

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель
Министра здравоохранения
Республики Беларусь

_____ Д.Л.Пиневич



_____ 2019 г.

Регистрационный № 019-0319

**МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ОТТОРЖЕНИЯ ТРАНСПЛАНТАТА
ПЕЧЕНИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ - РАЗРАБОТЧИК:

Государственное учреждение «Минский научно-практический центр
хирургии, трансплантологии и гематологии»

АВТОРЫ: д.м.н., доцент А.Е.Щерба, к.м.н., доцент С.В.Коротков,
к.м.н. Д.Ю.Ефимов, О.А.Лебедь, А.А.Сыманович, А.И.Киреева,
М.А.Фролова, А.Ю.Старцева, А.А.Гомон,
д.м.н., проф., член-корр. НАН Беларуси О.О.Руммо.

Минск, 2019

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д. Л. Пиневиц
25.04.2019
Регистрационный № 019-0319

**МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ОТТОРЖЕНИЯ ТРАНСПЛАНТАТА
ПЕЧЕНИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Минский научно-практический центр
хирургии, трансплантологии и гематологии»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, доц. А. Е. Щерба, канд. мед. наук, доц.
С. В. Коротков, канд. мед. наук Д. Ю. Ефимов, О. А. Лебедь,
А. А. Сыманович, А. И. Киреева, М. А. Фролова, А. Ю. Старцева,
А. А. Гомон, д-р мед. наук, проф., чл.-кор. НАН Беларуси О. О. Руммо

Минск 2019

Настоящая инструкция по применению (далее — инструкция) разработана с целью внедрения в клиническую практику малоинвазивной диагностики отторжения трансплантата печени, в т. ч. хронического антителоопосредованного отторжения.

Предлагаемый инструкцией метод может быть использован как в раннем послеоперационном периоде на стационарном этапе лечения, так и при диспансерном наблюдении пациентов в отдаленном периоде после трансплантации печени. Инструкция рассчитана на врачей-хирургов отделений трансплантации, врачей-трансплантологов и врачей-гастроэнтерологов амбулаторных кабинетов, врачей-реаниматологов отделений реанимации и интенсивной терапии и иных врачей-специалистов, оказывающих медицинскую помощь пациентам после трансплантации печени.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Программируемый нагревательный блок (амплификатор) для полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ).
2. ПЦР-бокс.
3. Мультиплексный анализатор.
4. Аппарат для твердофазного сэндвич-иммуноферментного иммуноанализа.
5. Одноразовые пробирки с антикоагулянтом.
6. Одноразовые пробирки для ПЦР-РВ объемом 0,2 мл.
7. Одноразовые сменные наконечники с фильтром и без фильтра.
8. Микропипетки.
9. Набор для выделения ДНК из крови.
10. Спирт этиловый ректификованный.
11. Реагенты для постановки и проведения ПЦР-РВ.
12. Наборы для низкоразрешающего молекулярно-генетического HLA-типирования.
13. Реагенты для определения уровня М30 и М65 методом твердофазного сэндвич-иммуноферментного иммуноанализа.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Ортотопическая трансплантация печени.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Выявление донор-специфических HLA-антител II класса в крови реципиентов

1. После констатации смерти мозга у умершего донора берут пробу цельной крови из периферической вены в пробирку с антикоагулянтом (для генотипирования по HLA).

2. На первом этапе выделяют ДНК донора с помощью автоматической станции выделения ДНК со средней концентрацией 50 нг/мкл в образце, после чего производят ПЦР-амплификацию генетического материала с праймерами, меченными биотином.

3. На следующем этапе осуществляют гибридизацию меченных продуктов амплификации с типизирующими нуклеотидными последовательностями, нанесенными на микросферы. Затем добавляют конъюгат «стрептавидин-фикоэритрин» и производят измерения на мультиплексном анализаторе с интерпретацией результатов с использованием соответствующего программного обеспечения.

4. При поступлении реципиента на трансплантацию печени, а также в случае возникновения дисфункции трансплантата производится забор крови в биохимическую пробирку на определение наличия донор специфических антител к HLA II класса в сыворотке реципиента.

5. Для выявления донор-специфических HLA-антител в крови реципиентов используют технологию мультиплексного анализа на мультиплексном анализаторе.

6. Пробирку с кровью центрифугируют в течение 10 мин при скорости 1500 об/мин.

7. Полученную сыворотку отбирают в стерильные микропробирки объемом 1,5 мл.

8. Выполняют анализ на мультиплексном иммуноферментном анализаторе, согласно инструкции по применению к медицинскому изделию.

9. Учет и анализ полученных результатов производят при помощи программы xPonent. Интерпретацию полученных данных осуществляют с использованием программного обеспечения Match it! Antibody.

Выявление M30- и M65-антител методом иммуноферментного анализа

Субъединицы M30 и M65 цитокератина 18 определяют методом твердофазного сэндвич-иммуноферментного иммуноанализа в плазме крови реципиентов. Стандарты и образцы реагируют с антителом M65, находящимся на твердой фазе, и конъюгированным с M30-антителом HRP (пероксидаза хрена), направленным против неопитопа K18Asp396. Стандарты, контрольные образцы и образцы M65 реагируют с антителом M6 твердой фазы, направленным против K18, и конъюгированным с M5-антителом HRP (пероксидаза хрена), направленным против другого эпитопа K18. Несвязанный конъюгат удаляют на стадии промывки. Добавляют субстрат. Развитие цветовой реакции останавливается, и считывается поглощение. Полученный цвет прямо пропорционален концентрации аналита. При построении стандартной кривой из известных концентраций по сравнению с измеренной оптической способностью можно рассчитать количество антигена в образце. Концентрация антигена выражается в

единицах на литр (U/L). Результаты ELISA M65 и M30 рассчитываются с использованием компьютерных методов (поглощение при 450 нм).

Управленческие решения

При появлении у реципиента после трансплантации печени клинико-лабораторных данных холестатического гепатита выполняют анализ на наличие донор-специфических HLA-антител II класса и уровня M30- и M65-антител методом иммуноферментного анализа. Уровень субъединицы M30 выше 1090 нг/мл и субъединицы M65 выше 1496 нг/мл свидетельствует о развитии аутоиммунного поражения трансплантата печени, что будет требовать эскалации иммуносупрессивной терапии (4-компонентная схема, плазмаферез, применение моноклональных антител в зависимости от клинико-биохимической активности и чувствительности к терапии). Высокий уровень донор-специфических HLA-антител II класса (MFI более 5000) свидетельствует о наличии у пациента антителоопосредованного отторжения, что будет требовать эскалации иммуносупрессивной терапии (4-компонентная схема, плазмаферез, применение моноклональных антител в зависимости от клинико-биохимической активности и чувствительности к терапии), а также мониторинга уровня донорспецифических HLA-антител II класса и коррекции терапии в зависимости от динамики данного показателя.

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 обдувать 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 применяемых антикоагулянтов в гематологии стандартом служат соли этилендиаминтетрауксусной кислоты. Не рекомендуется хранить пробирки с образцами крови и антикоагулянтом в холодильнике или при постоянном помешивании во избежание гемолиза.

Меры предосторожности

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