

DOI: 10.15825/1995-1191-2014-4-40-44

ТИТРОВАНИЕ ИЗОАГГЛЮТИНИНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СОВРЕМЕННЫХ ГЕЛЕВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ПРИ АВ0-НЕСОВМЕСТИМЫХ ТРАНСПЛАНТАЦИЯХ

Порунова А.К., Морозова В.В., Цирульникова И.Е., Цирульникова О.М., Готье С.В.

ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Цель: создать лабораторный метод, позволяющий точно, надежно и наглядно производить титрование групповых антител системы АВ0, в том числе у пациентов с низкой исходной концентрацией агглютининов в крови; более экономный в плане расходования сыворотки крови, требующий меньших затрат времени. **Материалы и методы.** Эмпирически подобраны режимы, обеспечивающие возможность титрования агглютининов системы АВ0 с помощью микротипирующей гелевой технологии, проанализирован материал 1640 определений титра групповых антител сыворотки крови реципиентов при АВ0-несовместимой трансплантации. **Результат** использования разработанного нами метода при трансплантации органов от не совместимых по группе крови доноров заключается в повышении точности, чувствительности титрования естественных, полных и неполных иммунных антител системы АВ0, в обеспечении его наглядности, использования микродоз крови обследуемого, что особенно важно в педиатрии, это способ, позволяющий на более ранних стадиях выявить появление сенсибилизации пациента. **Заключение.** Разработанная методика титрования АВ0-антител с применением современных гелевых технологий дает возможность более точного мониторинга титра антител, что необходимо для прогнозирования риска отторжения трансплантата, выбора протокола предоперационной подготовки и послеоперационного ведения пациента, для оценки эффективности проводимой терапии у пациентов, которым затруднительно подобрать донора, совместимого по группе крови и для которых сегодня АВ0-несовместимая трансплантация является жизнеспасающей.

Ключевые слова: АВ0-несовместимая трансплантация, титрование изоагглютининов, гелевые технологии.

TITRATION METHOD OF АВ0 ANTIBODIES WITH THE USE OF MODERN GEL TECHNOLOGY IN АВ0-INCOMPATIBLE TRANSPLANTATION

Porunova A.K., Morozova V.V., Tsiroulnikova I.E., Tsiroulnikova O.M., Gautier S.V.

V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

It is shown that developed method of titrating АВ0 antibodies allows defining the titer of the investigational antibodies more precisely on 1–3 dilution of serum compared to the prototype method (titration method of antibodies in saline medium on the plane). It is more obvious as it excludes hardly interpretable results due to the possibility of conducting visual assessment of agglutination reaction in the gel card thick column and requires less time for analysis. The results can be saved for comparison with the results of further research. That is not possible under prototype titration method. **Aim:** our aim is to create a laboratory technique that can accurately, reliably and clearly produce titration of АВ0 system antibodies, including in patients with low initial concentration of agglutinins in the blood; a technique more economical in terms of spending serum and that takes less time. **Materials and methods:** those modes were empirically chosen which allow titration of АВ0 system agglutinins using gel technology based micro typing; to titer group antibodies 1640 serum assays of recipients in АВ0-incompatible transplantation were analyzed. **The result** of the use of specially developed method in organ transplantation from

Для корреспонденции: Порунова Анна Константиновна. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел. 8 (499) 193-37-37. E-mail: opknii@yandex.ru.

For correspondence: Porunova Anna Konstantinovna. Address: 1, Shchukinskaya st., Moscow, 123182, Russian Federation. Tel. 8 (499) 193-37-37. E-mail: opknii@yandex.ru.

incompatible blood donors consists in enhancing accuracy, sensitivity of natural, complete and incomplete ABO system immune antibodies titration, in its clarity, using of blood micro-doses for earlier detection of sensitizing of the patient, which is especially important in Pediatrics. **Conclusion:** the developed procedure of ABO-antibodies' titration using modern gel technology makes possible a more precise monitoring of the titer of antibodies that is necessary to predict the graft rejection risk, to select the Protocol of preoperative preparation and postoperative management of patients, to assess the effectiveness of therapy in patients for whom it is difficult to find a compatible blood type donor, and for whom today ABO-incompatible transplantation is a life-saving.

Key words: ABO-incompatible transplantation, titration of ABO-antibodies, gel technology.

Недостаток донорских органов приводит к увеличению числа пациентов, ожидающих трансплантацию. Одним из путей, дающих возможность увеличить число доноров печени и почки, является преодоление иммунологического барьера – ABO-несовместимости. Несовместимость по ABO зачастую приводит к отказу от подходящего по другим параметрам донора. Трансплантация ABO-несовместимого органа может привести к реакции опосредованного антителами молниеносного отторжения (hyperacute rejection). В зависимости от распределения групп крови в различных популяциях исключаются около 30–35% потенциальных живых доноров вследствие несовместимости по ABO.

Первые ABO-несовместимые трансплантации были проведены в середине прошлого века, однако результат был негативным в связи с реакцией молниеносного отторжения. Наибольшее число ABO-несовместимых трансплантаций проведено в Японии, где опубликованы успешные долгосрочные результаты ABO-несовместимой трансплантации почки от живых доноров [1]. После введения в практику специфических анти-А или анти-В иммуносорбционных колонок (Glycosorb®) и анти-CD20 моноклональных антител (rituximab) в различных терапевтических режимах ABO-несовместимая почечная трансплантация стала обычной процедурой в европейских странах, особенно в Швеции и Германии [2, 3].

Разработка предоперационного протокола подготовки для достижения целевого титра анти А/В < 1: 16 в последние годы дала возможность снизить и поддерживать анти-А/В титры против группы крови донора на уровне, достаточном для предотвращения антитело-опосредованной реакции отторжения, и проводить ABO-несовместимые трансплантации. Основным фактором выживания трансплантата является предотвращение молниеносной реакции отторжения и установление аккомодации. Аккомодация означает отсутствие реакции антиген – антитело, несмотря на наличие «чужеродного» антигена на эндотелиальных клетках сосудов трансплантата и наличие антител в крови реципиента [4]. Протоколы в США и Японии отличаются от протоколов большинства европейских центров, где с целью удаления антител используется антиген-специфическая иммуносорбция, реже, чем обмен плазмы (плазма-

ферез с использованием для замещения донорской плазмы АВ(IV) группы крови или кровезаменителей). Иммуносорбция с анти-А/В-специфическими Glycosorb® колонками является эффективным способом удаления анти-ABO-антител, без побочных эффектов, присущих плазмаферезу – коагуляционные расстройства, возможность передачи вирусных инфекций при использовании свежзамороженной плазмы или аллергических реакций.

Однако остается еще много нерешенных вопросов. Неизвестно, каков приемлемый верхний уровень титра ABO антител во время трансплантации, для предотвращения антитело-опосредованной реакции отторжения. Есть мнение, что при использовании новейших режимов иммуносупрессии трансплантацию можно проводить безопасно при титре 1:32 [5]. Однако воспроизводимость результатов тестов мониторинга изоагглютининов и методики отличается в различных центрах по техническим причинам.

В лаборатории отделения переливания крови Федерального научного центра трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова накоплен значительный опыт мониторинга агглютининов при ABO-несовместимых трансплантациях почек и печени от живых доноров-родственников [6]. Реципиентами части печени в большинстве случаев являлись дети. Известно, что у детей титры агглютининов ниже, чем у взрослых, из-за несовершенства иммунной системы, которая достигает зрелости к 5–10-му году жизни.

Рекомендуемый Приказом МЗ РФ № 2 от 09.01.1998 г. метод титрования антител в солевой среде на плоскости, как оказалось на практике, является недостаточно чувствительным, в связи с чем мы длительное время занимались его усовершенствованием, используя для титрования гелевые карты, одновременно в параллели титровали сыворотки общепринятым способом (изогемагглютинирующий тест серийных разведений в солевой среде на плоскости) [7, 8]. В результате мы получили современную методику:

– более чувствительную (разница в титре на 1–3-й степени разведения), что позволяет на более ранних этапах выявить изоиммунизацию групповыми факторами системы ABO;

- более наглядную – на гелевых ID-картах исключаются трудно интерпретируемые результаты, особенно при низких исходных титрах антител у детей раннего возраста;
- требующую для исследования незначительное количество (микродоза) сыворотки (что немало важно в педиатрии);
- требующую меньше времени для анализа.

Возможно, наш опыт мониторинга АВ0-антител с использованием современных гелевых технологий будет полезен сотрудникам лечебных учреждений, занимающихся трансплантацией. Предлагаем подробное описание разработанной нами методики.

Микротипирующая гелевая технология предложена французским ученым Y. Lapiere в 1986 году. Эта технология использует комбинацию методов агглютинации и гель-фильтрации. Все реакции проводятся в пластиковых диагностических карточках, которые содержат специальный гель.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИТРА АГГЛЮТИНИНОВ

В нашей лаборатории для определения титра естественных и иммунных антител системы АВ0 используется изогемагглютинирующий тест серийных разведений в солевой среде с последующим переносом и детекцией образцов в гелевых картах.

ID-гелевая система представляет собой пластиковые карты с микропробирками, заполненными гелем, к которому добавляются эритроциты и сыворотки. Пробирки с гелем содержат модифицированный Sephadex и предназначены для скрининга антител. После центрифугирования в специальной центрифуге агглютинированные эритроциты задерживаются в верхних слоях геля, в то время как неагглютинированные эритроциты, беспрепятственно пройдя через гель, образуют осадок на дне пробирок. Положительные реакции наглядно отличаются от отрицательных и могут быть разделены по силе реакции. Всего с 2010 года проведено титрование изоагглютининов для 70 разногруппных трансплантаций печени, почек, сердца. Для одного пациента в среднем проводилось от 2 до 5 титрований до операции и от 5 до 30 титрований после операции. Всего было выполнено 1640 титрований; 110 титрований были поставлены в параллели с солевым методом на плоскости.

ОСНАЩЕНИЕ

- Стандартные эритроциты группы A₁(II) и B (III) ID-DiaCell АВ0 0,8% Bio-Rad или Grifols Serigrup Diana A₁/B.
- Изотонический 0,9% раствор NaCl.
- Культуральный планшет для разведения сыворотки на 24 лунки (вместо него можно использовать пробирки типа эппендорф, планшет для ИФА).
- Гелевые карты нейтральные Bio-Rad ID-Card «NaCl, Enzyme Test and Cold Agglutinins».
- Гелевые карты с реактивом Кумбса LISS/Coombs Anti-IgG + C3d.
- Термостат 37 °С.
- Центрифуга для гелевых карт ID-Centrifuge 12 SII.
- Термостат на 70 °С.
- Дозаторы с переменным объемом от 25 до 200 мкл.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИТРА ЕСТЕСТВЕННЫХ α- И β-АНТИТЕЛ

1. Для определения естественных α- и β-антител класса Ig M сыворотку последовательно разводим в планшете от 1:1 до 1:1024. Начиная со второй лунки в каждую лунку планшета вносим 200 мкл изотонического раствора NaCl.
2. В первую и во вторую лунку вносим по 200 мкл неразведенной сыворотки. Во второй лунке сыворотку перемешиваем (пипетированием) с раствором NaCl, затем 200 мкл разведенной сыворотки переносим в третью лунку, где перемешиваем (пипетированием) и переносим в четвертую лунку и так далее до последней лунки, где получается разведение 1024 (рис. 1).
3. Подписываем гелевую нейтральную карту (Ф. И. О. пациента, дата исследования, разведение).
4. Затем в каждую колонку гелевой карты вносим 50 мкл стандартных эритроцитов A₁, если определяем титр α изоагглютининов, и стандартных эритроцитов B, если определяем титр β изоагглютининов.
5. В первую колонку вносим 25 мкл неразведенной сыворотки, во вторую и последующие колонки вносим по 25 мкл разведенных сывороток.

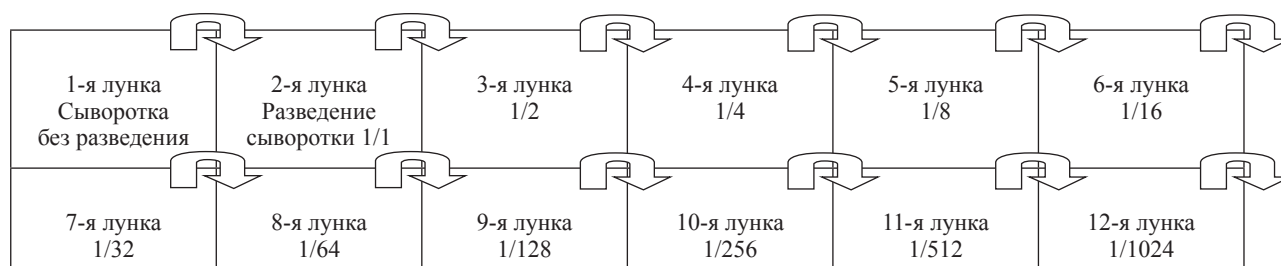


Рис. 1. Схема разведения сыворотки в культуральном планшете

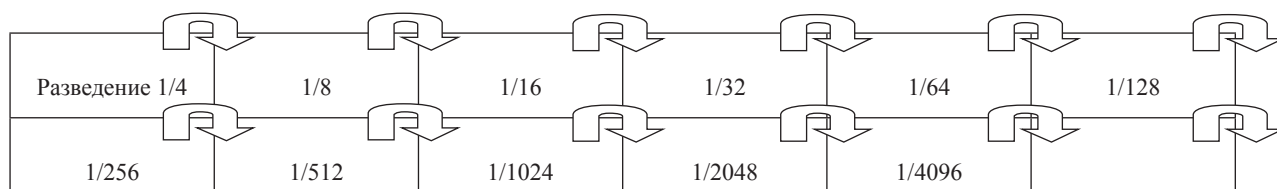


Рис. 2. Схема разведения в гелевой карте LISS/Coombs

6. Карты оставляем на 20–25 мин при комнатной температуре для реакции агглютинации.
7. Затем карты откручиваем в центрифуге при стандартном режиме для карт 10 мин и оцениваем результаты. Титром считается последнее разведение, в толще колонки которого будут наблюдаться сагглютинированные эритроциты (следующая колонка, в которой все эритроциты осели на дно, уже считается отрицательной).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИММУННЫХ АНТИТЕЛ СИСТЕМЫ АВ0 (АНТИ-А И АНТИ-В)

По приказу № 2 от 9 января 1998 г., в соответствии с инструкцией «Определение полных иммунных антител системы АВ0 реакцией солевой агглютинации» исследуемую сыворотку (не плазму) в пробирке эппендорф разводим в четыре раза изотоническим раствором NaCl (например, 100 мкл сыворотки + 300 мкл NaCl) во избежание коагуляции при нагревании, затем прогреваем в течение 10 мин при 70 °С, точно соблюдая температуру и время. Таким образом, получаем прогретую сыворотку с разведением 1/4 (при этом естественные групповые антитела α и β инактивируются). Далее для определения полных иммунных антител титруем прогретую сыворотку по методике определения титра естественных групповых антител, описанной нами выше, с применением нейтральных гелевых карт.

С целью выявления неполных иммунных IgG-антител (анти-А и анти-В) исследование разведенной в четыре раза, прогретой сыворотки дополняем постановкой реакции непрямой агглютинации с кроличьими IgG-антителами, нанесенными в гелевую карту LISS/Coombs (реакция Кумбса).

1. Определение неполных иммунных антител начинаем последующим разведением прогретой и разведенной раствором NaCl 1/4 сыворотки в культуральном планшете, как для естественных изоагглютининов. Начиная со второй лунки, в каждую лунку вносим 200 мкл изотонического раствора NaCl.
2. В первую и во вторую лунку вносим по 200 мкл прогретой сыворотки с разведением 1/4. Во второй лунке сыворотку перемешиваем раствором NaCl, используя пипетку, затем 200 мкл разведенной сыворотки переносим в третью лунку, где перемешиваем и 200 мкл переносим в чет-

вертую лунку, и так далее до последней лунки, где получается разведение 4096. Если сыворотка титруется второй раз и известен ее последний титр, то достаточно внести в карточку последнее известное разведение +2 разведения (рис. 2).

3. Подписываем гелевые карты LISS/Coombs Anti-IgG + C3d.
4. Затем в каждую колонку гелевой карты Liss/Coombs вносим 50 мкл стандартных эритроцитов А₁, если определяем титр анти-А и эритроцитов В, если определяем титр анти-В. При необходимости определения титра анти-А и анти-В количество колонок удваивается.
5. В первую колонку вносим 25 мкл сыворотки с разведения 1/4, во вторую и последующие колонки вносим по 25 мкл последовательно разведенных сывороток.
6. Карты оставляем на 20–25 мин при 37 °С для реакции агглютинации.
7. Затем карты откручиваем в центрифуге при стандартном режиме для карт 10 мин. Оцениваем результаты: титром антител считается последнее разведение, при этом в толще колонки гелевой карты будут наблюдаться сагглютинированные эритроциты (следующая колонка, в которой все эритроциты осели на дно, уже считается отрицательной).

ТРАКТОВКА РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе исследования выявляются естественные полные антитела – агглютинины α и β (термолабильные) и иммунные полные и неполные анти-А и анти-В (термостабильные).

Наличие иммунных антител полной или неполной формы свидетельствует об имевшем место поступлении в организм человека антигена, не совместимого по АВ0-системе [7].

Высокий титр нормальных агглютининов α и β (α выше, чем 1:256, и β выше, чем 1:128) даже при отсутствии иммунных термостабильных антител в момент исследования, отражает состояние повышенной сенсibilизации организма и позволяет сделать предположение о бывшем в предшествующее время поступлении антигена, не совместимого по системе АВ0 [7].

Отсутствие иммунных термостабильных антител анти-А и анти-В при титре естественных изоаг-

глютенинов α не выше, чем 1:256, и β не выше, чем 1:128, говорит об отсутствии у человека изоиммунизации групповыми факторами системы АВ0.

ВЫВОДЫ

Разработанная методика титрования АВ0-антител с применением современных гелевых технологий дает возможность более точного, более наглядного, в особенности у пациентов с низкой исходной концентрацией агглютининов в крови, мониторинга титра антител, что необходимо для прогнозирования риска отторжения трансплантата, выбора протокола предоперационной подготовки и послеоперационного ведения пациента, для оценки эффективности проводимой терапии у пациентов, которым затруднительно подобрать донора, совместимого по группе крови, для которых сегодня АВ0-несовместимая трансплантация является жизненноспасающей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что разработанный нами способ титрования АВ0-антител позволяет точнее на 1–3 разведения сыворотки крови, по сравнению с прототипом (метод титрования антител в солевой среде на плоскости), определить титр исследуемых антител. Он является более наглядным, поскольку исключает трудно интерпретируемые результаты за счет возможности проведения визуальной оценки реакции агглютинации в толще колонки гелевой карты, требует меньше времени для анализа. При этом результаты могут быть сохранены для сравнения с результатами дальнейших исследований, что невозможно при титровании по способу-прототипу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Takahashi K, Saito K, Takahara S et al. Excellent long-term outcome of АВ0-incompatible living donor kidney transplantation in Japan. *Am J Transplant.* 2004; 4: 1089–1096.
2. Tyden G, Kumlien G, Genberg H et al. АВ0-incompatible kidney transplantations without splenectomy, using antigen-specific immunoabsorption and rituximab. *Am J Transplant.* 2005; 5: 145–148.
3. Tyden G, Kumlien G, Genberg H et al. The Stockholm experience with АВ0-incompatible kidney transplantations without splenectomy. *Xenotransplantation.* 2006; 13: 105–107.
4. Takahashi KA. New concept of accommodation in АВ0-incompatible kidney transplantation. *Clin Transplant.* 2005; 19 (14): 76–85.
5. Shimmura H, Tanabe K, Ishikawa N et al. Role of anti-A/B antibody titers in results of АВ0-incompatible kidney transplantation. *Transplantation.* 2000; 70: 1331–1335.
6. Готье СВ, Цирульникова ОМ, Аммосов АА и др. Опыт АВ0-несовместимых трансплантаций печени. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2011; 2: 21–28. Gautier SV, Tzirul'nikova OM, Ammosov AA i dr. Opyt АВ0-nesovmestimyykh transplantatsiy pecheni. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov.* 2011; 2: 21–28.
7. Приказ МЗ РФ № 2 от 09.01.1998 г. Об утверждении инструкций по иммуносерологии. 180–186. Prikaz MZ RF № 2 ot 09.01.1998 g. Ob utverzhdanii instruktsiy po immunoserologii. 180–186.
8. Минева НВ. Группы крови человека. Основы иммуногематологии, 1-е изд. 2005: 94–123. Mineeva NV. Gruppy krovi cheloveka. Osnovy immunogematologii, 1-e izd. 2005: 94–123.

*Исследование частично профинансировано грантом Президента РФ по государственной поддержке ведущих научных исследований.
НИ-6294.2014.7*

Статья поступила в редакцию 11.06.2014 г.