроцентрифуга/Вортекс	1	Предназначена для перемешивания образцов ДНК перед внесением в ПЦР-смесь.

Иммуногенетическое обеспечение трансплантации солидных органов.
Рекомендации

8.	Комплект одноканальных механических дозаторов: - с режимом дозирования 0,5-10 мкл; - с режимом дозирования 1-20 мкл; - с режимом дозирования 20-200 мкл; - с режимом дозирования 100-1000 мкл	2	Предназначены для дозирования препаратов ДНК, разведения компонентов наборов реагентов для выделения ДНК и других операций. 1 комплект – в работе, 2 комплект - на поверке. ВНИМАНИЕ! Запрещено менять местами дозаторы из различных помещений.
9.	Спектрофотометр, работающий с микрообъемами	1	Предназначен для контроля концентрации и качества препаратов ДНК после выделения, а также для нормализации препаратов ДНК.
10.	Станция автоматического дозирования жидкостей или эквивалент	1	Предназначена для внесения образцов ДНК в ПЦР-смесь при скрининговом типировании.
11.	Станция водоподготовки (дистиллятор)	1	По необходимости, если станция выделения ДНК работает на системной жидкости – воде. Вода должна быть деионизированной.
12.	Шкаф лабораторный	1	Предназначен для хранения расходных материалов с температурным режимом хранения – при комнатной температуре.
13.	Микроцентрифуга Макс. скорость вращения 14000 об,мин	1	Предназначена для выделения ДНК в ручном режиме
Помещение амплификации и учета результатов анализа			
1.	Холодильник двухкамерный с температурным режимом верхней камеры от 2 до 6 ⁰ С, с температурным режимом нижней камеры от минус 15 до минус 25 ⁰ С	2	1 – для хранения реагентов; 2 – для хранения продуктов амплификации, а также продуктов различных промежуточных стадий HLA-типирования.
2.	Термостат твердотельный	1	Предназначен для размораживания и прогрева различных реагентов.
3.	Микроцентрифуга/Вортекс	1	Предназначена для перемешивания различных растворов.
4.	Шкаф лабораторный	1	Предназначен для хранения

Иммуногенетическое обеспечение трансплантации солидных органов.
Рекомендации

			расходных материалов с температурным режимом хранения – при комнатной температуре.
5.	Комплект одноканальных механических дозаторов: - с режимом дозирования 0,5-10 мкл; - с режимом дозирования 1-20 мкл; - с режимом дозирования 20-200 мкл; - с режимом дозирования 100-1000 мкл	2	Предназначены для дозирования различных растворов. 1 комплект – в работе, 2 комплект – на поверке. Запрещено менять местами дозаторы из различных помещений!
6.	Комплект многоканальных механических дозаторов: - с режимом дозирования 0,5-10 мкл; - с режимом дозирования 1-20 мкл; - с режимом дозирования 20-200 мкл.	2	Предназначены для дозирования различных растворов. 1 комплект – в работе, 2 комплект – на поверке. Запрещено менять местами дозаторы из различных помещений!
7.	Амплификатор (для постановки планшет и микропробирок 0,2 мл)	6-8	Предназначены для проведения реакции амплификации, денатурации, секвенирующих ПЦР, гибридизации и других операций.
8.	Штатив-охладитель или ледяная баня	3-5	Предназначены для дозирования термочувствительных реагентов в планшеты и пробирки.
9.	Микроволновая печь	1	Приготовление агарозных гелей.
10.	Камера для проведения горизонтального электрофореза в агарозных гелях	2-3	Предназначена для детекции результатов анализа при проведении HLA-типирования по технологии SSP, контроля качества амплификации при проведении HLA-типирования по технологиям SSO и SBT.
11.	Столик для заливки агарозных гелей	2-3	При отсутствии в комплекте с камерой.
12.	Источник питания для электрофоретической камеры	2-3	
13.	Гель-документирующая система в комплекте с	1	Предназначена для визуализации результатов электрофореза.

Ассоциация специалистов и организаций лабораторной службы «ФЕДЕРАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ МЕДИЦИНЫ»
Комитет по лабораторной диагностике в неотложной медицине

Иммуногенетическое обеспечение трансплантации солидных органов.
Рекомендации

	трансиллюминатором		
14.	Центрифуга с ротором для планшет	2-3	Предназначена для краткого осаждения смесей в планшетах, центрифугирования планшет по заданной программе (согласно требованиям методики проведения испытаний).
15.	Система диагностическая для проведения автоматической гибридизации и учета результатов HLA-типирования по технологии SSO	1	Предназначена детекции результатов анализа при проведении HLA-типирования по технологии SSO.
16.	Секвенатор с числом капилляров в зависимости от загрузки лаборатории	1	Предназначен для проведения капиллярного электрофореза при использовании технологии SBT.
17.	Весы лабораторные	1	Приготовление навесок агарозы для приготовления агарозных гелей.
18.	Станция водоподготовки (дистиллятор)	1	Вода необходима для секвенатора. Вода должна быть очень высокого качества.
19.	Стол лабораторный	2	Предназначен для работы оператора.
20.	Компьютеры с ПО для анализа электрофореграмм, результатов гибридизации, секвенограмм	3	Предназначены для интерпретации полученных результатов.
21.	Оргтехника (компьютер, сканер, принтер, копир) для создания и постоянного обновления электронной базы	3	Предназначены для ведения документации.

Примерный бланк обследования реципиента и донора перед трансплантацией.

Реквизиты лаборатории

РЕЗУЛЬТАТЫ
иммуногенетического обследования донора и реципиента
для проведения трансплантации _____

Ф. И. О. реципиента:

Возраст:

Пол:

Группа крови:

ЛПУ:

Центр трансплантации:

HLA фенотип/генотип:

Предсуществующая сенсibilизация (% , специфичность):

(max % от г.)

Идентификация донора:

Возраст:

Пол:

Группа крови:

HLA фенотип/генотип:

Методы исследования:

Перекрестная проба на индивидуальную совместимость (кросс-матч):

« _____ » (сыворотка от « _____ » _____ 20 г.)

Методы исследования:

Заключение:

Дата исследования:

Врач:

Зав. лабораторией: