Определение HLA-антител для успешной трансплантации почки















Общие сведения

- Предсуществующие HLA-антитела, образовавшиеся в результате гемотрансфузий, беременностей или предыдущих трансплантаций, совпадая по специфичности с генотипом донора, приводят к острой и сверхострой реакции отторжения трансплантата в первые часы или дни после операции.
- HLA-антитела, появляющиеся после трансплантации против донорских антигенов de novo, запускают реакции хронического отторжения, ухудшая качество функционирования трансплантата и время его жизни.
- На всех ядросодержащих клетках организма экспрессируются **HLA**антигены 1-ого класса: HLA-A, B, C локусов.
- На иммунокомпетентных клетках (В-лимфоцитах), антигенпрезентирующих клетках (макрофаги, дендритные клетки) и клетках эндотелия сосудов представлены **HLA-антигены 2-го класса**: HLA-DRB1 (2,3,4,5), DQA1, DQB1, DPA1, DPB1 локусов.
- У каждого человека HLA-антигены всех локусов 1 и 2 классов экспрессируются попарно (кодоминантно) в соответствии с гаплотипами родителей.

Донор-специфические HLA-антитела (DSA) являются основным пусковым механизмом в реакции гуморального отторжения при трансплантации солидных органов.

Система лейкоцитарных антигенов, ответственных за тканевую совместимость, является самой полиморфной системой антигенов у человека и животных. Число открываемых аллелей растёт с каждым годом (рисунок 1).

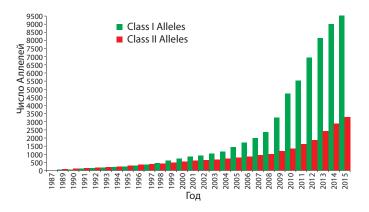


Рисунок 1.Полиморфизм аллелей системы HLA в динамике открытия новых аллелей по годам с 1987 по 2015 г. (http://hla.alleles.org)

Пример генотипа реципиента: Пример генотипа донора:

HLA-A*02; 24
HLA-B*07; 13
HLA-C*08; 14
HLA-DRB1*03; 11
HLA-DQB1*03; 06
HLA-DQB1*02; 06

Степень несовместимости (mismatch) в данном примере составляет 5/10 (пять из десяти).

- Описанная в примере степень несовместимости характерна, например, при трансплантации от родственного донора (гаплосовместимый донор). Однако, даже при трансплантации от неродственного донора часто удается достичь неплохой совместимости в силу того, что в популяции определенные аллели встречаются гораздо чаще других, и имеет место сцепленность этих аллелей в гаплотипы.
- На практике трансплантация солидных органов проводится с той или иной степенью генетического несоответствия (имеются различия в генотипах донора и реципиента по HLA). При этом главным принципом, которым следует руководствоваться для предотвращения реакций острого и хронического отторжения трансплантата, избегать неприемлемых несоответствий.
- При трансплантации органа иммунная система реагирует на все HLA-антигены, отличные от HLA-антигенов реципиента посредством реакций клеточного и гуморального отторжения.

Неприемлемые несоответствия – это присутствие в генотипе потенциального донора HLA-антигенов, к которым у реципиента имеются антитела или их появление после трансплантации имеет высокую вероятность.

HLA-антитела обладают достаточно высокой специфичностью.

PRA указывает процент потенциальных доноров, против которых у реципиента есть HLA-антитела.

- Реакции клеточного иммунитета, опосредованные Т-лимфоциты, удается достаточно успешно сдерживать препаратами иммуносупрессоров. Однако они практически не влияют на реакции гуморального иммунитета, опосредованные специфическими антидонорскими HLA-антителами. По этой причине выявление специфических к донору HLA-антител до трансплантации и их мониторинг после трансплантации позволяет гибко реагировать на риск развития отторжения и принимать соответствующие профилактические мероприятия. При высоком уровне сенсибилизации и наличии антидонорских HLA-антител реципиенту может быть рекомендован плазмоферез. Десенсибилизирующая терапия также имеет большое значение при подготовке реципиента к трансплантации от родственного донора.
- Интересно, что реципиенты с широким профилем антител до трансплантации, которым удается подобрать донора, к антигенам которого антитела отсутствуют, по статистике имеют лучший прогноз выживаемости трансплантата по сравнению с несенсибилизированными реципиентами, в виду меньшей остаточной иммунореактивности.
- Действие HLA-антител строго избирательно. Так, например, антитела в сыворотке реципиента, образовавшиеся в результате гемотрансфузии против антигена HLA-A*03, не будут реагировать с донорским антигеном специфичности HLA-A*23, в силу различия антигенных эпитопов, поэтому не приведут к реакции отторжения.
- Из этого правила есть некоторое исключение, когда определенные HLA-антигены имеют схожие эпитопы, и могут реагировать с антителами некоторых других специфичностей. Такие антигены объединили в кросс-реагирующие группы (CREG), которые представлены на рисунках 6–8.
- Примером кросс-реагирующих антигенов являются HLA-A*23 и 24 (серологическая группа A9) или HLA-B*57 и 58 (серологическая группа B17). Эти пары антигенов имеют общий антигенный эпитоп и поэтому реагируют со специфическими антителами совместно.
- Зная кросс-реагирующие свойства некоторых антител у реципиента следует избегать доноров с соответствующими генотипами.
- Сегодня врач КДЛ имеет надежный методический арсенал, позволяющий не просто выявить HLA-антитела у реципиента, а главное, определить их специфичность и комплемент-связывающую способность. Это важно для исключения неприемлемых несоответствий с каждым потенциальным донором.
- При лабораторном определении специфичностей HLA-антител методами мультиплексного Люминекс анализа программа интерпретации указывает на все имеющиеся кросс-реактивные группы обнаруженных HLA-антител, значения PRA%, а также дает численные показатели интенсивности сигнала, косвенно указывающие на титр обнаруженных антител той или иной HLA-специфичности (рисунок 2).
- Индекс PRA рассчитывается в программе автоматически на основании профиля обнаруженных специфических антител и табличной частоты встречаемости каждой специфичности в популяции. Например, PRA 25% означает, что пациент может иметь положительную реакцию «cross-match» с 25% потенциальных доноров (людей из общей популяции). PRA выше 65% характеризует потенциально высокий уровень сенсибилизации, при котором выявить конкретные иммунореактивные антитела, как правило, не удается. Зная значение PRA% для каждого реципиента можно ориентироваться, насколько легко ему будет подобрать подходящего донора.

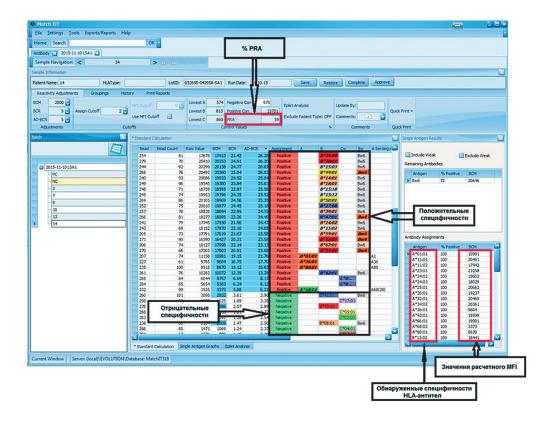


Рисунок 2.

Как отображаются результаты анализа в программе интерпретации специфических HLA-антител, которые видит врач лаборатории.

- Кроме того, в программе интерпретации результатов при определении HLA-антител можно отсортировать данные по интенсивности флуоресцентного сигнала (MFI) для каждой специфичности антител. Значения расчетного MFI представляют собой единицы интенсивности флуоресценции, приведенные к фоновому значению. Косвенно данные значения указывают на титр детектируемых антител.
- К примеру, на рисунке 3 можно видеть разделение специфичностей HLA-антител на положительные значения (столбики красного цвета) и отрицательные значения (столбики зеленого цвета). В данном примере, наибольший титр антител соответствует специфичности A*11:01, для этого типа антител величина расчетного MFI составила максимальное значение (20 461 MFI).



Рисунок 3. Результаты определения HLA-антител, отсортированные по значениям MFI для каждой специфичности.

Лабораторные показатели

1. Лабораторные тесты при плановом обследовании реципиентов «листа ожидания»

- HLA-генотипирование реципиента по локусам HLA-A, B, DRB1 на низком разрешении.
- Скрининговый тест на HLA-антитела позволяет разделить реципиентов «листа ожидания» на сенсибилизированных и несенсибилизированных. Сенсибилизированным пациентам проводят дальнейшее обследование на идентификацию антител.
- Идентификационные тесты позволяют определить специфичности выявленных HLA-антител и рассчитать %PRA.

2. Обследование реципиентов непосредственно перед трансплантацией

- Перед проведением операции лаборатория как правило уже располагает информацией о генотипе реципиента по локусам HLA-A, B, DRB1 и наличии у него HLA-антител той или иной специфичности.
- Поэтому на первом этапе проводят HLA-генотипирование донора. На основании полученных результатов проводят сопоставление с генотипами реципиентов «листа ожидания», выделяя наиболее подходящих.
- Важно определить генотип донора не только по локусам HLA-A, B и DRB1, но также по HLA-C и DQA1; DQB1, а по возможности и по DP-локусу. Это позволит в дальнейшем соотнести специфичности обнаруженных у реципиента HLA-антител с антигенами донора, и установить неприемлемые комбинации донорских антигенов.
- На втором этапе проводят процедуру **виртуального кросс-матча**, которая заключается в сопоставлении HLA-антигенов донора с профилем специфичностей HLA-антител реципиента.
- В случае, когда антидонорские антитела не обнаружены виртуальный кросс-матч **отрицательный**. При совпадении специфичностей HLA-антител с антигенами донора виртуальный кросс-матч положительный.
- На третьем этапе может быть проведен серологический лимфоцитотоксический тест на совместимость (CDC). Этот вид анализа в большей степени носит субъективный характер, зависит от метода детекции, вида исследуемого образца и определяет в основном HLA-антитела первого класса.

Возможные варианты лабораторного заключения

Вариант А: HLA-антитела, в том числе донор-специфические, не выявлены или обнаружены HLA-антитела к антигенам первого и/или второго класса, однако они не являются специфичными к антигенам донора. Виртуальный кросс-матч отрицательный. Серологический лимфоцитотоксический тест (кросс-матч) отрицательный. Пациент из группы низкого риска.

• Рекомендован мониторинг DSA антител после трансплантации.

Вариант В: Обнаружены HLA-антитела к антигенам второго класса, при этом выявленные антитела совпадают по специфичности с донорскими HLA-антигенами. Виртуальный кросс-матч положительный. Серологический лимфоцитотоксический тест (кросс-матч) отрицательный. Пациент из группы среднего иммунологического риска.

• Рекомендован мониторинг DSA антител после трансплантации.

HLA-типирование необходимо для определения генетического соответствия тканевых (лейкоцитарных) антигенов донора и реципиента.

Основным принципом, которым следует руководствоваться в подборе подходящего донора на основании его генотипа – это избегать неприемлемых несоответствий.

Вариант С: Обнаружены HLA-антитела к антигенам первого класса, при этом выявленные антитела совпадают по специфичности с донорскими HLA-антигенами. Виртуальный кросс-матч положительный. Серологический лимфоцитотоксический тест (кросс-матч) отрицательный. Пациент из группы высокого иммунологического риска.

- Рекомендован поиск донора, к которому реципиент не имеет сенсибилизации.
- Плазмоферез в случае родственного донора (для снижения титра антител).
- Мониторинг DSA антител после трансплантации.

Вариант D: Обнаружены HLA-антитела к антигенам первого и/или второго класса, при этом выявленные антитела совпадают по специфичности с донорскими HLA-антигенами. Виртуальный кросс-матч положительный. Серологический лимфоцитотоксический тест (кроссматч) положительный. Пациент из группы высокого иммунологического риска.

- Рекомендован поиск донора, к которому реципиент не имеет сенсибилизации.
- Плазмоферез в случае родственного донора (для снижения титра антител).
- Мониторинг DSA антител после трансплантации.

Возможные варианты анализа HLA-антител и примерный бланк заключения лаборатории представлены в таблице 1 и на рисунке 9.

HLA-a+	ітитела	D:	SA	CDC	Уровень	Dovovousous	
1 класс	2 класс	1 класс	2 класс	CDC	риска	Рекомендации	
-/+	-/+	-	-	-	низкий	Мониторинг DSA	
-/+	+	-	+	-	средний	Мониторинг DSA	
+	-/+	+	+/-	-	высокий	Подбор подходящего донора Плазмоферез Мониторинг DSA	
+	-/+	+	-/+	+	высокий	Подбор подходящего донора Плазмоферез Мониторинг DSA	

Таблица 1. Уровни риска острого отторжения почки и рекомендации в зависимости от варианта обнаружения HLA-антител.

3. Мониторинг образованных de novo HLA-антител после трансплантации как ранний маркер отторжения

- На первом этапе IgG HLA-антитела связываются с чужеродными (совпавшими по специфичности) донорскими антигенами на поверхности клеток трансплантата. Далее этот комплекс взаимодействует с белками системы комплемента, запуская каскадную цепочку реакций, приводящую к образованию поры в мембране клетки и неизбежному ее лизису. Через некоторое время картину комплемент-зависимой гибели клеток можно увидеть морфологически. В образце биоптата донорского органа будут видны погибшие клетки и отложения комплемента, что свидетельствует о процессе отторжения.
- Биопсия, как правило, показывает отсроченную картину отторжения, когда уже наступила клеточная гибель и можно видеть отложения комплемента в тканях. Лабораторный тест, подтверж-

Свое повреждающее действие на клетку донор-специфические HLA-антитела реализуют через активацию системы комплемента. Такую реакцию называют комплемент-зависимая цитотоксичность.

дающий наличие антидонорских HLA-антител дает возможность предсказать развитие этой реакции на самом раннем этапе, когда иммунная система только готовится к атаке, а повреждающее воздействие антител еще не реализовалось в комплемент-зависимую цитотоксичность. Это дает возможность заранее предпринять меры, направленные на удаление повреждающих антител из циркуляции.

В процессе активации каскада комплемента образуется свободный СЗd компонент комплимента, который можно обнаружить с помощью меченных моноклональных анти-СЗd антител (рисунок 4).

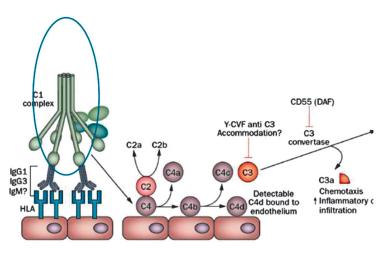


Рисунок 4.

Механизм действия донор-специфических антител через активацию системы комплемента.

• Однако показано, что среди пула циркулирующих донор-специфических HLA-антител не все они обладают комплемент-фиксирующей активностью. Обнаружить пул комплемент-фиксирующих HLA-антител среди всех HLA-антител данной специфичности позволяет специальный лабораторный тест, выполняемый на платформе Люминекс к C3d-компоненту комплемента. Появление этого теста в последние годы сделало возможным прогнозировать и предотвращать развитие гуморального отторжения на качественно новом уровне (рисунок 5).

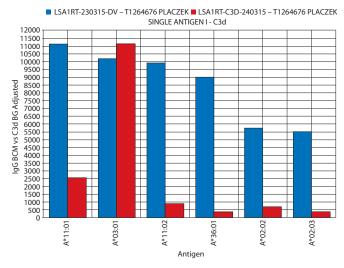
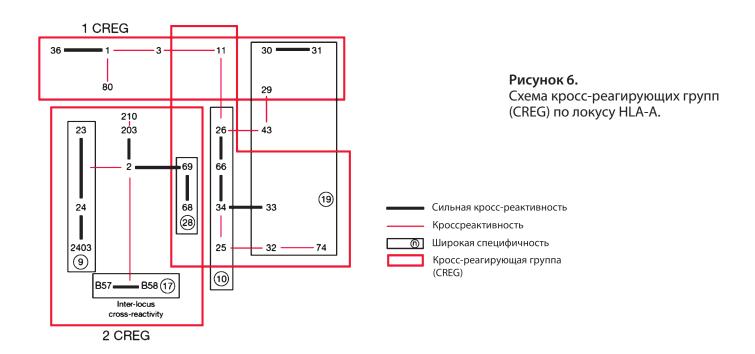


Рисунок 5.

Пример результата анализа HLA-антител, когда у реципиента были обнаружены общие анти-HLA антитела класса IgG (синие столбики) и комплемент-фиксирующие анти-HLA антитела (красные столбики).

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ



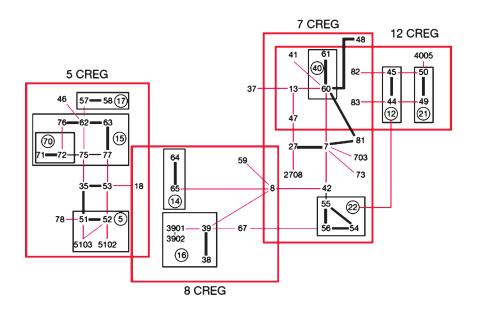


Рисунок 7. Схема кросс-реагирующих групп (CREG) по локусу HLA-B.

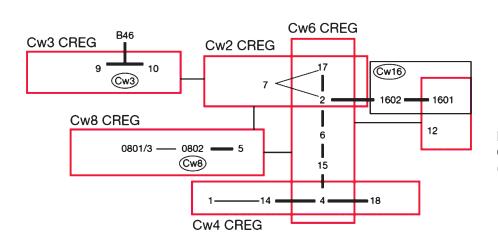


Рисунок 8. Схема кросс-реагирующих групп (CREG) по локусу HLA-Cw.

Наименование и рекв Лаборатория з	визиты центра (адр гканевого типиров				
Реципиент		Į	[онор		
ID реципиента 1265	ID донора 152				
Дата рождения	Дата рождения				
Пол	Пол				
Группа крови	Группа к	Группа крови			
Материал исследования		л исследова	 ния		
Дата взятия анализа	Дата взятия анализа				
Дата выдачи ответа		Дата выдачи ответа			
	· ·				
НLА-типирование	HLA-A	HLA-B	HLA-DRB1	HLA-DQB1	
Метод исследования (серология, SSP, SSO, SBT)		SSO I	uminex		
HLA генотип реципиента	A*02; A*25	B*07; B*15	DRB1*01; DRB1*03	Не определялось	
HLA генотип донора	A*02; A*11	B*15 ; B*35	DQB1*03 ; DRB1*15	DRB1*03; DQB1*05	
Выявленны	не антитела к Н	łLA			
Метод исследования (ИФА, Luminex)	Люминекс				
Индекс реактивных антител PRA%			5%		
Класс I А - не обнаружены В - не обнаружены С - не обнаружены Класс II					
DRB1 - не обнаружены DQA1/B1 - DQB1*01; 03; 05; 06; 08					
Донор специфические-антитела (DSA): DQB1*03; 05					
Виртуальный кросс-матч (DSA тест): положительны					
Серологический кросс-матч (СDС тест): отрицателн	ьный				
Заключение					
Обнаружены HLA-антитела к антигенам DQB1 (вто ными к антигенам донора. Виртуальный кросс-матч (кросс-матч): отрицательный. Пациент из группы о	- н положительні	ый. Серологич	еский цитотокс		

Рисунок 9. Пример бланка отчета лаборатории, проводившей трансплантационное обследование доноров и реципиентов.

Мультипараметрический анализатор Люминекс 200 (Luminex 200) в лабораторной диагностике при трансплантации солидных органов



Основные лабораторные тесты на генетическую и иммунологическую совместимость

- Определение HLA-генотипа реципиентов листа ожидания по локусам HLA A, B, DR.
- Определение HLA-генотипа донора по локусам HLA-A, B, Cw, DR, DQ.
- Определение предсуществующих HLA-антител у реципиентов листа ожидания для выявления HLA-сенсибилизации и определения показателя PRA%.
- Постановка прямой перекрестной пробы (cross-match).
- Посттрансплантационный мониторинг реципиента для предупреждения острого и хронического иммунологического отторжения.

Основные клинические преимущества

- Позволяет прогнозировать развитие ранней реакции отторжения до появления гистологически подтвержденного анализа посредством биопсии.
- Позволяет сократить количество инвазивных методов исследования в несколько раз.
- Позволяет направлять на трансплантацию высокосенсибилизированных реципиентов (PRA более 60%), благодаря определению профиля донор-специфических антител.
- Позволяет детектировать комплементфиксирующие антитела к HLA-антигенам с помощью выявления C3d компонента комплемента.
- Дает возможность проводить виртуальный «кросс-матч» реципиентам листа ожидания, что позволяет заранее планировать совместимость с потенциальным донором.
- Качественная диагностика на пред- и пост-трансплантационном этапе является залогом долгосрочного функционирования трансплантата и позволяет избежать повторных трансплантаций.

Основные методологические преимущества

- Позволяет проводить весь комплекс тестов на генетическую и иммунологическую совместимость на одной платформе.
- Сокращение времени исследования.
- Автоматизация процессов генотипирования, cross-match и исследования HLA-антител с автоматической интерпретацией результатов.
- Возможность сохранять донорский материал (клеточный лизат) для последующего мониторинга антидонорского иммунного ответа у реципиента.
- Снижение себестоимости теста по сравнению с ручными генетическими и иммунологическими методами.
- Возможность электронного обмена данными и результатами исследования с другими клиниками и online консультации с группой технической поддержки.



Информация для заказа

Каталожный номер	НАИМЕНОВАНИЕ НАБОРА	Количество тестов		
	Наборы для HLA-генотипирования методом SSO на платформе Luminex			
628911	Набор для генотипирования Lifecodes HLA-A SSO Typing kit	50 тестов		
628915	Набор для генотипирования Lifecodes HLA-B SSO Typing kit	50 тестов		
628921	Набор для генотипирования Lifecodes HLA-C SSO Typing kit	50 тестов		
628923	Набор для генотипирования Lifecodes HLA-DRB1 SSO Typing kit	50 тестов		
628930	Набор для генотипирования Lifecodes HLA-DQA1/B1 SSO Typing kit	50 тестов		
Наборы для определения HLA-антител на платформе Luminex				
628215	Набор для скрининга HLA-антител Lifecodes LifeScreen Deluxe	96 тестов		
628200	Набор для идентификации HLA-антител 1 класса Lifecodes ID I	24 теста		
628223	Набор для идентификации HLA-антител 2 класса Lifecodes ID II	24 теста		
265100	Набор для идентификации HLA-антител 1 класса с рекомбинантными антигенами Lifecodes Single Antigen (LSA I)	24 теста		
265200	Набор для идентификации HLA-антител 2 класса с рекомбинантными антигенами Lifecodes Single Antigen (LSA II)	24 теста		
265400R	Набор для определения компонента комплемента C3d Lifecodes C3d Detection	24 теста		



ЗАО БиоХимМак

119192, г. Москва, Ломоносовский проспект д. 29, корп. 1

телефон (495) 647-27-40 факс (495) 647-2763 e-mail: hla@biochemmack.ru

www.biochemmack.ru