

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ



Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

2018 г.

Регистрационный № 072-0618

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ КЛЕТОЧНОГО ОТТОРЖЕНИЯ  
ТРАНСПЛАНТАТА В ОТДАЛЕННЫЙ ПЕРИОД ПОСЛЕ  
ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПОЧКИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ - РАЗРАБОТЧИК:

Учреждение здравоохранения

«9-я городская клиническая больница» г. Минска

АВТОРЫ: к.м.н., доцент С.В. Коротков, А.В. Носик, В.В. Смольникова, В.Ю. Гриневиц, А.А. Коритко, Е.А. Примакова, д.м.н., доцент, О.В. Калачик, к.м.н., доцент, А.Е. Щерба, к.м.н., доцент И.И. Пикиреня, д.м.н., доцент С.И. Кривенко, член-корр. НАН РБ, д.м.н., профессор, О.О. Руммо

Минск 2018

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д. Л. Пиневиц

22.06.2018

Регистрационный № 072-0618

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ КЛЕТОЧНОГО ОТТОРЖЕНИЯ  
ТРАНСПЛАНТАТА В ОТДАЛЕННЫЙ ПЕРИОД ПОСЛЕ  
ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПОЧКИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УЗ «9-я городская клиническая больница»  
г. Минск

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доц. С. В. Коротков, А. В. Носик, В. В. Смольникова,  
В. Ю. Гриневиц, А. А. Коритко, Е. А. Примакова, д-р мед. наук, доц.  
О. В. Калачик, канд. мед. наук, доц. А. Е. Щерба, канд. мед. наук, доц.  
И. И. Пикиреня, д-р мед. наук, доц. С. И. Кривенко, чл.-кор. НАН Беларуси, д-р  
мед. наук, проф. О. О. Руммо

Минск 2018

Настоящая инструкция по применению (далее — инструкция) разработана с целью внедрения в клиническую практику малоинвазивной ранней диагностики клеточного отторжения трансплантата почки в отдаленные сроки после операции.

В настоящее время трансплантация почки (ТП) является методом «выбора» среди возможностей заместительной почечной терапии. Трансплантация не только улучшает качество жизни пациентов с хронической болезнью почек V стадии, но и значительно увеличивает сроки их выживаемости [Kaballo et al., 2017].

Одним из наиболее значимых осложнений, влияющих на результаты трансплантации, является развитие реакции отторжения почечного аллографта. Несмотря на проводимую иммуносупрессивную терапию частота острой реакции отторжения в раннем послетрансплантационном периоде сохраняется на уровне 10 % [Ganji, Broumand, 2007]. Клеточное отторжение трансплантата почки в различные сроки отдаленного периода (свыше 1 года) встречается еще чаще (до 35 %), рефрактерно к терапии, приводит к хронизации процессов отторжения трансплантата почки и является одной из причин потери функции трансплантата [Eid, Tuchman, Moudgil, 2014]. К тому же иммуносупрессивная терапия обладает рядом нежелательных явлений, наиболее значимыми из которых являются инфекционные, онкологические и метаболические осложнения [Almeida и et al., 2013].

Улучшение результатов трансплантации почки и снижение частоты иммунологических осложнений в различные сроки послеоперационного периода достижимо путем ранней диагностики реакции отторжения и назначения соответствующей иммуносупрессивной терапии. Применяемые традиционные маркеры функции почек (сывороточный креатинин, скорость клубочковой фильтрации, протеинурия), а также показатели инструментальной диагностики (динамическое изменение резистивного индекса и кортико-медуллярного соотношения при ультразвуковом исследовании) не обладают достаточными чувствительностью и специфичностью в диагностике дисфункции трансплантата и не могут быть использованы для определения тактики лечения. На данный момент «золотым стандартом» диагностики реакции отторжения трансплантата почки является пункционная биопсия. Однако биопсия является инвазивной процедурой и связана с риском осложнений [S. F. Tsai et al., 2016] при оценке необходимости «протокольных» биопсий указывают, что данная процедура осложняется в 5,2 % случаев.

Учитывая все вышесказанное, применение маркеров, которые позволили бы прогнозировать и диагностировать реакцию отторжения до клинических и лабораторных проявлений, а также изучать ответ реципиента на проводимую терапию, является актуальным [Hollis et al., 2017]. Проточная цитофлуориметрия (ЦФМ) как метод иммуномониторинга позволяет одновременно оценивать количественно численность практически всех субпопуляций лейкоцитов периферической крови, а также характеризовать

их функциональное состояние, что и определяет возможности данного метода в диагностике реакции клеточного отторжения трансплантата почки.

Предлагаемый инструкцией метод может быть использован при диспансерном наблюдении пациентов в отдаленном периоде после трансплантации почки. Инструкция рассчитана на врачей-нефрологов отделений нефрологии и амбулаторных кабинетов, врачей-хирургов отделений трансплантации почки, врачей-реаниматологов отделений реанимации и интенсивной терапии, осуществляющих оказание медицинской помощи пациентам после трансплантации почки.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

*Оборудование и инструментарий:*

1. Пробирка для забора крови с внесенным антикоагулянтом.
2. Лизирующий раствор (композитный раствор хлорида аммония).
3. Фиксирующий раствор (1 % раствор перформальдегида).
4. Центрифуга.
5. Дозатор пипеточный со сменными наконечниками.
6. Набор моноклональных антител, меченных флюорохромами к следующим маркерам на поверхности лейкоцитов: CD45-PerCP, CD14-FITC, CD11c-PE, CD123-PC7, CD56-APC, CD19-APC-Alexa Fluor 750, CD3-Pacific Blue, HLA-DR-Krome Orange.
7. Цитофлюориометр-анализатор.

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Состояние после трансплантации почки от донора со смертью мозга.

## **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

1. Ранний период после операции (3 мес.).
2. Трансплантация почки от живого донора.

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

*Преаналитический этап*

Осуществляется забор крови для исследования из периферической, чаще всего кубитальной вены. После забора материала следует перемешать содержимое пробирки без встряхивания. Необходимо отметить, что забор крови у пациентов производится обязательно до утреннего приема иммуносупрессивной терапии.

Образец крови транспортируется обязательно в вертикальном положении в закрытом контейнере при комнатной температуре. Хранение и подготовка материала осуществляются при комнатной температуре.

Первым этапом подготовки образца к цитофлюориметрическому исследованию является оценка пригодности образца крови к анализу. Оптимальным является анализ в первые часы после забора крови, что оказывает минимальное влияние на качество образца и результаты

иммунофенотипирования. Основными признаками непригодности образца являются: видимый гемолиз, замораживание крови свыше 48 ч с момента ее забора. При удовлетворительном качестве образца крови в пустую пробирку для цитофлюориметрического исследования добавляют раствор моно- или поликлональных антител, меченных флюорохромом, в количестве согласно рекомендации производителя (как правило, данный объем составляет 5–20 мкл). Затем в пробирку добавляют 100 мкл крови из образца. Смесь аккуратно перемешивают и инкубируют в защищенном от света месте в течение времени согласно рекомендации производителя (как правило, 25 мин). Следующий этап состоит из лизиса эритроцитов при помощи лизирующих растворов согласно инструкции производителя и «отмывки» аналитического образца. Для лизиса эритроцитов используется композитный раствор хлорида аммония 1:10, лизис осуществляется в течение 10 мин при 4 °С. «Отмывка» производится центрифугированием при скорости 1500 об/мин в течение 5 мин, после чего клетки ресуспендируются в 200 мкл фиксирующего раствора.

#### *Аналитический этап*

Анализ подготовленного образца производится на настроенном и откалиброванном согласно стандартной методике проточном цитофлюориметре-анализаторе. Для подсчета относительного числа миелоидных и плазмоцитоидных дендритных клеток используется стандартный протокол гейтирования, основанный на оценке прямого и бокового светорассеяния, а также оценке средней флюоресцентной интенсивности используемых моноклональных антител. Для подсчета процента содержания субпопуляций дендритных клеток в периферической крови используется следующий набор моноклональных антител, меченных флюорохромами: CD45-PerCP, CD14-FITC, CD11c-PE, CD123-PC7, CD56-APC, CD19-APC-Alexa Fluor 750, CD3-Pacific Blue, HLA-DR-Krome Orange. Результаты цитофлюориметрического анализа заносятся в стандартный бланк.

#### *Постаналитический этап*

Полученные значения содержания миелоидных и плазмоцитоидных дендритных клеток являются независимыми переменными для определения вероятности наличия аллоиммунного конфликта. Для дальнейшего определения вероятности независимые переменные вносятся в уравнение 1, имеющее вид логистической регрессии, а именно:

$$\rho = 1 / (1 + e^{-(\alpha + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2)}), \quad (1)$$

где  $\rho$  — результирующая вероятность отторжения трансплантата почки;  
 $\alpha = 3,16$  — константа уравнения регрессии, полученная путем аппроксимации статистических данных;

$\beta_1 = -3,13$  — коэффициент регрессии процента содержания миелоидных дендритных клеток, полученный путем аппроксимации статистических данных;

$\beta_2 = -8,61$  — коэффициент регрессии процента содержания плазмацитоидных дендритных клеток, полученный путем аппроксимации статистических данных,

$x_1$  — процент содержания миелоидных дендритных клеток (%мДк) в периферической крови;

$x_2$  — процент содержания плазмоцитоидных дендритных клеток (%пДк) в периферической крови.

Итоговое уравнение 2 подсчета результирующей вероятности отторжения трансплантата почки в отдаленном периоде после трансплантации выглядит следующим образом:

$$p = 1 / (1 + e^{-(3,16 - 3,13 \times \%мДк - 8,61 \times \%пДк)}). \quad (2)$$

Заключение о наличии клеточного отторжения трансплантата почки выносится на основании оценки полученной результирующей вероятности ( $p$ ) в соответствии с референтным интервалом. При значении результирующей вероятности выше 0,8 заключение выносится в пользу наличия реакции отторжения трансплантата почки. При значении вероятности ниже 0,2 выносится заключение об отсутствии отторжения почечного аллогraftа. При значении результирующей вероятности от 0,2 до 0,8 необходимо уточнение наличия процессов отторжения при помощи биопсии трансплантата почки с последующим гистологическим исследованием.

### **ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

1. Кожу перед венепункцией необходимо обработать дважды марлевыми салфетками, смоченными раствором антисептика (рекомендован 70 % раствор этилового спирта).

2. Не рекомендуется обдывать руку после обработки, накладывать жгут на плечо более чем несколько минут. Кровь в идеале должна поступать самотеком, что достигается использованием вакуумных пробирок с уже внесенным антикоагулянтом. Забор крови в стерильный шприц и переливание ее в пробирки вызывает гемолиз и тромбообразование и тем самым не обеспечивает должного качества образца периферической крови, что может повлиять на результаты исследования. Существует большое разнообразие пробирок с уже внесенным антикоагулянтом, в т. ч. и для гематологических исследований. Наиболее оправдано использование стерильных герметичных вакуумных пробирок небольшого объема (2–5 мл). Среди используемых антикоагулянтов, в гематологии стандартизировано применение солей этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА). В рекомендованных концентрациях ЭДТА (около 1,5 г/л), а также при иммунофенотипировании лейкоцитов периферической крови в первые 1–4 ч

после забора крови значительных изменений качества образца периферической крови и сдвигов результатов ЦМФ не происходит.

3. Не рекомендуется хранить пробирки с образцами крови и антикоагулянтом в холодильнике или при постоянном помешивании во избежание гемолиза.

4. Не рекомендуется производить иммунофенотипирование спустя 48 ч после забора крови при условии правильного забора, транспортировки и хранения образцов.

#### **Меры предосторожности**

Все работы с биологическим материалом пациентов должны проводиться с использованием одноразовых материалов и в соответствии с требованиями Санитарно-гигиенических правил, утвержденных Министерством здравоохранения Республики Беларусь.