

**Едукација од областа на трансплантациона
имунологија и молекуларна биологија**

Чапа болница - Истанбул, Турција

(6 Септември - 30 Октомври 2015)



Др. Фљорије Рака

Институт за трансфузиона медицина - Скопје

18 Ноември 2015

Скопје

Типизација на ткива, флоуцитометрија и медицинска биологија

Медицински факултет - Оддел за медицинска
биологија

(Лабораторија за типизација на ткива)

Лабораторија за молекуларна генетика



HLA типизација (серолошка, молекуларна)


HLA антигените се интегрални мембрански протеини на клетката со клучна улога во имунитетот.

Бариера за орган/тквивната трансплантација

Имплицирани во развивањето на многу болести, особено автоимуните.

Две јасни класи на структурно слични HLA антигени со разлики во тквивната дистрибуција


- Class I HLA-A, -B, -C антигените: изразени на сите јадрени клетки
- Class II HLA-DR, -DQ, -DP антигените: изразени на В клетките, моноцитите, макрофагите, дендритичните клетки и активираните Т клетки.



HLA типизацијата идентификува уникатна констелација на HLA антигените кај една индивидуа.

Тестовите за типизација на HLA-class I (A, B, C) и class II (DR, DQ, DP) генските полиморфизми се интегрални во полето на:

- Трансплантација на коскена срцевина и солидни органи
- Студии за асоцијација со болести
- Развивање на вакцини и нивна апликација.



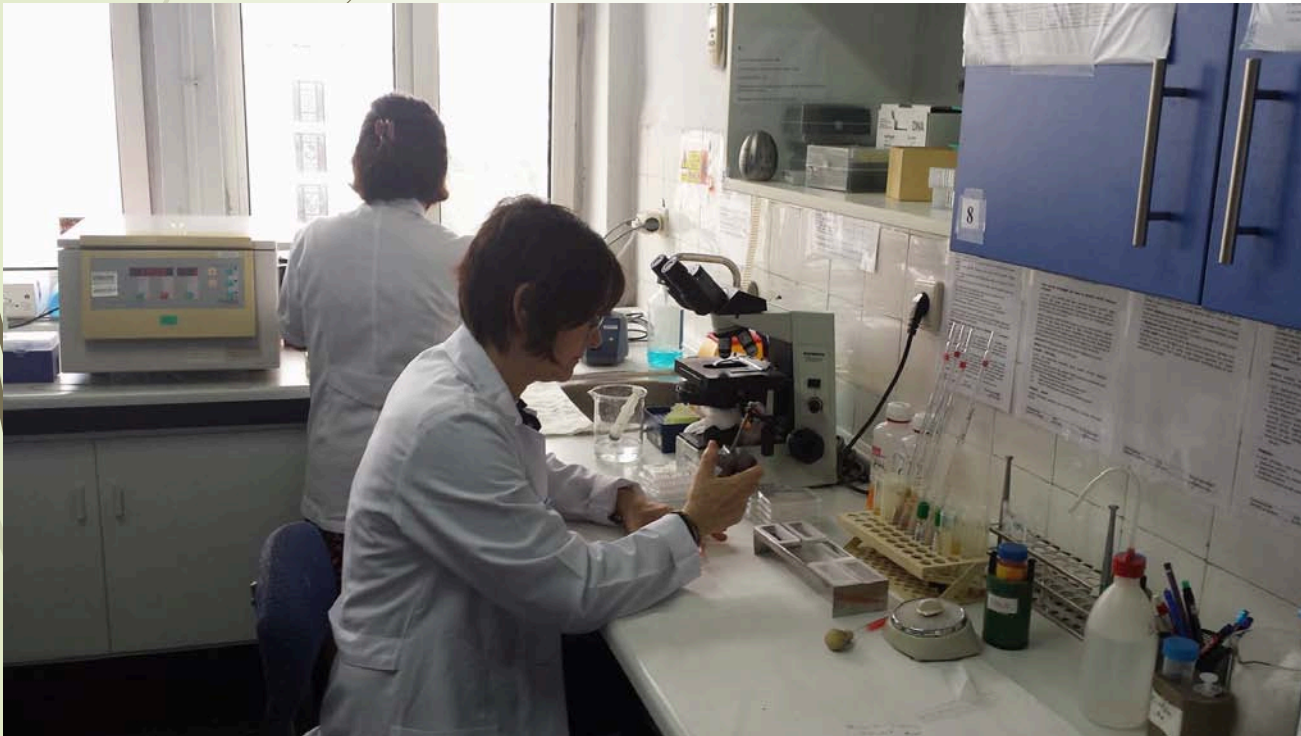
Во употреба се ДНК - базирани молекуларни дијагностички техники за идентификација на HLA гените со цел детекција на разлики на ниво на алели кои не би можеле да се детектираат преку серологија.

Во употреба се повеќе пристапи во HLA типизацијата, со Широк опсег на резолуција, од ниска (на ниво на антиген) до висока (на ниво на алел). Тестовите се базираат на амплификација на ограничени протегања на геномската ДНК во склоп на HLA гените.

Генските полиморфизми асоцирани со различни HLA алели се идентификуваат преку хибридизација со специфични амплификациски прајмери (SSP), проби (SSO) или преку директно секвенционирање (SBT).

HLA серолошка типизација (A, B, C) - употребува антиген-специфични серуми.

Серумите се од хумано потекло и реагираат со специфичните HLA антигени изразени на Le. По инкубација со цел овозможување антиген - антитело реакција, се додава комплемент за олеснување на клеточната лиза. Реакцијата се наблудува под микроскоп и градира во зависност од степенот на лиза. Тестот има ниска специфичност во споредба со молекуларното типизирање.



SSO - Реверзната SSO хибридизација се користи за утврдување на HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ и -DP локуси со интермедиерно ниво на резолуција, повисока од серолошката типизација.

Се користи при: - типизација со ниска или интермедиерна резолуција

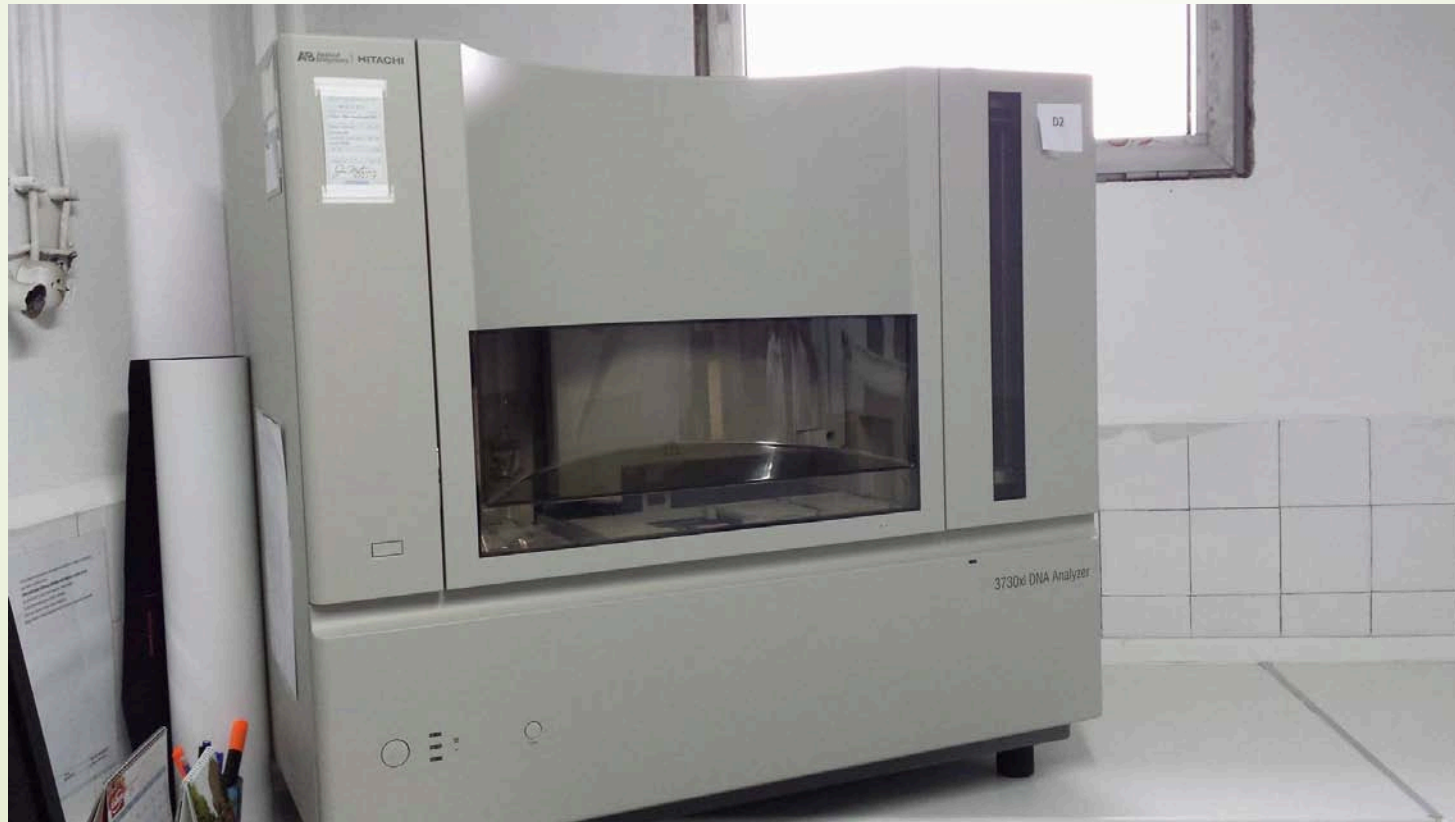
- скрининг тест за идентификација на потенцијалните донори.

SSP- PCR-SSP се користи за утврдување на HLA-A, -B, -C, -DR и DQ локуси со резолуција слична на серолошката, но може да се користи и за типизирање со висока резолуција.



SBT - обезбедува највисока резолуција при HLA типизација за HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ и -DP локус алелите.

SBT се користи кога е потребна највисоко ниво на типизација за донори и реципиент при трансплантација на матични клетки или испитување на асоцијација со болести.



Детекција на anti-HLA антитела

Присуството на циркулирачки антитела кои ги препознаваат HLA антигените на донорот на орган/ткиво, може да предизвика брза и неповратна деструкција на графтоот по трансплантацијата (хиперакутно отфрлање). Хиперакутните отфрлања се ретка појава бидејќи Лу од донорите се тестираат рутински за реактивност со антитела во серумот на потенцијалниот реципиент на трансплантот пред самата трансплантација. И мала количина на антитела би можеле да го оштетат графтоот, така да посензитивни методи се користат за crossmatch и препознавање на ризикот од антитело-посредувано имуно оштетување.

Crossmatch тестовите се користат првенствено кај кандидати за трансплантација, за проценка на соодветноста на потенцијалниот донор. Се користат и кај пациенти рефракторни на Тр трансфузии, како и кај пациенти со апластична анемија, кандидати за трансплантација на коскена срцевина кои би можеле да развијат анти-HLA антитела.



-CDC (Complement - dependent lymphocytotoxicity) cross match

Комплемент - зависната лимфоцитотоксичност ги препознава најважните антитела во crossmatch тестот - одговорни за хиперакутно отфрлање на графтот.

CDC XM се рапортира за позитивен или негативен во зависност од процентот на донор клетки лизирани од серумот на реципиентот, во присуство на комплемент и витална боја.

Позитивен cross match како резултат на присуство на IgG антитела насочени против HLA-A, -B, -C, -DR и -DQ антигените е јасна контраиндикација за трансплантација поради висок ризик од хиперакутно отфрлање.


Flow cytometric cross match (FCXM)

Flow цитометријата е најсензитивен метод за детекција на антитела присутни во нивоа кои не можат да се препознаат преку лимфоцитотоксичните тестови.

Flow цитометријата ги детектира IgG антителата.

Резултатите се рапортираат за позитивни или негативни врз база на поместување на медианата предизвикана од врзување на специфичното антитело.

Генерално, поместување на медианата над 50 (од вкупно 1024 канали), индицира дека антителото е присутно а над 150 индицира многу висок ризик и контраиндикација за ренална трансплантација (освен во исклучителни случаи). Поместување на каналите над 300 корелира со позитивен цитотоксичен cross match.



PRA (Panel Reactive Antibody): CDC и Luminex технологија

Luminex методологијата се употребува пред и после трансплантација за мониторирање на присуство/отсуство на anti-HLA class I и II антитела или пак појава/отсуство на антитета со тек на времето. Позитивните серуми се тестираат последователно со luminex class I и II анализите за идентификација со цел одредување на специфичноста на антителата.


Пиросеквенционирање

Претставува DNK секвенциона технологија основана на принципот на секвенцирање преку синтетизирање.

Развиена во Royal Institute of Technology (KTH) (Mostafa Ronhi and pal nyren , 1996).

Луминометриска детекција на пирофосфат ослободен во тек на нуклеотидна инкорпорација катализирана од DNK полимераза предводена од прајмер. Погодна за секвенционирање на DNK до 100 бази.





Real time PCR е напредна форма на полимераза веричжната реакција која го зголемува потенцијалот на оваа техника. PCR претставува револуција во детекцијата на RNK и DNK. Традиционалната PCR е напредната од детекција во крајната точка на реакцијата до детекција во тек на одвивањето на самата реакција.

Real-Time хемиската реакција дозволува детекција на PCR амплификацијата во тек на раните фази на реакцијата. Мерењето на кинетиката на реакцијата во раните фази на реакцијата, обезбедува јасна предност над традиционалната PCR детекција. Традиционалните методи користат агарозен гел за детекција на PCR амплификација во финалната или крајната точка на PCR реакцијата.

Real-Time реакцијата обезбедува брзи, прецизни и точни резултати.

Real-Time PCR е дизајнирана да ги прибира резултатите во тек на одвивањето на самата реакција. Што е поточно за DNK и RNK квантификацијата и не налага потреба од макотрпни пост-PCR методи.

Апликација:

RT PCR може да се применува за традиционалните PCR примени, како и за нови примени кои би биле помалку ефективни доколку би биле работени со традиционален PCR. Со можноста за прибирање на податоците во експоненцијалната фаза на раст, силата на PCR е проширена во следните примени:

1. Вирусна квантификација
2. Квантификација на генската експресија
3. Array верификација
4. Ефикасност на терапијата со лекови
5. Мерење на DNK оштетување
6. Контрола на квалитет и валидација на анализите
7. Детекција на патогени
8. Генотипизација

Во посетената лабораторија, се користеШе за одредување на MTHFR, F V, F II мутации



Испитување Химеризам

Тест за химеризам после трансплантација на хематопоеетски матични клетки вклучува идентификација на генетскиот профил на реципиентот и донорот а потоа евалуација на степенот на мешавина во крвта, коскената срцевина или друго ткиво на реципиентот. Тестирањето на химеризам (енграфтмент анализирање) се постигнува со анализа на генскиот полиморфизам наречени short tandem repeat (STR) локуси. Овие локуси се состојат од core DNA секвенца која се повторува различен број пати во склоп на дискретен генски локус.

Поимот STR се однесува на број на базни парови на тандем повторувана core DNK секвенца која се движи од 2-8 базни парови во должина. Овие локуси покажуваат алели кои се разликуваат во должина помеѓу индивидуите и се наследуваат кодоминантно.


Оваа техника може да ги амплифицира STR секвенците и до билион пати, обезбедувајќи материјал кој може да биде сепариран со гел електрофореза или капиларна електрофореза (CE). Генотипизација се врши преку евалуација на големината на ДНК фрагментите.

STR/CE системот базиран на PCR покажува повеќе предности во однос на другите методи на анализирање.

Амплификацијата на мултиплите STR локуси може да се комбинира во единечна туба, дозволувајќи анализирање до 16 локуси во една реакција. Потребни се минимални количини на ДНК па дури и деградирана ДНК (поради малата големина на STR алелите).

Дигиталните податоци ја олеснуваат анализата и архивирањето, а CE процесот е брз и евтин.

PCR амплификацијата и анализа на STR локусите обезбедува брз и сигурен метод за евалуација на енграфтмент статусот при трансплантација на матични клетки.




Во тек на PCR амплификацијата, амплифицираните фрагменти се обележуваат со флуоресцентна боја. По PCR амплификацијата, примероците се процесираат во систем за капиларна електрофореза.

Анализата на податоците е олеснета преку софтвер за анализа на фрагментите.

Индикации:

1. Рутинска пост-трансплантациона документација на донор/реципиент потеклото на Le во периферната крв и/или коскена срцевина.
2. Евалуација на донор/реципиент клетките при неадекватна функција на коскената срцевина.
3. Дефинирање дали рекурентниот или нов малигнитет потекнува од клетките на реципиентот или донорот
4. Проценка на прогностичките ризик фактори за отфрлање или рекурентен малигнитет
5. Документирање на истрајност на донор клетките после трансплантација кај пациенти со рекурентна болест или пред донор лимфоцитни инфузии.
6. Евалуација дали се појавило отфрлање на графтот кај реципиент - кандидати за втор трансплант.
7. Диференцирање на потеклото на донор клетки кај реципиентот кој примил втор трансплант со различен донор или двојна доза на умбиликална крв.
8. Детекција на присуство на матернални клетки кај пациент дијагностифициран со тешка комбинирана имунодефициенција (Severe Combined Immuno-Deficiency- (SCID).
9. Верификација на генетскиот идентитет на наводно идентични близнаци.



Во Институтот се користи Promegakit- Power Plex 16 HS System

1. Автоматска DNK изолација
2. PCR
3. Фрагмент анализа

Се врши во интервал од 30 дена по трансплантацијата на коскена срцевина а потоа:

- 3 месеци
- 6 месеци
- 1 година

Изолација на miRNA (за истражувачки цели)

Посети:

Банка за коскена срцевина (Bone marrow bank)

Во Р. Турција; 2 банки (Анкара и Истанбул) како дел од

Турк кок пројект (Turkok)

Основана во 1999 година.

28 000 донори

6 вработени (биолози, 2 сестри, администрација)

PRESCRIPTION FOR STEM CELL AND LYMPHOCYTE COLLECTION
Page 2 of 2

F40

HPC, Marrow First choice HPC, Apheresis Second choice T-Cells, Apheresis

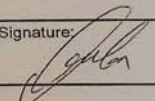
PATIENT DATA	
Patient name: Bedirhan Gürelek	Patient ID: (assigned by patient registry) TRS15-330
Patient registry: TRIS	Patient ID: (assigned by donor registry) 312122
Transplant center: Medicalpark Antalya Hospital Pediatric H	
DONOR DATA	
Donor registry: ZKRD	Donor ID: DE-DKM 7238240
TRANSPORT DATA	
Required anticoagulant:	Required anticoagulant:
<input type="checkbox"/> Heparin	<input type="checkbox"/> Heparin
<input type="checkbox"/> EDTA	<input type="checkbox"/> EDTA
<input type="checkbox"/> ACD	<input type="checkbox"/> ACD
<input type="checkbox"/> Other:	<input type="checkbox"/> Other:
Donor plasma required? <input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No	Donor plasma required? <input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
If yes, please indicate the desired final concentration:	If yes, please indicate the desired final concentration:
Transport temperature: 2-8 °C	Transport temperature: 2-8 °C
Preferred method of overnight storage of product(s) (if needed):	Preferred method of overnight storage of product(s) (if needed):
Additional instructions:	Additional instructions:

ADDITIONAL SAMPLES TO ACCOMPANY STEM CELL OR LYMPHOCYTE PRODUCT

Peripheral blood samples:	ml heparin	ml ACD	ml EDTA	ml no anticoagulant
ml product tube, type:			ml other:	
Samples to be taken on collection day:				
Additional comments:				

DISCLAIMER:

- The cell products collected from this donor are intended solely for the purpose of immediate therapeutic treatment for the above mentioned patient. Any planned cryopreservation of the cell products prior to initial infusion to the patient may only occur with the advance written approval from the donor center.
- Excess cells may be stored for future therapeutic treatment for this patient. No other uses of these cells are permissible. Cells not used for the therapeutic treatment of the above mentioned patient must be disposed of properly and details must be provided to the donor center.
- The donor center must be provided detailed information concerning the use and/or disposal of all portions of this cell product. By accepting these cells, the transplant physician also accepts these terms and conditions. Deviations from these terms are not permitted without prior written approval from the donor center.
- Any serious product events and/or adverse reactions must be reported both to the donor's registry and transplant center. Corresponding SEAR/SPEAR reports must be completed by the registry providing the product, submitted to the WMDA Office and details must provided to the donor center.

Person completing form: Merve Damla PINAR	Date (YYYY-MM-DD): 2015-10-16	Signature: 
--	----------------------------------	---

WMDA 20140724-DRWG-FORM-F40

Трансфузионен центар

- 1 хематолог
- 1 биолог
- 15 лаборанти
- ~100 донации дневно.
- 10-15% доброволни дарители



ЗАКЛУЧОЦИ

EFI акредитацијата на лабораториите обезбедува квалитет и сигурност во изведбата на имуногенетските техники.

Формирање на регистар на донори на коскена срцевина како и следственото зачленување во светската асоцијација на донори (WMDA) и учеството во EMDIS system (European Matching and Donor Information System) претставува чекор напред кон можноста за отпочнување на несродната алогена трансплантација во наШтата земја.

Употребата на методи со висока резолуција ги зголемува Шансите за преживување на графтоот.

СеролоШките методи во првата фаза од типизацијата можат да бидат кост-ефективни при типизирање сродни дарители.

Професионалната компетентност на персоналот е клучен фактор кој гарантира соодветна изведба, интерпретација и известување на сите лабораториски процедури.

