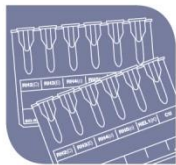
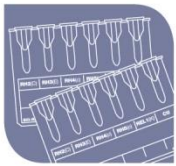


# Титрование: Вызов

*Paul Aerts*  
*Scientific Affairs Manager*



# ВВЕДЕНИЕ

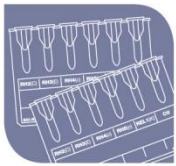


# Титрование

- Титрование – это полуколичественный метод
  - ✓ определения *относительной* концентрации антител

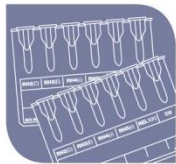
или

- ✓ сравнения силы экспрессии антигена на разных эритроцитах



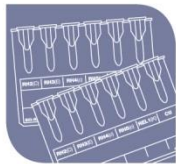
# Традиционное применение

- для беременных женщин
  - для оценки активности антител
  - чтобы определить, проводить ли и когда проводить более сложные исследования
    - которые могут быть инвазивными
    - и представляют риск для плода(и/или матери)
- при ABO несовместимых трансплантациях
- при исследовании идентификации антител
  - характеризуют антитела как HTLA
  - определение класса Ig (IgG и/или IgM)
  - действия по выявлению специфичности аутоантител



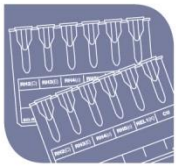
# Процедура (общепринятый пробирочный метод)

Шаг	Действие
1	Промаркируйте тестовые пробирки в соответствии с разведением образца: 1:1, 1:2, 1:4, и т.д.
2	Внесите 1 объем жидкости для разведения за исключением первой пробирки (неразбавленный или 1:1)
3	Добавьте равный объем образца в 1 и 2 пробирки (1:1 и 1:2)
4	Используя чистую пипетку перемешайте содержимое пробирки (1:2), затем перенесите один объем в следующую пробирку (1:4)
5	Продолжайте этот процес, каждый раз с чистой пипеткой и переносом в следующую пробирку. Удалите один объем из последней пробирки и сохраните для последующих разведений если потребуется.
6	Промаркируйте тестовые пробирки одну для каждого разведения
7	Используя отдельные пипетки для каждого разведения, перенесите достаточный объем (согласно процедуре испытания) из каждого разведения. Некоторые лаборатории будут работать с одной пипеткой, начиная с самого высокого разведения.
8	Проводите анализ используя метод соответствующий титрованию антител



# Определяйте титр правильно!

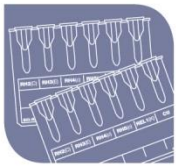
- Титр определяется как
  - обратная величина наибольшего разведения, показывающего агглютинацию + (1+)
- Например, если разведение 1:16, тогда титр = 16
- Отклонения в технике и присущая биологическая изменчивость (эритроциты, ...) могут быть причиной отличий результатов в одно разведение в **любом** направлении
  - Истинный титр антител 32 может показывать конечные точки при разведениях 1:16, 1:32 или 1:64
  - В этом случае: все три титра являются правильными результатами 16, 32 и 64



# Титр против балла?

- Титры иногда могут вводить в заблуждение, если силы агглютинации игнорируются
- Каждой силе агглютинации может быть присвоен балл
- Сумма баллов дает другое полуколичественное измерение

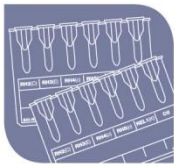
		Двукратное разведение										
		1	2	4	8	16	32	128	256	512	Титр	Балл
Образец 1	сила	3	3	3	2	2	2	1	1	±	256	
	балл	10	10	10	8	8	8	5	5	3		67
Образец 2	сила	4	4	4	3	3	2	2	1	±	256	
	балл	12	12	12	10	10	8	8	5	3		80



# Вариабельность

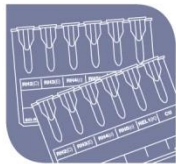
- Техническая вариабельность оказывает значительное влияние
- Попробуйте достичь наиболее единообразной практики
- Большие объемы дают более точные результаты, чем меньшие (подготовка разведений)
- Главное разведение – более точное, чем индивидуальные разведения
- Размороженные/замороженные образцы, не должным образом смешанные, приводят к ошибочным результатам
- Пипетки и пипетирование: меняйте наконечники
- Эритроциты: возраст, фенотип, % суспензии
- Считывание: четко определите конечную точку (+)
- Сравнение титров → тот же метод, те же условия, то же время, ...
- Повторение – параллель – титрование предыдущего образца
- В некоторых странах некоторые антитела дозируются не титрованием, а количественно: анти-D (RH1), анти-c (RH4)





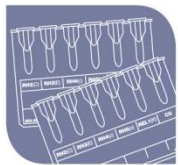
# Среда для разведения

- Очень разнообразные в зависимости от стандартов, рекомендаций и СОПов
  - Физ. раствор
  - БСА 6%
  - АВ сыворотка
  - АВ плазма
  - LISS → НЕЛЬЗЯ, неспецифическое поглощение глобулинов
- → ID- раствор для титрования
- используется в автоматизации → IN-500
  - Среды идентичные во всем
  - Высоко-точное разведение
  - Безупречное соотношение плазма/клетки

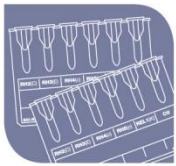


## Выбор эритроцитов

- Противоречивый
- Сильное проявление антигена в некоторых странах
  - DccEE ( $R_2R_2$ ) для анти-D
- Слабая экспрессия антигена в других странах
  - DCsee( $R_1r$ ) для анти-D
- Важно
  - те же условия → тот же фенотип все время
  - в параллели с предыдущим образцом

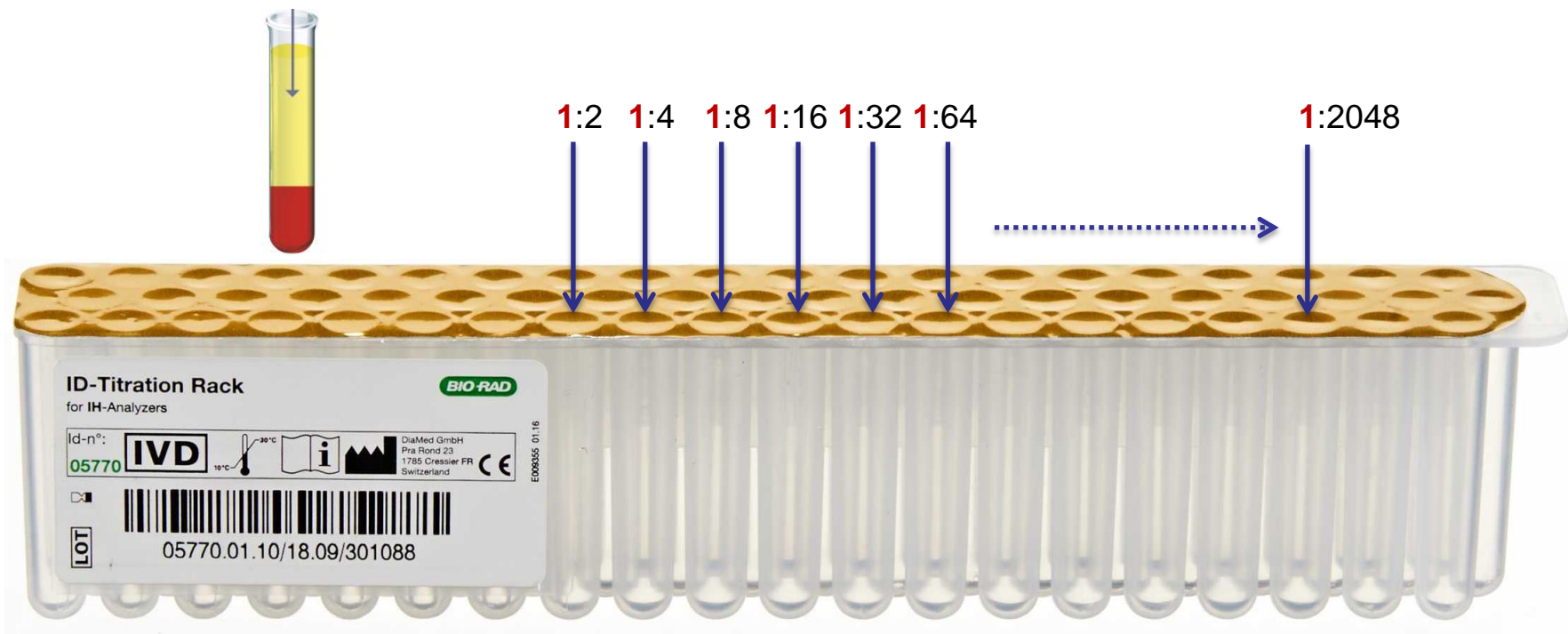


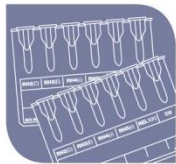
# ТИТРОВАНИЕ НА ИH-500



# Автоматизированное титрование

Быстрее – Проще – Надежнее

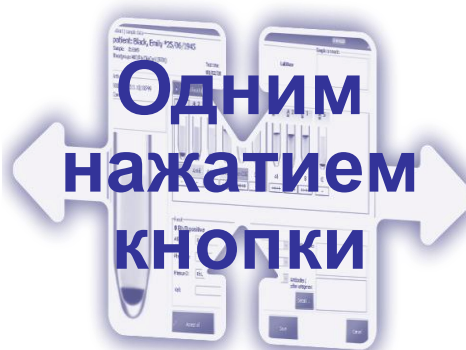




# Автоматизированное титрование

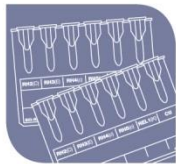
Титрование  
в вашей  
ежедневной  
практике

Диапазон  
разведения,  
адаптированный к  
вашей клинической  
практике



Используйте любые  
ID-эритроциты Bio-  
Rad или ваши  
адаптированные

Решение ID-титрование,  
разработано для  
идеального соответствия  
с ID-системой



# Автоматизированное титрование

Автоматизированные  
двухкратные серийные  
разведения от **1:1 до  
1:2048**

Выберите необходимый  
вам ряд титрования.

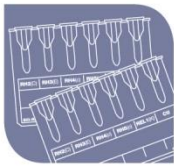
- **1:1 - 1:32**
- **1:1 - 1:2048**
- **1:64 - 1:2048**

Наиболее  
целостное решение  
для титрования

Используйте **любой  
реактив** указанный в **ИН-  
500**

Выберите один из трех  
вариантов карт:

- LISS/Coombs
- Coombs Анти-IgG
- NaCl



# Автоматизированное титрование: H-Com Пример

**Result verification - User LabUser** BIO-RAD

Patient / sample data  
**Green, Alma**

IH-500  
Titration LISS/Coombs (5053) 1-12, 37°C x  
0609

1.2048  
50530.00.00/17.03/000025  
Reaction comment:

**Current results** **Titration**

1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048
++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	++	+	-	-

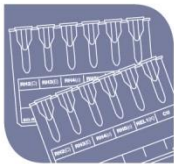
**Result**  
**ABS positive** Recalculate Interpretation

AB0:  ABS:  Known antibodies (text):

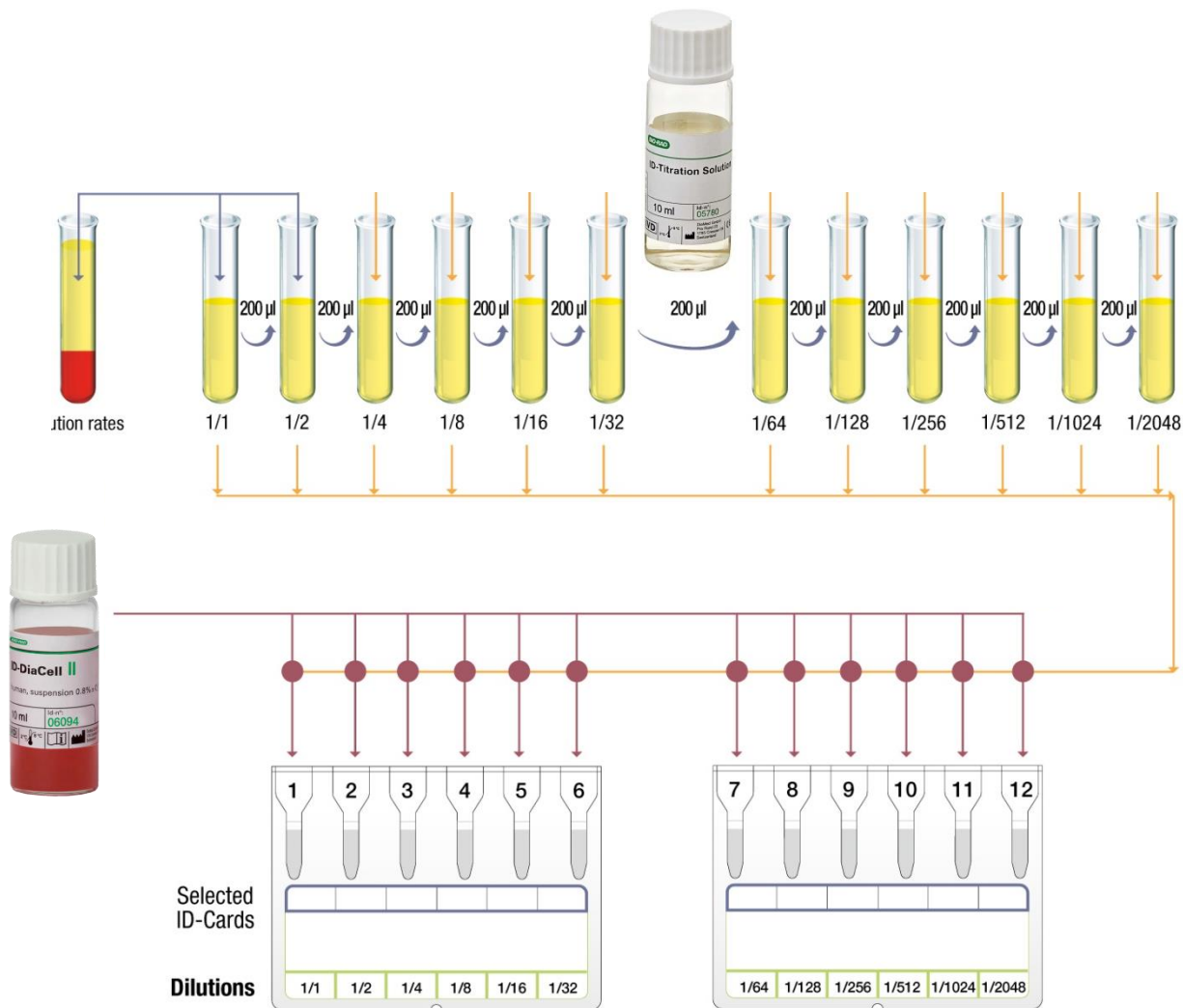
Phenotype:  DAT:

Rhesus-D:  Auto ctrl.:

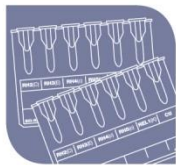
Kell:  Antibodies / other antigens:



# Титрование антител: краткое объяснение







# Автоматизированное титрование антител

## Разные ряды разведений

- 1:1 → 1:32
- 1:64 → 1:2048
- 1:1 → 1:2048

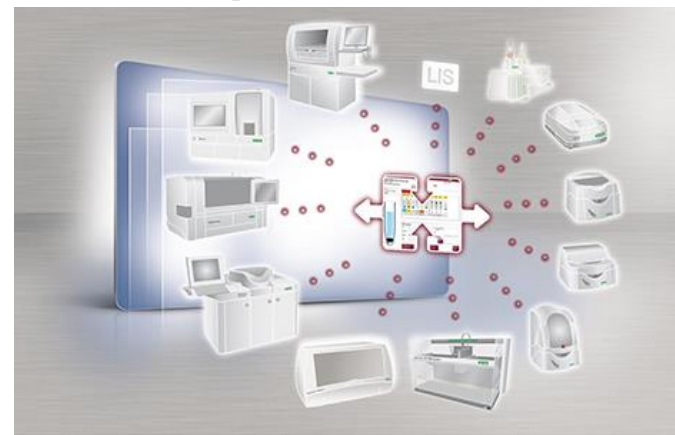
## Возможные карты

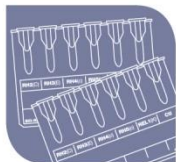
- Coombs Anti-IgG (5054)
- LISS/Coombs (5053)
- NaCl (5052)

## Эритроциты (Все эритроциты, зарегистрированные в приборе)

- Скрининговые эритроциты
- A<sub>1</sub>&B Эритроциты для перекрестного определения
- Эритроциты для идентификации
- Собственные клетки лаборатории

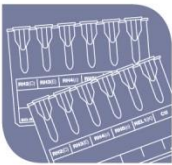
Все, что заказывается  
через ИТ-Сот





# Раствор для титрования & Штатив для титрования





# Автоматическое титрование - Запрос

1. Если : “Титрование возможно”
2. Флажок доступен для выбора выше «положительной» пробирки
3. Заказать титрование

Result verification - User LabUser BIO-RAD

Patient / sample data  
**Green, Alma (née Brown) \*12/10/1988 (F) [48583]**  
Sample: 2017022201 Test time: 22/02/2017 17:14 Processed by: IH-Result Simulator User  
IH-500 200013: Verified by:  
Ab. screening: Ib,IIb,IIIb (Enzyme bromelin) (5052)

Ib  
50520.00.00/17.03/000016  
Reaction comment:

**Current results**

1	2	3	1	2	3
I	II	III	I b	II b	III b
-	+++	-	-	+	-

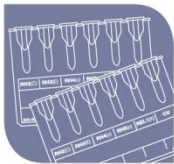
Result  
**ABS positive**

AB0:  ABS: ABS positive  
Phenotype:  DAT:   
Rhesus-D:  Auto ctrl.:   
Kell:

Known antibodies (text):   
Antibodies / other antigens:

**Titration possible**

Buttons: Accept all, Order titration, Save, Cancel



# Автоматическое титрование - Запрос

Также возможно через “Новый запрос”

**New requests** BIO-RAD X

**Patient**

**Test**

- Ab.screening: I,II,III (IAT) (5053)
- Ab.screening: Ib,IIb,IIIb (Enzyme bromelin) (5052)
- Titration LISS/Coombs (5053) 1-12, 37°C x 0608
- Titration LISS/Coombs (5053) 1-12, 37°C x 0609
- Titration LISS/Coombs (5053) 1-12, 37°C x 0610
- Titration LISS/Coombs (5053) 1-6, 37°C x 0608**
- Titration LISS/Coombs (5053) 1-6, 37°C x 0609
- Titration LISS/Coombs (5053) 1-6, 37°C x 0610
- Titration LISS/Coombs (5053) 7-12, 37°C x 0608
- Titration LISS/Coombs (5053) 7-12, 37°C x 0609
- Titration LISS/Coombs (5053) 7-12, 37°C x 0610

Ordered samples:

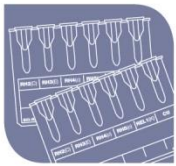
**Sample**

Priority

**Order now**

**Close**

**BIO-RAD**



# Титрование - Результат

- Отдельная вкладка «Титрование» в результатах
- Интерпретированы реакции в отдельных пробирках
- Результаты титрования должны/могут быть добавлены как комментарий

Result verification - User LabUser BIO-RAD

Patient / sample data  
**Green, Alma (née Brown) \*12/10/1988 (F) [48583]**  
Sample: 2017022201 Test time: 22/02/2017 18:06 Processed by: IH-Result Simulator User  
IH-500 200013: Verified by:  
Titration LISS/Coombs (5053) 1-12, 37°C x 0609 (06090.00.0)

1:2048  
50530.00.00/17.03/000025  
Reaction comment:

**Current results** **Titration**

1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048
+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-	-

Result:  
**ABS positive**

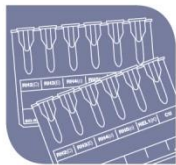
AB0:  ABS:  Known antibodies (text):   
Phenotype:  DAT:   
Rhesus-D:  Auto ctrl.:  Antibodies / other antigens:   
Kell:

Recalculate Interpretation

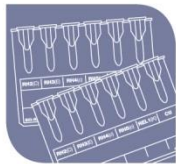
Details ...

Accept all Save Cancel

2

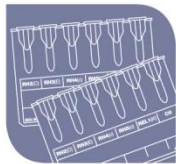


# ТИТРОВАНИЕ АНТИТЕЛ ПОКАЗАННОЕ ВОВРЕМЯ БЕРЕМЕННОСТИ



## Обоснование

- Во время беременности
  - уровень (титр) материнских IgG может помочь в предсказании возникновения ГБПН
  - и
  - Указать на потребность (или ее отсутствие) в дополнительном мониторинге плода



# Типичный рабочий процесс

При обращении  
(18 нед)

- Скрининг антител
- Если + → Идентификация
- Если известны как возможная причина ГБПН → титрование (01)
- Клинический титр?
- Сохранить образец при - 20°C

С установленными  
интервалами  
( 2 - 4 недели)

- Образуются ли новые антитела?
- Выполняйте титрование **предыдущего** образца **и нового** параллельно (те же условия, тоже время)
- Значительное увеличение титра? Да или нет? Значительное = повышение на два титра (см. примеры)

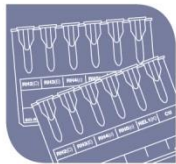
Клинические  
наблюдения?

- Клиницист принимает решение о последующих действиях
  - специфичность
- Значительное увеличение титра (существуют исключения)

При рождении

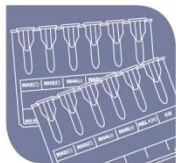
- Титр становится неактуальным
- ПАГТ новорожденному?
- Желтуха?
- ГБПН?





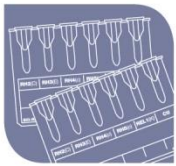
# Клинический титр

- Критический ли титр?
  - 16 обычно считается значительным, приводящим к плотному мониторингу
  - Установите ваши собственные стандарты
  - следует утвердить: метод и фенотип эритроцитов
- Для анти-D, анти-c стандарты ( $\text{МЕ}/\text{мл}^{-1}$ ) доступны
- В соответствии с англйскими стандартами, анти-D и анти-c больше не титруются, а определяются количественно



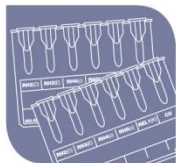
## UK – анти-D и анти-c

<b>Анти-D (RH1)</b>	<b>Прогнозируемый клинический результат</b>
< 4 МЕ/мл <sup>-1</sup>	ГБПН маловероятна, продолжайте мониторинг
4 – МЕ/мл <sup>-1</sup>	Умеренный риск ГБПН, направление к специалисту
> 15 МЕ/мл <sup>-1</sup>	Высокий риск ГБПН, направление к специалисту
<b>Анти-c (RH4)</b>	
< 7.5 МЕ/мл <sup>-1</sup>	ГБПН маловероятна, продолжайте мониторинг
7.5 – 20 МЕ/мл <sup>-1</sup>	Умеренный риск ГБПН, направление к специалисту
> 20 МЕ/мл <sup>-1</sup>	Высокий риск ГБПН, направление к специалисту



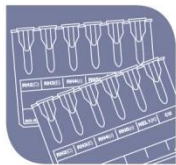
## Использование стандарта

- Стандарт с известным титром по сравнению с данным фенотипом
- ! → титры 16, 32 и 64 согласуются
- См. также ABO (далее)
  - NIBSC/ВОЗ стандарт 14/300 имеет номинальный титр 256 против A1 эритроцитов (анти-A), и B эритроцитов (анти-B)



## Пример

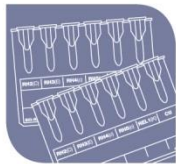
<u>Новый</u> образец на 20 неделе	<u>Предыдущий</u> образец (18 недель) Повторен в параллели на 20 неделе	Титр <u>стандарта</u> ожидали 32	Заключение
4	4	32	нет увеличения в титре
32	4	32	значительное увеличение в титре
16	16	64	нет увеличения в титре
4	4	4	нет заключения потому что стандарт не получился → повторите: новые серии разведений, новая суспензия эритроцитов



## Пример анти-D (2 последовательных образца)

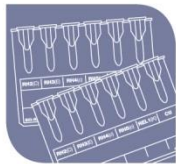
- Используя стандарт анти-D
- С ожидаемым титром, например 32 vs DCcEe эритроцитов

2ой образец	1ый образец	Титр стандарта (32)	Заключение
4	4	32	нет увеличения в титре
32	4	32	увеличение в титре
16	16	64	нет увеличения в титре



## Микротитрование анти-D (Франция)

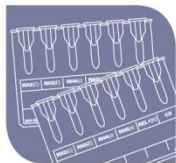
- Результаты выражаются в  $\text{нг/мл}^{-1}$
- Попытка различать активную аллоиммунизацию и пассивно приобретенную анти-D (профилактику)
- Концентрация образца оценивается в параллельном титровании с разведениями стандарта  
@  $28 \text{ нг/мл}^{-1}$
- Этот результат затем интерпретируется против таблицы с ожидаемой концентрацией анти-D в определенный день после введения нормальной дозы 200 или 300 мкг



# Микротитрование

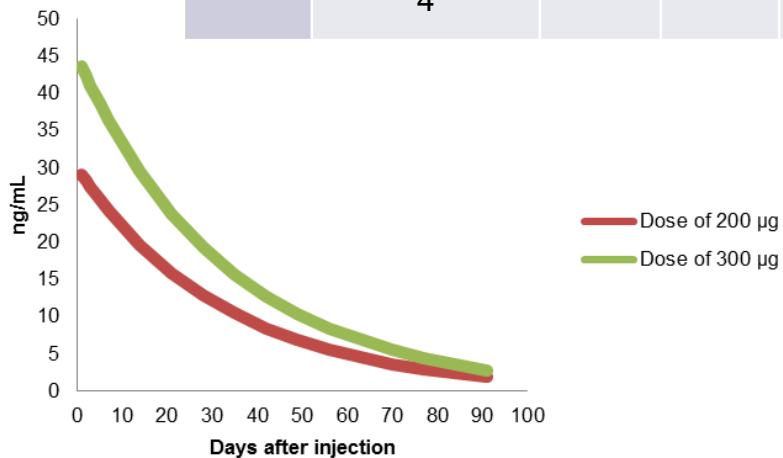
- [Brossard et al. Feuille Biol 2002;43:11-17](#)

200 мкг доза		300 мкг доза	
Дни после инъекции	Ожидаемая концентрация (нг/мл <sup>-1</sup> )	Дни после инъекции	Ожидаемая концентрация (нг/мл <sup>-1</sup> )
1	29.1	1	43.7
2	28.25	2	42.4
3	27.4	3	41.1
4	25.8	4	38.7
etc.			



# Примеры микротитрования

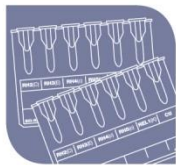
	Разведения	1:4	1:8	1:16	A	*	B	=	C
<b>Стандарт @ 28 нг/мл<sup>-1</sup></b>	Концентрации нг/мл <sup>-1</sup>	7	3.5	1.75	Взаимная последняя реакция образца		Вывод: стандарт, показывающий ту же интенсивность, что и образец		Вывод: образец нг/мл <sup>-1</sup>
	Результаты	++++	+++	+					
<b>Образцы</b>	1	+	0	0	4		1.75		7
	2	++++	++++	+++	16		3.5		56
	3	++++	++++	++++	>16		7		>112
	4	+++	+	0	8		1.75		14



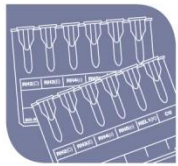
Результаты, которые следует интерпретировать по отношению к дате отбора образца, т. е. дни после инъекции





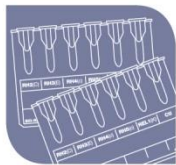


# АВО НЕСООТВЕТСТВУЮЩИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ



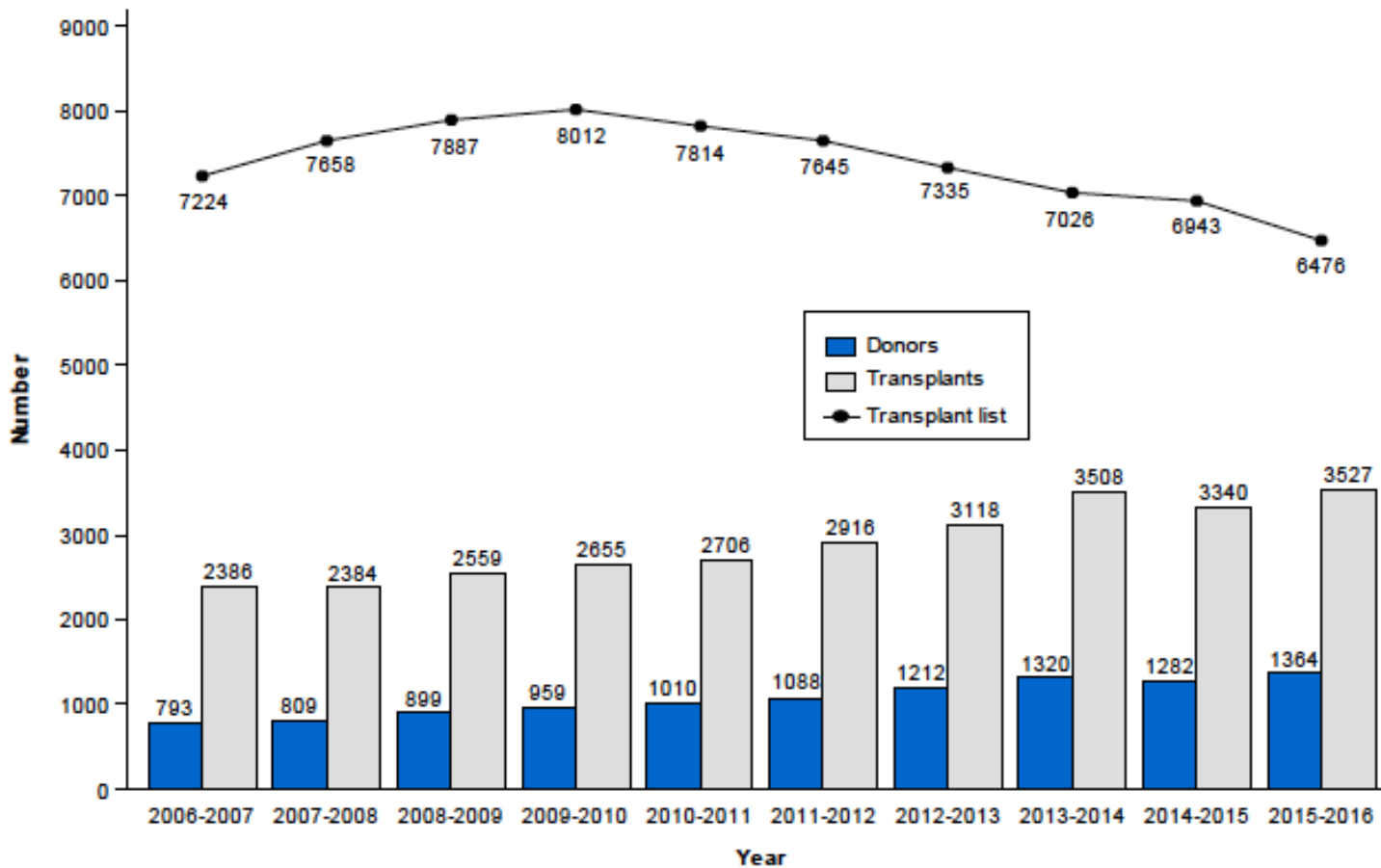
# Титрование анти-А и анти-В

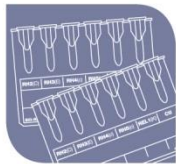
- АВО несовместимая трансплантация паренхиматозных органов
- АВО несовместимая трансплантация стволовых клеток
- {АВО ГБПН}
- клинические решения, принятые на основе титра
- необходимы точные результаты



# Трансплантационная активность в Великобритании 2006-2012

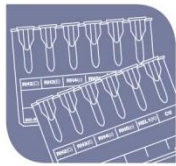
Figure 2.1 Number of deceased donors and transplants in the UK, 1 April 2006 - 31 March 2016, and patients on the active transplant list at 31 March





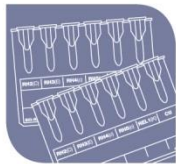
## Титрование при подготовке трансплантации

- Если титр слишком высок, пациент не может перейти на список несовместимых ABO (ABOi) трансплантаций, например  $> 256$
- Пациенту назначают Rituximab для подавления антител, обычно за 30 до трансплантации  
transplantation  
обычно до  $< 32$
- Или более суровой альтернативой является ежедневная замена/абсорбция плазмы начиная за 10 дней до трансплантации до 2 дней, с мониторингом титров  
обычно до  $< 4$
- *Критические титры все еще обсуждаются*



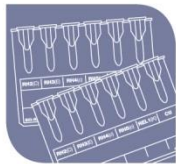
# ABO титры - стандартные методы?

- Нет? Еще нет IgG? IgM? или оба?
  - в общем случае предполагается, что
    - IgM, реагирует лучше при низкой температуре → прямая агглютинация при комнатной температуре
    - А IgG, реагирует лучше при 37°C → непрямо́й антиглобулиновый тест
  - НО
    - НПАГТ определяет все → IgM и IgG
    - При комнатной температуре определяются IgM и IgG в некоторых случаях
    - Обработайте с DTT , чтобы удалить IgM → НПАГТ



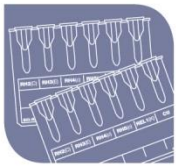
# Вариабельность?

- Подготовьте разведения
- Соотношение эритроциты/плазма
- Разбавитель
- IgG или полиспецифические ID-карты?  
влияние активации комплимента  
→ использование IgG ID-карт делает это неуместным)
- DTT обработка?
- Конечная точка
- Стандарт ?



## Последствия для пациента

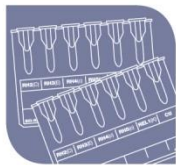
- Риск отторжения?
- *Пере-* плазмоферез?
- Отказ в пересадке АВОі из-за неправильного результата?
- Великобритания в ближайшие годы планирует увеличить трансплантацию на 50%
- → требуется стандартизация!



# Результаты NEQAS в Великобритании

- Различные методы
- IgG/IgM ?
- Ошибки в определении подклассов A ( A2 vs A1 эритроцита использованы used)
- НПАГТ более воспроизводим чем при комнатной температуре
- Рекомендованы стандартные методы (ID гель)
  - лучшая воспроизводимость
  - более жесткий диапазон, чем в пробирках
  - другие методы колоночной агглютинации, последовательно превышающие ID гель, но менее воспроизводимые
  - Заключение (Transplantation 2014;97(3))
  - Мониторинг через EQA (непрерывный)
  - Потребность в стандарте (сделано)
  - критические титры, которые будут установлены (в разработке)





# анти-А и анти-В ВОЗ стандарт теперь доступен

- ✓ Номинальный титр
- ✓ 128 комнатная температура
- ✓ 256 НПАГТ



Medicines & Healthcare products  
Regulatory Agency

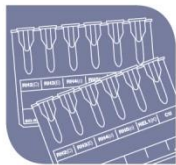
**WHO Reference Reagent**  
**High titre anti-A and anti-B in serum**  
**NIBSC code: 14/300**  
**Instructions for use**  
**(Version 1.0, Dated 03/12/2015)**

## 1. INTENDED USE

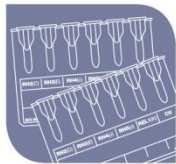
Testing for high titre anti-A and anti-B in serum/plasma is important to

- Minimise the risk of causing clinically significant haemolysis when blood components rich in plasma containing high titre anti-A/B are transfused to patients of blood groups A, B or AB e.g., plasma concentrates.
- Facilitate mismatched kidney transplants from living donors. Transplantation can be performed successfully if the recipient has sufficiently low levels of anti-A and anti-B. Patients may be considered for admission to transplant programmes if anti-A/anti-B titres are within nominal cut-off values.
- Identify high titre anti-A/B plasma for exclusion from manufacture of blood products such as IVIG, where passive transfer of IgG anti-A/B to recipients can cause haemolysis.

However, anti-A and anti-B titrations are notoriously inconsistent across laboratories, even when using a common procedure and pooled red cells, often showing 32-fold variation in titres for the same sample. Defining 'limits' or 'cut-offs' for various applications in the absence of a reference preparation is therefore meaningless. The availability of this reference material should help overcome such inter-laboratory variability.



# ДРУГИЕ ПРИМЕНЕНИЯ

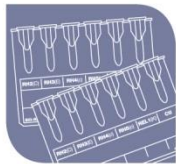


# HTLA антитела и титрование

*“Термин” HTLA – разговорное выражение предназначенное для описания «довольно грубо» серологических результатов этой группы антител и не предназначены для определения специфичности антител (цитата из последнего JJ Moulds).*

Разведение	Без разведения	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
Низкий титр Низкая авидность	<b>+/-</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Низкий титр Высокая авидность	<b>2+</b>	<b>2+</b>	<b>1+</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Высокий титр Низкая авидность	<b>1+</b>	<b>1+</b>	<b>1+</b>	<b>+/-</b>	<b>+/-</b>	<b>+/-</b>	<b>+/-</b>	<b>0</b>
Высокий титр Высокая авидность	<b>3+</b>	<b>3+</b>	<b>3+</b>	<b>2+</b>	<b>2+</b>	<b>1+</b>	<b>1+</b>	<b>+/-</b>

В этой таблице все HTLA характеристики (серым) четко продемонстрированы: это "неожиданно" наблюдать, что слабо-реактивные антитела показывают реакции до разведения



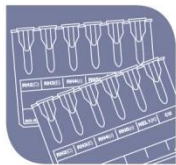
# Тепловые антитела и титрование

Rh фенотип	Титр							
	2	4	8	16	32	64	128	256
dce/dce								
rr	4+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0
RH:-1,-2,-3,4,5								
DcE/DcE								
R <sub>1</sub> R <sub>1</sub>	4+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0
RH:1,2,-3,-4,5								
DcE/DcE								
R <sub>2</sub> R <sub>2</sub>	3+	2+	1+	0	0	0	0	0
RH:-1,-2,3,4,-5								

- В этом примере образец титруется против E-e+ (rr and R<sub>1</sub>R<sub>1</sub>) и E+e- (R<sub>2</sub>R<sub>2</sub>) клеток.
- Результаты можно интерпретировать как показывающие «относительную специфичность» для e (RH5) антигена.
- Такая реакция должна подтверждаться путем тестирования против большего числа примеров, в этом случае, e+ и e- клеток

Пример взят из

Petz LD and Garratty G, Immune Hemolytic Anemias 2nd Ed, Churchill Livingstone, Philadelphia 2004



# Фенотипирование ПАГТ + эритроциты титрованием

- Фенотипирование ПАГТ+ эритроциты с использованием НПАГТ реактивов приводит к неинтерпретируемым результатам
- В таких случаях типирование может проводиться путем измерения количества специфических антител, оставшегося в типизирующем реактиве после адсорбции с эритроцитами пациента, и сравнивая его с использованием адсорбции на известных эритроцитах с одной и двумя дозами

Эритроциты использованные для адсорбции анти-Fya	Разведения адсорбированного анти-Fya реактива						Общий счет
	Без разведения	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	
Fy(a+b+)	2+	1+	1+	+/-	0	0	21
Fy(a+b-)	1+	1+	0	0	0	0	10
Fy(a-b+)	3+	3+	2+	2+	1+	0	41
Пациент	2+	1+	0	0	0	0	13

Эти результаты показывают, что пациент вероятно - Fy(a+).

Спасибо!