

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 615.361.4-013.3:612.6.02.017.1.088

Логинова М.А.¹, Павлов А.Е.², Зайцева М.А.², Симакова Т.С.², Пильщикова Н.С.², Парамонов И.В.¹

РАЗРАБОТКА И ВЕРИФИКАЦИЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО HLA-ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ДОНОРОВ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

¹ФГБУН Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови ФМБА России, 610027, Киров;

²ООО «ПАРСЕК ЛАБ», 197350, Санкт-Петербург

Представлены данные о разработке и верификации отечественной тест-системы для высокопроизводительного HLA-генотипирования с использованием платформы Illumina MiSeq System. Разработанная тест-система включает в себя все компоненты, необходимые для таргетного обогащения пяти генов HLA и приготовления библиотек. Учет результатов осуществляется с использованием специализированного программного обеспечения для автоматического анализа данных. Тест-система верифицирована на выборке из 93 образцов ДНК с известными HLA-генотипами. В ходе верификации определены чувствительность и специфичность тест-системы по каждому из HLA-локусов: для локусов A и B они составили 1.0 и 1.0 соответственно, для локуса C – 1.0 и 0.99, для локуса DRB1 – 0.98 и 0.99, для локуса DQB1 – 0.98 и 0.93.

Ключевые слова: HLA-типирование; тест-система; массовое параллельное секвенирование; HLA-локусы; разработка; верификация.

Для цитирования: Логинова М.А., Павлов А.Е., Зайцева М.А., Симакова Т.С., Пильщикова Н.С., Парамонов И.В. Разработка и верификация тест-системы для высокопроизводительного HLA-генотипирования потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (12): 788-792. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-12-788-792>

Loginova M.A.¹, Pavlov A.E.², Zaytseva M.A.², Simakova T.S.², Pilshchikova N.S.², Paramonov I.V.¹

DESIGN AND VERIFICATION OF THE REAGENT KIT FOR HIGH-PRODUCTIVE HLA-TYPING OF POTENTIAL DONORS OF HEMOPOIETIC STEM CELLS

¹FSBIS Kirov scientific-research institute of hematology and blood transfusion of FMBA of Russia, Kirov, 610027, Russian Federation;

²Parseq Lab, Saint-Petersburg, 197350, Russian Federation

The work describes the development of a reagent kit for high-performance HLA-typing using the Illumina MiSeq System platform. The developed reagent kit contains all the necessary components for target enrichment of five HLA genes, preparation of libraries, and software for automatic data analysis. The reagent kit verified on a 93 DNA samples with known genotypes. During the verification, the sensitivity and specificity of the reagent kit for each of the HLA loci were determined - for A and B they were 1.0 and 1.0, respectively, for the C-1.0 and 0.99 locus, for the DRB1 locus 0.98 and 0.99, for the DQB1 locus 0.98 and 0.93.

Key words: HLA-typing; reagent kit; massive parallel sequencing; HLA-loci; design; verification.

For citation: Loginova M.A., Pavlov A.E., Zaytseva M.A., Simakova T.S., Pilshchikova N.S., Paramonov I.V. Design and verification of the reagent kit for high-productive HLA-typing of potential donors of hemopoietic stem cells. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika. (Russian Clinical Laboratory Diagnostic). 2018; 63(12): 788-792 (In Russ.)

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-12-788-792>

For correspondence: Loginova M.A., PhD, head of Research Laboratory of applied immunogenetics; e-mail: mlogin2010@gmail.com

Information about authors:

Loginova M.A., <http://orcid.org/0000-0001-7088-3986>

Pavlov A.E., <http://orcid.org/0000-0002-9233-1688>

Zaytseva M.A., <http://orcid.org/0000-0002-3616-0300>

Simakova T.S., <http://orcid.org/0000-0001-9023-4852>

Pilshchikova N.S., <http://orcid.org/0000-0002-8329-3747>

Paramonov I.V., <http://orcid.org/0000-0002-7205-912X>

Conflict of interest. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 22.11.2018
Accepted 01.12.2018

Введение. В последние годы молекулярно-генетические методы, основанные на технологии секвенирования нового поколения (NGS – Next Generation Sequence), находят все более широкое практическое применение [1].

Одним из важнейших направлений, где применение указанной технологии следует признать перспективным и экономически обоснованным, является массовое HLA-типирование потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), заключивших информированное согласие на вступление в российские регистры.

По состоянию на 11 октября 2018 г., число потенциальных доноров ГСК, зарегистрированных в объединенной базе данных о российских донорах BMDS (Bone Marrow Donor Search), составляет 85 181 человек, в неё включены сведения о донорах 15 локальных регистров, действующих в 11 регионах Российской Федерации [2]. Такое количество безвозмездных доноров на сегодняшний день уже обеспечило 229 трансплантаций ГСК для пациентов российских клиник [2].

В последние пять лет наметился явный прогресс во взаимодействии трансплантационных клиник с BMDS, однако многие российские пациенты по-прежнему зависят от донорского материала, получаемого из-за рубежа, либо вообще остаются без совместимого неродственного донора [3].

Сложившаяся ситуация требует увеличения числа потенциальных доноров ГСК в короткие сроки, а трансплантационные центры диктуют необходимость HLA-типирования доноров молекулярно-генетическими методами в высоком разрешении и как минимум по пяти HLA-локусам. Прогресс в расширении донорской базы ограничивается прежде всего высокой стоимостью реагентов, используемых для проведения массового HLA-типирования доноров и низкой производительностью анализа. Разработка и внедрение отечественной тест-системы с высокими технико-экономическими показателями представляется крайне актуальной задачей.

Цель работы - разработка и верификация тест-системы для высокопроизводительного HLA-типирования.

Материал и методы. Все исследования проводили с использованием базы данных HLA-аллелей - IMGT/HLA 3.28.0 (update 2017-04).

Принцип работы разработанной тест-системы основывается на таргетном обогащении 5 локусов HLA (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DQB1, HLA-DRB1) методом ПЦР (полимеразной цепной реакции) длинных фрагментов с последующим приготовлением библиотек для секвенирования на приборах серии MiSeq™ System (Illumina Inc., США).

Праймеры на анализируемые регионы HLA были

подобраны с применением программного обеспечения Primer3Plus.

Разработка и верификация тест-системы проводилась на амплификаторах Applied Biosystems® Veriti® 96-Well Thermal Cycler и StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Fischer Scientific, США).

Верификацию тест-системы осуществляли на выборке из 93 образцов ДНК с известными генотипами, которые были предварительно исследованы по локусам HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 с использованием наборов реагентов HLAAssure SE SBT Kit (TBG Diagnostics Limited, Тайвань); для анализа данных применяли программное обеспечение AccuType™ (Texas Bio Gene Inc., Texas, США). Характеристики контрольных образцов ДНК представлены в табл. 1.

Препараты ДНК были получены методом колоночной фильтрации с помощью наборов QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN GmbH, Германия). Концентрацию препаратов ДНК определяли на флуориметре Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, США); для проведения анализа все образцы были нормализованы до концентрации 10 нг/мкл.

Показатель чувствительности тест-системы (доля совпадающих аллелей) рассчитывали как отношение числа совпадающих аллелей к общему числу аллелей.

Показатель специфичности тест-системы (доля однозначных аллелей) определяли как отношение числа аллелей с однозначно определенным генотипом к общему числу аллелей.

Результаты. Разработка. На первом этапе были определены технические требования для тест-системы - выбрана технологическая платформа, число исследуемых генетических локусов, уровень разрешения HLA-типирования, сформулированы требования к анализу данных.

В настоящее время наибольшее распространение в практике получили четыре технологии HLA-типирования: SSP (Sequence Specific Primers), SSO (Sequence Specific Oligonucleotides), SBT (Sequence Based Typing) и NGS. Метод SSP характеризуется низкой производительностью, SSO – невозможностью определения отдельных точечных вариаций, что особенно актуально при исследовании биологических образцов от доноров ГСК, относящихся к малоизученным популяциям, к которым следует отнести и большинство популяций, проживающих на территории РФ [4]. Технология SBT признана «золотым стандартом» HLA-типирования, с точки зрения идентификации новых аллелей, а при использовании современных много капиллярных секвенаторов обладает и высокой производительностью. Однако даже существенное масштабирование исследований, выполняемых методом SBT, практически не снижает стоимости типирования. При необходимости изучения дополнительных экзонов/интронов затраты на SBT-типирование возрастают. Наиболее перспективным, с точки зрения увеличения производительности и существенного снижения стоимости HLA-типирования, представляется применение технологии массового параллельного секвенирования – MPS. В качестве платформы для проведения этапа секвенирования при типировании по технологии MPS нами был выбран прибор Illumina MiSeq System (Illumina, США). Выбор в пользу указанного прибора сделан по следующим причинам:

режим парно концевое секвенирование позволяет проводить секвенирование фрагментов библиотек (до

Таблица 1
Характеристики контрольных образцов ДНК

Локус	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DQB1	HLA-DRB1
Количество уникальных образцов	92	93	93	92	84
Количество уникальных генотипов	42	79	59	47	66
Количество уникальных аллелей	18	36	20	16	29

Таблица 2

Таргетные регионы

Локус	Таргетный регион	Размер амплифицируемого участка, т.п.н
HLA-A	весь ген	~3,2
HLA-B	весь ген	~4,6
HLA-C	весь ген (кроме участка 3'-UTR)	~3,0
HLA-DQB1	1-4 экзоны	~6,1
HLA-DRB1	2-4 экзоны	~4,3

Таблица 3

Программа таргетного обогащения локусов I класса

Количество циклов	Температура	Время
1	94°C	2 мин
35	98°C	10 сек
	67°C*/60°C**/65°C***	15 сек
	68°C	3 мин*/5 мин**/5 мин***
1	68°C	10 мин
1	4°C	не ограничено

Примечание: * - для локуса HLA-A, ** - для локуса HLA-B, *** - для локуса HLA-C

Таблица 4

Программа таргетного обогащения локусов II класса

Количество циклов	Температура	Время
1	94°C	2 мин
35*/30*	98°C	10 сек
	60°C*/62°C**	15 сек*/30 сек**
	68°C	6 мин*/7 мин**
1	68°C	10 мин
1	4°C	не ограничено

Таблица 5

Характеристики наборов для секвенирования

Характеристика	Набор		
	MiSeq Reagent Kit v2 (300 циклов)	MiSeq Reagent Kit v2 (500 циклов)	MiSeq Reagent Kit Nano (300 циклов)
Длина прочтения	2×150 п.н.	2×250 п.н.	2×150 п.н.
Время секвенирования	24 ч	38 ч	17 ч
Число прочтений	15 млн	15 млн	1 млн
Объем данных	4,5-5,1 Gb	7,5-8,5 Gb	300 Mb
Расчетное число образцов на запуск (максимально возможное)	96	167	14

1200 п.н.), превышающих длину прочтения, что дает возможность учитывать наличие вставки при выравнивании на аллель, тем самым повышая информативность данных при работе с высоко гомологичными регионами генома;

работа с прибором достаточно проста и не требует большого количества ручных манипуляций;

наличие Регистрационного Удостоверения Минздрава РФ.

Количество типизируемых локусов и уровень разрешения были определены, исходя из потребностей рос-

сийских трансплантационных центров – потенциальных потребителей услуг донорских регистров, осуществляющих подбор доноров по пяти HLA-локусам HLA-A, -B, -C, -DQB1, -DRB1 в разрешении 4-digit.

Стандартный протокол проведения таргетного MPS исследования включает в себя следующие этапы: таргетное обогащение, приготовление библиотек, секвенирование и анализ данных.

Для таргетного обогащения целевых генов были подобраны 15 локус-специфичных праймеров: 2 на локус HLA-A, 2 – на HLA-B, 2 – на HLA-C, 4 – на HLA-DQB1, 5 – на HLA-DRB1. Для локусов II класса были выбраны вырожденные праймеры, необходимые для увеличения эффективности ПЦР в случае отжига праймера на аллельный вариант. Участки HLA-генов, покрываемые праймерами, представлены в табл. 2.

Условия реакций ПЦР длинных фрагментов были подобраны отдельно для каждого локуса. Продолжительность циклов ПЦР для HLA-локусов составила 3,0-3,8 ч. Программы амплификации для локусов I и II классов представлены в табл. 3 и 4, соответственно.

Наличие различных программ для амплификации фрагментов каждого локуса в отдельности потребовало ввести стадию пулирования полученных продуктов ПЦР перед этапом приготовления библиотек, но при этом позволило обеспечить высокую специфичность всех выбранных пар праймеров.

Этап приготовления библиотек, реализованный в разработанной тест-системе, включал в себя стадии, представленные на рисунке.

Разработка протокола исследования включала в себя выбор оптимального количества этапов, подбор и разработку реактивов, а также оптимизацию работы ферментативных смесей и условий инкубации на всех этапах протокола.

Процесс приготовления библиотек содержал 3 этапа очистки с использованием магнитных частиц Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter), с одновременной селекцией фрагментов по размеру для удовлетворения требований прохождения порогов контроля качества по размеру вставки при анализе данных.

Готовые библиотеки подвергались нормализации до концентрации 1300 нг/мкл и пулировались для получения образца для секвенирования на приборе Illumina MiSeq System.

В ходе разработки в запусках секвенирования были использованы различные наборы, представленные в табл. 5.

Из данных, представленных в таблице 5, видно, что оптимальным набором реагентов для секвенирования оказался набор MiSeq Reagent Kit v2 (300 циклов), позволяющий секвенировать 96 образцов одновременно. Кроме этого, указанный набор удобен для выполнения исследований в формате 96-луночного планшета, упрощает этап баркодирования образцов и минимизирует ошибки оператора.

Для реализации этапа анализа было разработано специализированное программное обеспечение (далее – ПО), работающее в автоматическом режиме и не имеющее графического интерфейса. Входными данными для ПО являются прямые и обратные прочтения в формате FASTQ, генерируемые прибором Illumina MiSeq System. Анализ данных включал следующие основные стадии: удаление последовательностей адаптеров и оснований с низким качеством на концах прочтений; выравнивание

Таблица 6

Временные затраты на производственный цикл для 96 образцов

Этап	Время работы «руками»	Общее время
Лонг-ПЦР	~5 ч	~10 ч
Пулирование локусов	~0,5 ч	~0,5 ч
Фрагментация	~0,5 ч	~0,5 ч
Очистка/size selection	~1 ч	~1 ч
Восстановление концов	~0,5 ч	~1 ч
Аденилирование	~0,5 ч	~1 ч
Лигирование адаптеров	~1 ч	~1 ч
Очистка/size selection	~1 ч	~1 ч
ПЦР с индексированием	~1 ч	~1,2 ч
Очистка/size selection	~1 ч	~1 ч
Количественная оценка	~1 ч	~1 ч
Секвенирование	-	~24 ч
Анализ данных	-	~6 ч
Σ	~13 ч	~50 ч

Таблица 7

Показатели чувствительности и специфичности разработанной тест-системы

Локус	Чувствительность	Специфичность
HLA-A	1,00	1,00
HLA-B	1,00	1,00
HLA-C	1,00	0,99
HLA-DQB1	0,98	0,93
HLA-DRB1	0,98	0,99

Таблица 8

Расхождения данных HLA-типирования, полученные при использовании разработанной тест-системы

№ п/п	№ образца	Контрольные данные	Экспериментальные данные
1	2646	HLA-C*12:02; 12:03	HLA-C*04:09N; 12:02
2	2610	HLA-DQB1*02:02, 02:02	HLA-DQB1*02:02, 02:80
3	2655	HLA-DQB1*02:01, 02:02	HLA-DQB1*02:01, 02:80
4	2753	HLA-DQB1*02:01, 03:01	HLA-DQB1*02:01, 02:59
5	2754	HLA-DQB1*03:01, 05:01	HLA-DQB1*05:01, 05:01
6	2755	HLA-DQB1*03:02, 03:03	HLA-DQB1*02:59, 03:02
7	2759	HLA-DQB1*03:01, 03:01	HLA-DQB1*03:01, 03:04
8	2661	HLA-DRB1*07:01, 07:01	HLA-DRB1*07:01, 07:47
9	2647	HLA-DRB1*04:02, 10:01	HLA-DRB1*10:01, 10:01
10	2752	HLA-DRB1*01:01, 04:08	HLA-DRB1*01:01, 01:01

прочтений на последовательности базы данных IMGT/HLA Database с использованием двух независимых алгоритмов; оценка качества; присвоение наиболее вероятного HLA-генотипа; автоматический экспорт результатов в клинический отчет в текстовом и машиночитаемом форматах, совместимых с базой данных регистра.

В разработанном ПО реализованы три независимых алгоритма анализа данных:

выравнивание на кодирующие последовательности базы данных (используются только прочтения с экзонав);

выравнивание на последовательности полных геномов базы данных (используются прочтения с экзонов и интронов);

сравнение генотипов, определенных алгоритмами 1 и 2, и определение более вероятного генотипа в случае выявления расхождений.

ПО обеспечивало выполнение оценки качества данных запуска по среднему количеству прочтений, выровненных на локус; по среднему числу прочтений, выравниваемых на несколько локусов; по среднему значению размера вставки и по среднему покрытию экзонов по локусу. Оценка качества образца предусмотрена по количеству прочтений, выровненных на локус; по дисбалансу по покрытию ключевых экзонов; по размеру вставки и дисбалансу по покрытию остальных экзонов.

Результаты хронометрии производственного цикла по HLA-типированию 96 образцов с использованием разработанной тест-системы представлены в табл. 6.

Верификация. Результаты оценки аналитических характеристик разработанной тест-системы представлены в табл. 7.

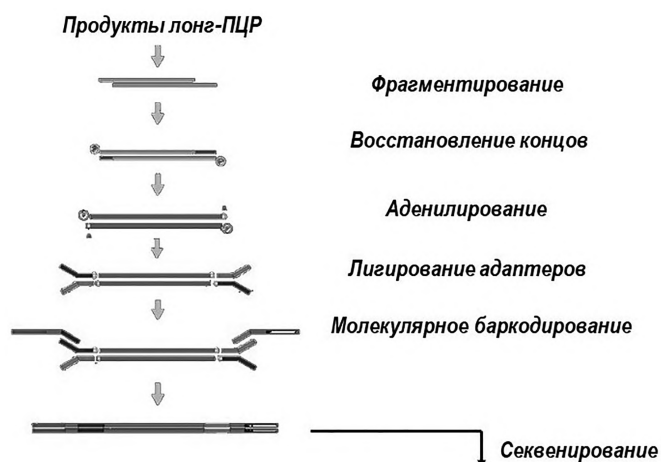
Наибольшая чувствительность тест-системы достигалась при использовании в ПО алгоритма 3. Расхождения между контрольными и экспериментальными данными, выявленные при применении разработанной тест-системы, представлены в табл. 8.

Установлено, что ошибки генотипирования в образцах с №1 по №8 (табл. 8) были связаны с присвоением образцу наиболее вероятного генотипа при расхождении результатов, полученных с помощью алгоритмов 1 и 2. Указанная проблема была решена путем добавления в алгоритм 3 значения «достоверный генотип не определен» и введения критериев его присвоения, с последующей повторной верификацией алгоритма 3.

Для двух образцов по локусам HLA-DRB1 (таблица 8 - №9 и №10) не были идентифицированы аллели HLA-DRB1*04:02 и HLA-DRB1*04:08. Это было обусловлено тем, что для образцов, гетерозиготных по аллелям группы DRB1*04, характерен аллельный дисбаланс, вызванный неравномерностью амплификации: размер ПЦР продукта для аллелей группы DRB1*04 составляет 5,5 т.п.н, в то время как, для других аллельных групп – 4,3 т.п.н. Для увеличения чувствительности тест-системы в отношении аллелей группы DRB1*04 требуется дальнейшая оптимизация условий проведения ПЦР длинных фрагментов.

Оптимальный по чувствительности алгоритм 3 дал следующие результаты по неоднозначности: по локусу А и В все аллели были идентифицированы однозначно, по локусу С – 184 аллеля из 186, по локусу DQB1 – 175 аллелей из 184, по локусу DRB1 – 167 аллелей из 168. По локусу HLA-C выявленные неоднозначности содержали редкие аллели, которые не были включены в алгоритм выравнивания на экзоны (алгоритм 1), поэтому вместо них ПО выдало наиболее близкие распространенные аллели, и соответственно алгоритм 3 выдал результат «редкий аллель/распространенный аллель». По локусу HLA-DRB1 полученная неоднозначность была связана с неполным покрытием гена. По локусу HLA-DQB1 все неоднозначности относились к образцам, гетерозиготным по одной аллельной группе, когда аллели имели идентичные последовательности второго и третьего экзонов, а последовательность интрона 2 была больше размера вставки и близка для части аллелей, формирующих неоднозначность, для некоторых – неизвестна совсем.

В целом результаты верификации позволили сделать заключение о том, что доля неоднозначных аллелей, выявленных при использовании разработанной тест-системы, незначительна и является приемлемой.



Стадии этапа приготовления библиотек.

Обсуждение. В ходе проведенных исследований разработана тест-система для массового генотипирования по локусам HLA-A, -B, -C, -DQB1, -DRB1 в разрешении 4-digit в формате 96 тестов с полным производственным циклом 50 ч., или 2,5 рабочих дня. По расчетным данным при условии применения одного прибора Illumina MiSeq System разработанная тест-система обеспечивает выполнение генотипирования 10 000 образцов по 5 HLA-локусам в высоком разрешении в год силами 2-3 человек.

Разработанная тест-система представляет собой набор из четырех комплектов реагентов: комплект для таргетного обогащения генов HLA (1), комплект для приготовления библиотек (2), комплекты баркодов для двойного баркодирования (3 и 4). Такое разделение компонентов тест-системы позволяет хранить первый комплект в зоне пре-ПЦР, остальные – в зоне пост-ПЦР. Это может рассматриваться как дополнительная пассивная защита технологии от возможной кросс-контаминации образцов, риск которой при потоковых исследованиях принято считать очень высоким.

Уровни чувствительности и специфичности, обеспечиваемые при использовании разработанной тест-системы, сопоставимы с таковыми, декларированными для доступных в настоящее время коммерческих тест-систем зарубежного производства (AllType NGS, HoloType HLA, NGSgo)

В целом полученные результаты позволяют сделать заключение о возможности использования разработанной тест-системы для массового типирования потенциальных доноров ГСК.

Выводы.

1. Разработана тест-система для проведения высокопроизводительного HLA-типирования локусов HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 с разрешением 4-digit на базе платформы Illumina MiSeq System.

2. Тест-система верифицирована на выборке из 93 образцов; установленные аналитические характеристики являются приемлемыми для HLA-генотипирования доноров ГСК.

3. Использование двух независимых алгоритмов позволяет в автоматическом режиме получать достоверные HLA-генотипы по всем исследуемым локусам, что имеет значение при большом потоке образцов, поскольку не требует длительной и трудоемкой процедуры оценки качества данных высококвалифицированным специалистом.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ребриков Д.В., Коростин Д.О., Шубина Е.С., Ильинский В.В. NGS: высокопроизводительное секвенирование. Москва: БИНОМ Лаборатория знаний; 2014.
2. Счетчик регистра (2018). Доступен: http://www.rdkm.rusfond.ru/registr_stat/001 (обновление 11.10.2018).
3. Макаренко О.А., Алянский А.Л., Иванова Н.Е. и др. Эффективность поиска неродственного донора гемопоэтических стволовых клеток с помощью российской поисковой системы Bone Marrow Donor Search: опыт НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой. *Клиническая онкогематология*. 2017; 10: 39-44.
4. Логинова М.А., Парамонов И.В. Новые HLA-аллели в российских популяциях. *Трансфузиология*. 2016; 3(17): 13-20.

REFERENCES

1. Rebrikov D.V., Korostin D.O., Shubina E.S., Il'inskij V.V. NGS: high throughput sequencing. Moscow: BINOM Laboratoriya znanij; 2014. – 232. (in Russian)
2. The counter register (2018). Available at: http://www.rdkm.rusfond.ru/registr_stat/001 (update 11.10.2018). (in Russian)
3. Makarenko O.A., Alyanskij A.L., Ivanova N.E. et al. The effectiveness of the search for an unrelated hematopoietic stem cell donor using the Russian search system Bone Marrow Donor Search: the experience of the Research Institute of Pediatric Oncology, Hematology and Transplantology named after R.M. Gorbacheva. *Klinicheskaya onkogematologiya*. 2017; 10: 39-44. (in Russian)
4. Loginova M.A., Paramonov I.V. New HLA alleles in Russian populations. *Transfuziologiya*. 2016; 3(17): 13-20. (in Russian)

Поступила 22.11.18

Принята к печати 01.12.18