

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ



Первый заместитель Министра

Д.Л.Пиневиц

« 28 » сентября 2016 г.

Регистрационный № 068-10/6

**МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С ОБЩЕЙ  
ВАРИАБЕЛЬНОЙ ИММУННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ**

инструкция по применению

**УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:**

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический  
центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»,

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический  
центр радиационной медицины и экологии человека»

**АВТОРЫ:**

к.б.н, доцент Белевцев М.В., к.б.н. Саливончик А.П., Шитикова М.Г.,  
Плотникова Н.М., Сердюкова О.А., Алешкевич С.Н., к.б.н. Шарапова  
С.О., к.м.н., доцент Углова Т.А., Гурьянова И.Е., Сакович И.С., д.м.н,  
профессор, член-корреспондент НАНБ Алейникова О.В.

Минск, 2016

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АА – ацетат аммония

ВВИГ – иммуноглобулин человека нормальный для внутривенного введения

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

КМ – костный мозг

КТ – комнатная температура

МНК – моноклеарные клетки

ОВИН – общая переменная иммунная недостаточность

ПВД – первичные иммунодефициты

ПК – периферическая кровь

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

ТКИН – тяжелый комбинированный иммунодефицит

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

ЭДТА – этилен диамин тетроксусная кислота

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложены методы иммунологической и генетической диагностики, а также метод рациональной терапии пациентов с общей вариательной иммунной недостаточностью (ОВИН).

Инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-иммунологов, врачей-гематологов, врачей-педиатров, врачей-ревматологов и иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающим первичными иммунодефицитами.

### **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

D83.0 Общая вариательная иммунная недостаточность

### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Нет.

**ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ,  
РЕАКТИВОВ И РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ  
МЕДИЦИНСКИЕ ИЗДЕЛИЯ**

Термоциклер (ПЦР-амплификатор) для ПЦР в реальном времени.

Центрифуга с охлаждением для пробирок объемом 15-50 мл..

ПЦР бокс.

Аппарат для горизонтального электрофореза в агарозном геле.

Вортекс.

Водяная баня.

Генетический анализатор для проведения капиллярного электрофореза продуктов секвенирующей реакции.

Прибор, позволяющий измерять оптические свойства индивидуальных клеток в суспензии.

Документирующая система для визуализации результатов электрофореза.

Инкубатор для клеточных культур с 5% CO<sub>2</sub>

Магнитная мешалка с подогревом.

Морозильник -20<sup>0</sup>С..

Спектрофотометр.

Термомиксер.

Холодильник.

Центрифуга с охлаждением на 14000 об/мин (объем пробирок 1,5-2 мл).

Дозаторы для работы с объемами растворов в диапазоне от 0,1 до 1000 мкл..

**РЕАКТИВЫ**

KCl.

MgCl<sub>2</sub>.

NP40.

RPMI-1640.

SSC.

ДТТ.

Тақ ДНК полимераза.  
Агароза.  
Бромистый этидиум.  
Вода деионизованная.  
Набор праймеров.  
Моноклональные антитела для детекции субпопуляций лимфоцитов.  
Маркер молекулярного веса.  
Набор для выделения ДНК.  
Набор для секвенирования, содержащий флуоресцентно-меченые дидезоксинуклеотиды.  
Обратная транскриптаза.  
Олигонуклеотиды.  
Растворы дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (дНТФ).  
Раствор DAPI.  
Фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (25:24:1).  
Формальдегид 3,7%/ФСБ.  
Фосфатно-солевого буфер (ФСБ).  
Хлороформ.  
ЭДТА, 0,125М, рН 8,0,  
ЭТС (эмбриональная телячья сыворотка)  
Этанол, 70%.  
Этанол, 80%  
Этанол, 96%.

### **РАСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ**

Наконечники для дозаторов с аэрозольными барьерами (объем – от 0,1 до 1000 мкл).  
Пробирки (объем - 0,2-50 мл).  
Пробирки с антикоагулянтом (ЭДТА, цитратом натрия для молекулярно-биологических и иммунологических исследований).

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА ДИАГНОСТИКИ ПАЦИЕНТОВ С ОВИН:**

Схема метода включает в себя следующие этапы:

1. Определение концентрации Иммуноглобулинов класса G, M и A в сыворотке крови.
2. Определение титра антител к Ag группы крови (изогемагглютинины).
3. Проведение стандартного иммунологического исследования с определением относительного содержания T-, B-лимфоцитов и естественных киллеров методом проточной цитометрии.
4. Углубленное иммунофенотипирование субпопуляций B-лимфоцитов.
5. Проведение мутационного анализа генов лежащих в основе ОВИН методом секвенирования «следующего» поколения.

### **1. Определение концентрации иммуноглобулинов M, G, A в сыворотке крови**

Исследования проводятся турбидиметрическим или нефелометрическим методом с использованием тест-системы. Учет результатов проводится на анализаторе типа нефелометр (при длине волны 340 нм). Концентрация иммуноглобулинов рассчитывается в автоматическом режиме с учетом параметров калибровки стандартного образца, включаемого в комплект тест-систем. На основании градиента величины оптической плотности автоматически рассчитывается показатель концентрации иммуноглобулинов в исследуемом образце (в г/л).

### **2. Определение титра антител к Ag группы крови (изогемагглютинины)**

Проводят методом гемагглютинации с помощью стандартных гелевых карт путем смешивания сыворотки крови пациента со стандартами эритроцитов с определенным фенотипом согласно инструкции производителя.

### **3. Проведение иммунологического исследования с определением относительного содержания Т-, В-лимфоцитов и естественных киллеров методом безотмывочной технологии**

Для проведения стандартного иммунологического исследования у пациентов берут периферическую кровь в пробирки с антикоагулянтом ЭДТА (этилен-диамин тетрауксусная кислота). Иммунофенотипирование лимфоцитов проводят методом семицветной проточной цитометрии с использованием процедуры безотмывочного лизирования с использованием моноклональных антител, конъюгированных с FITC, фикоэритрином (PE), ECD, PC-5, PC-7, APC, APC-Alexa 750. Иммунологические параметры для исследования состояния иммунной системы включают в себя следующие показатели клеточного иммунитета:

- стандартное иммунологическое исследование: Т-лимфоциты (CD3+), Т-хелперы (CD3+CD4+), цитотоксические Т-клетки (CD3+CD8+), В-лимфоциты (CD19+), натуральные киллеры (CD3-CD16+CD56+).

### **4. Углубленное типирование В-лимфоцитов после выделения фракции мононуклеарных клеток.**

Для определения поверхностного иммунофенотипа В-лимфоцитов мононуклеары периферической крови выделяют на градиенте плотности Фиколл-Пака, отмывают в фосфатном буфере, инкубируют 15 минут в питательной среде RPMI-1640 при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Затем клетки осаждают и окрашивают моноклональными антителами, конъюгированными FITC, PE, PC-5, PC7.

Иммунологические параметры для углубленного определения В-лимфоцитов включают в себя следующие маркеры:

- IgD-переключенные В-лимфоциты памяти (CD19+CD27+IgD-), IgD-непереключенные В-лимфоциты памяти или В-лимфоциты маргинальной зоны (CD19+CD27+IgD+), наивные IgD+ В-лимфоциты (CD19+CD27-IgD+), IgM-переключенные В-лимфоциты памяти (CD19+CD27+IgM-), IgM-

непереключенные В-лимфоциты памяти или В-лимфоциты маргинальной зоны (CD19+CD27+IgM+), наивные IgM+ В-лимфоциты (CD19+CD27-IgM+), функционально-незрелые В-лимфоциты (CD19+CD21-, CD19+CD21-CD38-, CD19+CD21-CD38++), регуляторные В-лимфоциты (CD20+CD5+, CD19+CD24+++CD38++, CD19+CD38+++IgM++).

## **5. Проведение мутационного анализа генов лежащих в основе ОВИН методом секвенирования «следующего» поколения.**

### **Выделение ДНК из суспензии клеток**

1. Лизис. Клетки отмываются фосфатно-солевым буфере (PBS - phosphate buffered saline) или физиологическим раствором. После осаждения супернатант отбирается. Лизирующий буфер (100mM NaCl, 10mM TrisHCL, 25 mM EDTA, 0,5% SDS) – добавляется в объеме 100мкл на 1 млн, обычно 1000 мкл. Сразу после добавления лизат перемешивается пипетированием или на вортексе. Лизис проводится при 37-55°C при перемешивании в течении 2-24 часов, время лизиса зависит от выбранной температуры.

2. Экстракция фенол-хлороформной смесью (фен-хл-изоам.спирт 25:24:1 рН=7.5-8.5). Фенол-хлороформная смесь добавляется в лизат в равном объеме. Смесь перемешивается тщательным вортексированием. В результате должна образоваться молочно-белая эмульсия. Если фенол-хлороформ собирается каплями на дне и смесь сразу становится прозрачной, значит лизат слишком густой и необходимо разбавить его буфером для лизиса.

Центрифугировать 5 мин. при 10000 оборотах. Большим наконечником отобрать верхнюю фазу. Водная фаза переносится в новую подписанную пробирку. Добавляется равное количество изопропанола. Пробирку тщательно вортексируют, затем центрифугируют 30 минут при 14000 оборотах с охлаждением до 4°C. Собирается супернатант и к осадку добавляется 500 мкл лизирующего буфера. Перед второй экстракцией подержать пробирку в термомиксере +55°C до полного растворения осадка.



Высаливание белка. При добавлении больших концентраций соли белок выпадает в осадок, а ДНК остается в растворе. Для того чтобы белок осел, а ДНК осталась в растворе, необходимо очень качественный (жидкий и не вязкий) лизат. ДНК должна быть растворена в водной фазе, а не собираться в виде сгустков или комков, иначе будут большие потери. Очистка проходит лучше, если к водному раствору на этом этапе добавить немного (100-200 мкл) ДВ-буфера.

К лизату добавляется 8М ацетат аммония (АА) в объеме равном объему лизата. Смесь тщательно перемешивается на вортексе и охлаждается 5 минут в морозильнике. Пробирки оставляют на несколько часов или на ночь на +4°C.

Центрифугируем при максимальных оборотах 10 минут с охлаждением. Внимательно осмотреть осадок. Осадок белка кристаллический, напоминает снег или соль. Осторожно отобрать водную фазу и перенести в новую пробирку.

3. Осаждение и отмывка ДНК. Добавляется равное количество изопропанола. Пробирка тщательно вортексируются, затем центрифугируют 30 минут при 14000 оборотах с охлаждением до 4°C. Собирается супернатант и к осадку добавляется 500 мкл 70% этанола. Перемешать переворачиванием и ц/ф при макс. оборотах 5-10 мин. Затем жидкость отбирается (осторожно), осадок высушивается и растворяется в ТЕ буфере, в 30-200 мкл в зависимости от количества осадка. Если осадка очень много (рисовое зернышко) можно растворить в большем объеме ТЕ – 300-350 мкл, однако чистота ДНК в этом случае вызывает большие сомнения. Растворяют обычно в термомиксере 10 мин. – 1 час при 37°C. Затем измеряется концентрация ДНК и доводится ТЕ буфером до концентрации желательной не меньше 100 нг/мкл.

### **Подбор праймеров и условия амплификации**

Требования для праймеров: длина праймеров 18-22 нуклеотида. Температура отжига 55-65°C. Содержание GC 40-70%. Отсутствие на 3' конце стабильных петель. Неспособность формировать праймер-димеры со вторым праймером. Отсутствие кластеров повторяющихся нуклеотидов. Отсутствие альтернативных сайтов отжига прямого и обратного праймеров на ДНК человека в пределах одной

хромосомы. Условие для праймеров, чтобы в ходе ПЦР амплифицировались не только последовательности экзонов, но и сплайс-сайты.

#### Ген TAC1:

| Название праймера | Последовательность праймера | Количество нуклеотидов | Температура отжига праймеров | Размер продукта в bp |
|-------------------|-----------------------------|------------------------|------------------------------|----------------------|
| TAC1ex1f          | GAAGTGCAGCCCAAGCACTAAT      | 22                     | 59,4                         | 213                  |
| TAC1ex1r          | CTTTGCACCTGCTGGACCTT        | 20                     | 58,9                         |                      |
| TAC1ex2f          | CCAGCTGCCCTCACTCTC          | 18                     | 55,4                         | 209                  |
| TAC1ex2r          | TGATCACACTGTCCCCTCG         | 19                     | 56,4                         |                      |
| TAC1ex3f          | TCAAACCCAGAGTTCCTGC         | 19                     | 54,8                         | 353                  |
| TAC1ex3r          | TCTCACCTGCGTGACAC           | 18                     | 54,9                         |                      |
| TAC1ex4f          | AGAAGGCACTGCAGAGAGG         | 19                     | 54,2                         | 278                  |
| TAC1ex4r          | GGCTTGTCACCCAAGCA           | 17                     | 55                           |                      |
| TAC1ex5f          | GTCACCCCTACCCTAGTGC         | 19                     | 53,1                         | 509                  |
| TAC1ex5r          | CAAAGACCCAACCACAATG         | 19                     | 53,3                         |                      |

#### Ген BAFFR (TNFRSF13C):

| Название праймера | Последовательность праймера | Количество нуклеотидов | Температура отжига праймеров | Размер продукта в bp |
|-------------------|-----------------------------|------------------------|------------------------------|----------------------|
| BAFFR_1_F         | CAGCTTGTGCGGCGG             | 15                     | 58.60                        | 250                  |
| BAFFR_1_R         | GGGGGTCGGGGCTCT             | 15                     | 59.53                        |                      |
| BAFFR_2_1_F       | GGGCCCGCATCACC              | 15                     | 59.84                        | 335                  |
| BAFFR_2_1_R       | TCACCAGACCCACCAGGAC         | 19                     | 60.84                        |                      |
| BAFFR_2_2_F       | CCCGGGCTGCTCTTTGG           | 17                     | 60.42                        | 319                  |
| BAFFR_2_2_R       | GGACTATGTCTCCCTCCCA         | 20                     | 59.74                        |                      |
| BAFFR_3_F         | TCATTTGACGGAGGACTGCC        | 20                     | 60.04                        | 392                  |
| BAFFR_3_R         | TCCCAGAAAGAGGGCATGTG        | 20                     | 59.67                        |                      |

#### Ген CTLA4 (CD152):

| Название праймера | Последовательность праймера | Количество нуклеотидов | Температура отжига праймеров | Размер продукта в bp |
|-------------------|-----------------------------|------------------------|------------------------------|----------------------|
| CD152_1_F         | CTGAAGACCTGAACACCGCT        | 20                     | 59.97                        | 323                  |
| CD152_1_R         | CTTATTTGCTGCCGCCAAC         | 20                     | 60.46                        |                      |
| CD152_2_1_F       | TAGAAGGCAGAAGGGCTTGC        | 20                     | 60.04                        | 243                  |
| CD152_2_1_R       | ATCATGTAGGTTGCCGCACA        | 20                     | 60.04                        |                      |
| CD152_2_2_F       | ATCTCCAGGCAAAGCCACTG        | 20                     | 60.32                        | 434                  |
| CD152_2_2_R       | CCACCCACAATAAGCAAGGC        | 20                     | 59.47                        |                      |
| CD152_3_F         | TATTGGTGGGCTACCCATGC        | 20                     | 59.82                        | 406                  |
| CD152_3_R         | GCCTACGGTTCTAGTGCGTT        | 20                     | 60.11                        |                      |
| CD152_4_F         | AGTGGCTTCCGTATTCCTCAG       | 21                     | 59.52                        | 464                  |
| CD152_4_R         | GGGCTGTGCCATTCCCTAAC        | 20                     | 61.04                        |                      |

**Ген CD19:**

| Название праймера | Последовательность праймера | Количество нуклеотидов | Температура отжига праймеров | Размер продукта в bp |
|-------------------|-----------------------------|------------------------|------------------------------|----------------------|
| CD_19_1_F         | GACTGCCTGCCGCCC             | 15                     | 60.11                        | 335                  |
| CD_19_1_R         | GCAGAGTCCTTCCAACCCTT        | 20                     | 59.60                        |                      |
| CD_19_2_F         | AAGGGTTGGAAGGACTCTGC        | 20                     | 59.60                        | 495                  |
| CD_19_2_R         | CCCTCTCTCCAGCTCCATTG        | 20                     | 59.53                        |                      |
| CD_19_3_F         | GGCTTCGTGGCTTCAGTATG        | 20                     | 58.99                        | 429                  |
| CD_19_3_R         | TCTTCAGTTTCCCCTCCCCT        | 20                     | 59.80                        |                      |
| CD_19_4_F         | GTGATGACTGGGGAGATGCC        | 20                     | 60.18                        | 442                  |
| CD_19_4_R         | ACTTCTTCCCAGTACCCCA         | 20                     | 59.80                        |                      |
| CD_19_5_F         | CCTCAGACTTGCGGTTCTT         | 20                     | 59.96                        | 346                  |
| CD_19_5_R         | GGCTAGAGGAAGACTGGGGA        | 20                     | 60.03                        |                      |
| CD_19_6_F         | GAACCAAGTGACCTCCCCAG        | 20                     | 59.96                        | 268                  |
| CD_19_6_R         | GGCTTTGAGGTTGGGCAGTA        | 20                     | 60.25                        |                      |
| CD_19_7_F         | TCTATTGGCTGTCCCAGCAC        | 20                     | 59.75                        | 296                  |
| CD_19_7_R         | CAGCGGATTGGAGGGATGAG        | 20                     | 60.25                        |                      |
| CD_19_8_F         | AAACATCCTCTTCCCGTGCC        | 20                     | 60.32                        | 278                  |
| CD_19_8_R         | CACTATTCGGGCCACAGACC        | 20                     | 60.46                        |                      |
| CD_19_9-10_F      | ATGACTGGGAGAGGGAAGGG        | 20                     | 60.33                        | 490                  |
| CD_19_9-10_R      | GACTCAGCTGTGGCAGAAGA        | 20                     | 59.68                        |                      |
| CD_19_11-12_F     | AACGGTAACTTGGGGCCTTT        | 20                     | 59.81                        | 418                  |
| CD_19_11-12_R     | AGGATTGGGTTTCGGGTTTGG       | 20                     | 60.25                        |                      |
| CD_19_13-14_F     | CAGCACAGCATGGGTAATGC        | 20                     | 59.90                        | 475                  |
| CD_19_13-14_R     | CTGCCATCCGTGCCTATCTC        | 20                     | 60.32                        |                      |

**Ген CD20 (MS4A1):**

| Название праймера | Последовательность праймера | Количество нуклеотидов | Температура отжига праймеров | Размер продукта в bp |
|-------------------|-----------------------------|------------------------|------------------------------|----------------------|
| CD_20_2_F         | CGGAAGAGGCCATGTCTACC        | 20                     | 59.89                        | 381                  |
| CD_20_2_R         | GGCCTATACCGCATCAGCTT        | 20                     | 59.96                        |                      |
| CD_20_3_F         | CCAACCTTGTCTTTGCCTGC        | 20                     | 59.97                        | 265                  |
| CD_20_3_R         | CTGGCATATCCCTGTGGAGC        | 20                     | 60.25                        |                      |
| CD_20_4_F         | TGGGTGGATGGTTGTGTGAA        | 20                     | 59.45                        | 306                  |
| CD_20_4_R         | AGGGCTGAGAGGCTGTGATA        | 20                     | 60.03                        |                      |
| CD_20_5_F         | GTCAGGGCAGTTGCATTTGG        | 20                     | 60.04                        | 385                  |
| CD_20_5_R         | CAAGTCATCCTTCCCTCCCTGG      | 21                     | 59.79                        |                      |
| CD_20_6_F         | AACCATCTGTTGTGTGCCAA        | 20                     | 58.23                        | 416                  |
| CD_20_6_R         | AGCTCCTAGTTTCAACAАCTCA      | 22                     | 57.31                        |                      |
| CD_20_7_F         | TGTGGAGATTGTTGACAAAGGTG     | 21                     | 59.37                        | 404                  |
| CD_20_7_R         | CCAGATAGAGATGTGGTGCCT       | 23                     | 59.59                        |                      |

**Ген CD81:**

| Название праймера | Последовательность праймера | Количество нуклеотидов | Температура отжига праймеров | Размер продукта в bp |
|-------------------|-----------------------------|------------------------|------------------------------|----------------------|
| CD_81_1_F         | CGGGGCCTATGGAGGGG           | 17                     | 60.94                        | 424                  |
| CD_81_1_R         | CAACGTGGAGTGTGTGCCT         | 19                     | 60.52                        |                      |
| CD_81_2_F         | ATTGCGAAAACCAGCAGCAG        | 20                     | 60.04                        | 354                  |
| CD_81_2_R         | CTTTCACCCCTCCATGTCCCC       | 20                     | 60.03                        |                      |
| CD_81_3_F         | GAGGTCCCTTGCTGCTCATC        | 20                     | 60.46                        | 350                  |
| CD_81_3_R         | AATTCTAGGCTCCGCCCTGA        | 20                     | 60.69                        |                      |
| CD_81_4_F         | CCTCCCTGCGCTGAGTTTAA        | 20                     | 60.04                        | 382                  |
| CD_81_4_R         | CCCAGGAAGAGCCCAAAGAG        | 20                     | 60.03                        |                      |
| CD_81_5_F         | GGGAGAGCCTGGGAAAAGTG        | 20                     | 60.32                        | 352                  |
| CD_81_5_R         | CGAGGACCAGTTGAGACCAG        | 20                     | 59.76                        |                      |
| CD_81_6_F         | CATGGGTTCCCTAGAGCCAC        | 20                     | 59.82                        | 394                  |
| CD_81_6_R         | TCCACCTTCTTCACCCGGAA        | 20                     | 60.77                        |                      |
| CD_81_7_8_F       | TTACTGCGTGACAACGGGAA        | 20                     | 59.90                        | 398                  |
| CD_81_7_8_R       | TATACACAGGCGGTGATGGC        | 20                     | 59.89                        |                      |

**Ген ICOS:**

| Название праймера | Последовательность праймера | Количество нуклеотидов | Температура отжига праймеров | Размер продукта в bp |
|-------------------|-----------------------------|------------------------|------------------------------|----------------------|
| ICOS_1_F          | ACCCACTTCCTTTCCAGCAA        | 20                     | 59.44                        | 299                  |
| ICOS_1_R          | GCCCTTGGCCATATCCTGAA        | 20                     | 59.81                        |                      |
| ICOS_2_F          | TGGTGCAACAGAGATGACTTT       | 21                     | 57.79                        | 571                  |
| ICOS_2_R          | CTGCATCTAAGTGAACCTCCAACAC   | 24                     | 59.85                        |                      |
| ICOS_3_F          | AGGTTTGGTTTTGCACTGTGT       | 21                     | 59.10                        | 569                  |
| ICOS_3_R          | AGGAATTGTCTCCCTGTTGGT       | 21                     | 58.93                        |                      |
| ICOS_4_F          | AGCCAGGAACCTAAGTCACA        | 20                     | 58.27                        | 335                  |
| ICOS_4_R          | TTCTAGAATTAGGCCTTGGAGA      | 22                     | 55.98                        |                      |
| ICOS_5_F          | TGTAGGGAACCTGGCACATGG       | 20                     | 59.67                        | 272                  |
| ICOS_5_R          | AGAGGACTCGGCAGTACCAA        | 20                     | 60.25                        |                      |
| ICOS_5in_F        | TGCCCCGGAATTGAAAGCAAA       | 20                     | 58.96                        | 314                  |
| ICOS_5in_R        | TCAGGGGAGTCTCTCAACCC        | 20                     | 60.25                        |                      |

Для каждой пары праймеров была оптимизирована температура отжига.

**Полимеразно-цепная реакция (ПЦР)**

ПЦР реакции проводились в стандартных условиях. Микс на 10 реакций содержит: 5x ПЦР буфера 50 мкл, 15мкл MgCl<sub>2</sub>, 4 мкл дНТФ, по 1,25 мкл каждого праймера, 1мкл Таq полимеразы, 10 мкл 10% DMSO и 158 мкл воды.

Программа ПЦР: 1) 95° → 3 мин

2) 95° → 30 сек

3) Температура отжига праймеров → 20 сек

4) 72° → 30 сек

5) 72° → 5 мин

6) 4° → ∞

Пункты 2-4 повторяются 39 раз

Если по какой-либо причине ПЦР продукт не образуется или очень слабый используется другая программа:

1) 95° → 3 мин

2) 95° → 30 сек

3) 65 ° → 20 сек

4) 72° → 30 сек

5) 95° → 30 сек

6) Температура отжига праймеров → 20 сек

7) 72° → 30 сек

8) 72° → 5 мин

9) 4°-16 ° → ∞

Пункты 2-4 повторяются 15 раз, пункты 5-7 повторяются 30 раз.

Затем в 1,5% агарозный гель закапывается ПЦР продукт (каждый экзон в отдельную лунку) вместе с маркером для измерения концентрации. Форез идет 20 минут, после этого с помощью геледокументирующей системы измеряем концентрацию каждого ПЦР образца, для того, чтобы в дальнейшем рассчитать сколько ПЦР продукта добавлять в конечную смесь, чтобы каждый образец был представлен в равном количестве ДНК.

После этого все образцы объединяются в нужном объеме в одну пробирку. Для каждого пациента своя пробирка. К смеси ПЦР образцов добавляется В2 буфер (Binding buffer) в 4х кратном объеме. Полученный раствор вносят на колонку для очистки ПЦР продукта и центрифугируют 1

минуту при 10000 оборотах. Все что прошло через колонку и осталось на дне пробирки убирается. Затем на эту колонку добавляется 650 мкл W1 буфера (Wash buffer) и центрифугируют 1 минуту при 10000 оборотах. Все что прошло через колонку и осталось на дне пробирки убирается. Затем данную колонку центрифугируют 3 минуту при 14000 оборотах. После нижнюю пробирку выбрасывают и колонку помещают в новую чистую пробирку. Добавляют на колонку 50 мкл E1 буфера (Elution buffer) и оставляют лизироваться при комнатной температуре 5 минут. Потом колонку центрифугируют 3 минуту при 14000 оборотах. Нижнюю пробирку аккуратно вынимают и закрывают, в ней находится конечная очищенная смесь нужных экзонов. Колонку выбрасывают.

### **Пробоподготовка образцов для секвенирования.**

Для начала измеряем концентрацию образцов на Qubit, после этого разводим образец водой до концентрации 0,2 нг/мкл.

### **Работа с образцами для секвенирования.**

Вся механика работы с образцами указана в протоколе Illumina. Затем готовится PhiXControl («библиотека») также по протоколу от Illumina. И запускается прибор.

Секвенатор MiSeq работает до 24 часов, затем полученная информация анализируется в облаке программы Galaxy. Полученную из прибора последовательность нуклеотидов сравнивают по 38 сборке. Если при анализе обнаруживается значимая мутация, данный экзон в дальнейшем подвергается протоколу действий для прямого капиллярного секвенирования для подтверждения полученного результата.

Постановка окончательного диагноза происходит по результатам полученным при иммунологических исследованиях и выявленных генетических нарушениях.

## ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА РАЦИОНАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ ПАЦИЕНТОВ С ОВИН

Минимальный целевой уровень иммуноглобулина G при постоянной заместительной терапии лекарственными средствами на основе иммуноглобулина человеческого нормального  $\geq 5$  г/л. Заместительная терапия **не отменяется** при нормальном уровне иммуноглобулина в сыворотке крови пациента.

Внутримышечное введение иммуноглобулина для заместительной терапии не допускается. Заместительная терапия проводится только лекарственными средствами на основе иммуноглобулина человека нормального для внутривенного введения или иммуноглобулина человека нормального для подкожного введения.

Перед началом протокола заместительной терапии иммуноглобулина необходимо получение письменного согласия пациента или одного из родителей/законных представителей пациента детского возраста на основе информации (информированного согласия) о пользе и возможном риске данного метода лечения.

Требования к лекарственному средству на основе иммуноглобулина для внутривенного введения:

- ВВИГ должен быть получен только из плазмы крови не менее 1000 доноров не должен содержать антибиотики и продукты, используемые для инактивации вирусов;
- содержание IgG в препарате должно быть не менее 95% и сохранены все подклассы IgG;
- вирусная безопасность должна быть обеспечена не менее чем 2-мя этапами вирусной инактивации, включая сольвент-детергентную обработку и тестирование исходного сырья на наличие 5 вирусов

(ВИЧ 1/2, возбудителей гепатита А, гепатита В, гепатита С, парвовируса В19);

- антикомплементарная активность – не более 1СН50/мл;
- активатор прекалликреина – не более 35МЕ/мл;
- питры антиА- и антиВ- геммаглоутининов - 1:64;
- функция Fc части иммуноглобулиновой молекулы - не менее 94%;
- содержание общего белка - не менее 4.5%;
- содержание иммуноглобулина А - не более 0.2 мг/мл;
- содержание натрия - не более 16 ммоль/л;
- наличие агрегатов и полимеров - не более 3%.

Начало заместительной терапии препаратами ВВИГ:

1. Пациентам, у которых инициальный уровень иммуноглобулина менее 5г/л (у взрослых) и менее 2 SD от возрастной нормы (у детей) ВВИГ вводится в дозе 0,2г/кг/сут. еженедельно до достижения оптимального уровня.
2. По достижении оптимального уровня поддерживающая терапия проводится от образа жизни и состояния пациента (таблица 1).
3. Вследствие потенциальной опасности развития нежелательных явлений препараты ВВИГ вводятся в условиях дневного стационара или в стационаре круглосуточного пребывания.
4. При высокой частоте развития нетяжелых побочных реакций, развитии системных нежелательных явлений, плохом венозном доступе и/или предпочтении пациента заместительная терапия проводится препаратами иммуноглобулина человека нормального для подкожного введения.



Требования к лекарственному средству иммуноглобулина для подкожного введения:

- вирусная безопасность должна быть обеспечена не менее 2-мя этапами вирусной инактивации,
- тестирования исходного сырья на наличие 5 вирусов (ВИЧ 1/2, возбудителей гепатита А, гепатита В, гепатита С, парвовируса В19);
- содержание общего белка - не менее 140 мг/мл;
- титры антиА- и антиВ- геммаглобулинов - не более 1:64;
- содержание IgA - не более 85 мкг/мл;
- содержание IgG - не менее 95%;
- содержание натрия - не более 3 мг/мл;
- наличие агрегатов и полимеров - не более 10%;
- клинически доказанная безопасность применения.

Если пациент не начинал заместительной терапии, то ему вводится ВВИГ 1г/кг/сут., затем через 7 дней - иммуноглобулин для подкожного введения (0,1 г/кг/сут. еженедельно) с последующей корректировкой дозы в зависимости от уровня сывороточного IgG.

Если пациент получал заместительную терапию ВВИГ, месячная доза препарата ВВИГ делится на 4. Это и будет являться еженедельной дозой препарата иммуноглобулина для подкожного введения. Начинают введение через неделю после последнего введения ВВИГ. Интервал введения также зависит от инициального уровня иммуноглобулина и скорости катаболизма, конкретной клинической ситуации у пациента.

Объем введения в один участок 0,176 мл/кг (не более 25 мл у взрослых и 15 мл у детей) или 20 мл/участок для пациентов с весом <40 кг и 30 мл/участок - > 40 кг.

Препараты иммуноглобулина для подкожного введения могут вводиться пациенту в домашних условиях медицинским персоналом, родителями или

партнерами пациента, а также самим пациентом после предварительного обучения.

### **Перечень возможных осложнений в выполнении метода и пути их устранения**

Возможные сложности в проведении генетической диагностики первичных иммунодефицитов с нарушением центральной и периферической толерантности и способы их устранения изложены в таблице 1.

Таблица 1 – Возможные сложности в проведении генетической диагностики первичных иммунодефицитов и способы их устранения

| <b>Проблемы</b>                    | <b>Способы разрешения</b>   |
|------------------------------------|---|
| ПЦР не проходит                    | Проверить качество ДНК, очистить ДНК методом высаливания, повторить мутационный анализ на свежесыведенной ДНК |
| SSCP не проходит                   | Проверить качество реагентов и ДНК, условия проведения и температуру в помещении, повторить анализ            |
| Реакция секвенирования не проходит | Проверить количество ДНК в образце, повторить реакцию секвенирования  |

Таблица - Расчет необходимой дозы препарата ВВИГ в зависимости от инициального уровня IgG пациента и интервалов введения.

| Уровень IgG перед введением ВВИГ (г/л) | Доза ВВИГ                                   |      |      |      | Доза ВВИГ                                   |      |      |      | Доза ВВИГ                                   |      |      |      | Доза ВВИГ                                   |      |      |      | Доза ВВИГ                                   |      |      |      |
|--|---|------|------|------|---|------|------|------|---|------|------|------|---|------|------|------|---|------|------|------|
|  | 0,1   | 0,2  | 0,3  | 0,4  | 0,1   | 0,2  | 0,3  | 0,4  | 0,1   | 0,2  | 0,3  | 0,4  | 0,1   | 0,2  | 0,3  | 0,4  | 0,1   | 0,2  | 0,3  | 0,4  |
|  | г/кг  | г/кг | г/кг | г/кг | г/кг  | г/кг | г/кг | г/кг | г/кг  | г/кг | г/кг | г/кг | г/кг  | г/кг | г/кг | г/кг | г/кг  | г/кг | г/кг | г/кг |
|  | Уровень IgG (г/л) через 1 неделю после ВВИГ |      |      |      | Уровень IgG (г/л) через 2 недели после ВВИГ |      |      |      | Уровень IgG (г/л) через 3 недели после ВВИГ |      |      |      | Уровень IgG (г/л) через 4 недели после ВВИГ |      |      |      | Уровень IgG (г/л) через 5 недель после ВВИГ |      |      |      |
| <b>1,0</b>                             | 2,4   | 2,7  | 3,1  | 3,4  | 1,9   | 2,3  | 2,6  | 2,9  | 1,5   | 1,8  | 2,2  | 2,5  | 1,5   | 1,9  | 2,2  | 2,5  | 1,0   | 1,3  | 1,6  | 2,0  |
| <b>1,25</b>                            | 2,6   | 2,9  | 3,2  | 3,6  | 2,1   | 2,4  | 2,8  | 3,1  | 1,7   | 2,0  | 2,4  | 2,7  | 1,7   | 2,1  | 2,4  | 2,7  | 1,1   | 1,5  | 1,8  | 2,1  |
| <b>1,5</b>                             | 2,7   | 3,1  | 3,4  | 3,7  | 2,3   | 2,6  | 2,9  | 3,3  | 1,9   | 2,2  | 2,5  | 2,9  | 1,9   | 2,2  | 2,6  | 2,9  | 1,3   | 1,7  | 2,0  | 2,3  |
| <b>1,75</b>                            | 2,9   | 3,3  | 3,6  | 3,9  | 2,4   | 2,8  | 3,1  | 3,4  | 2,0   | 2,4  | 2,7  | 3,0  | 2,1   | 2,4  | 2,7  | 3,1  | 1,5   | 1,8  | 2,2  | 2,5  |
| <b>2,0</b>                             | 3,1   | 3,4  | 3,8  | 4,1  | 2,6   | 2,9  | 3,3  | 3,6  | 2,2   | 2,5  | 2,9  | 3,2  | 2,2   | 2,6  | 2,9  | 3,2  | 1,7   | 2,0  | 2,3  | 2,7  |
| <b>2,25</b>                            | 3,3   | 3,6  | 3,9  | 4,3  | 2,8   | 3,1  | 3,4  | 3,8  | 2,4   | 2,7  | 3,0  | 3,4  | 2,4   | 2,7  | 3,1  | 3,4  | 1,8   | 2,2  | 2,5  | 2,8  |
| <b>2,5</b>                             | 3,4   | 3,8  | 4,1  | 4,4  | 3,0   | 3,3  | 3,6  | 4,0  | 2,5   | 2,9  | 3,2  | 3,6  | 2,6   | 2,9  | 3,2  | 3,6  | 2,0   | 2,3  | 2,7  | 3,0  |
| <b>2,75</b>                            | 3,6   | 3,9  | 4,3  | 4,6  | 3,1   | 3,5  | 3,8  | 4,1  | 2,7   | 3,1  | 3,4  | 3,7  | 2,7   | 3,1  | 3,4  | 3,7  | 2,2   | 2,5  | 2,8  | 3,2  |
| <b>3,0</b>                             | 3,8   | 4,1  | 4,4  | 4,8  | 3,3   | 3,6  | 4,0  | 4,3  | 2,9   | 3,2  | 3,6  | 3,9  | 2,9   | 3,3  | 3,6  | 3,9  | 2,3   | 2,7  | 3,0  | 3,3  |
| <b>3,5</b>                             | 4,1   | 4,5  | 4,8  | 5,1  | 3,6   | 4,0  | 4,3  | 4,6  | 3,2   | 3,6  | 3,9  | 4,2  | 3,3   | 3,6  | 3,9  | 4,3  | 2,7   | 3,0  | 3,4  | 3,7  |
| <b>4,0</b>                             | 4,5   | 4,8  | 5,1  | 5,5  | 4,0   | 4,3  | 4,6  | 5,0  | 3,6   | 3,9  | 4,2  | 4,6  | 3,6   | 3,9  | 4,3  | 4,6  | 3,0   | 3,4  | 3,7  | 4,0  |
| <b>4,5</b>                             | 4,8   | 5,1  | 5,5  | 5,8  | 4,3   | 4,7  | 5,0  | 5,3  | 3,9   | 4,3  | 4,6  | 4,9  | 4,0   | 4,3  | 4,6  | 4,9  | 3,4   | 3,7  | 4,0  | 4,4  |
| <b>5,0</b>                             | 5,2   | 5,5  | 5,8  | 6,2  | 4,7   | 5,0  | 5,3  | 5,7  | 4,3   | 4,6  | 4,9  | 5,3  | 4,3   | 4,6  | 5,0  | 5,3  | 3,7   | 4,1  | 4,4  | 4,7  |
| <b>6,0</b>                             | 5,8   | 6,2  | 6,5  | 6,8  | 5,4   | 5,7  | 6,0  | 6,4  | 4,9   | 5,3  | 5,6  | 5,9  | 5,0   | 5,3  | 5,6  | 6,0  | 4,4   | 4,7  | 5,1  | 5,4  |
| <b>6,5</b>                             | 6,2   | 6,5  | 6,8  | 7,2  | 5,7   | 6,0  | 6,4  | 6,7  | 5,3   | 5,6  | 6,0  | 6,3  | 5,3   | 5,7  | 6,0  | 6,3  | 4,7   | 5,1  | 5,4  | 5,7  |
| <b>7,0</b>                             | 6,5   | 6,9  | 7,2  | 7,5  | 6,0   | 6,4  | 6,7  | 7,0  | 5,6   | 6,0  | 6,3  | 6,6  | 5,7   | 6,0  | 6,3  | 6,7  | 5,1   | 5,4  | 5,8  | 6,1  |
| <b>8,0</b>                             | 7,2   | 7,5  | 7,9  | 8,2  | 6,7   | 7,0  | 7,4  | 7,7  | 6,3   | 6,7  | 7,0  | 7,3  | 6,4   | 6,7  | 7,0  | 7,4  | 5,8   | 6,1  | 6,4  | 6,8  |