

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «РОССИЙСКИЙ  
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГЕМАТОЛОГИИ И  
ТРАНСФУЗИОЛОГИИ»  
ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА**

**ДИАГНОСТИКА АУТО-И АЛЛОАНТИТЕЛ  
К АНТИГЕНАМ ГРАНУЛОЦИТОВ**

**(МЕДИЦИНСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ)**

**Санкт-Петербург  
2012**

## АННОТАЦИЯ

Антитела к антигенам гранулоцитов могут являться причиной таких клинических синдромов как аутоиммунная нейтропения, неонатальная аллоиммунная нейтропения и синдром острой легочной недостаточности после трансфузии. Однако, из-за отсутствия эффективных методов исследования определение и идентификация клинически значимых гранулоцитарных антител затруднены, и диагностика перечисленных состояний является сложной задачей.

Для выявления ауто- и аллоантител к антигенам гранулоцитов мы адаптировали метод агглютинации в геле, предусматривающий использование диагностических карт (ID Micro Typing System, DiaMed, Switzerland), обычно применяемый для выявления эритроцитарных антител.

Метод показал воспроизводимость результатов обнаружения антигранулоцитарных антител и определения их принадлежности к различным классам иммуноглобулинов.

Технология предназначена для врачей-лаборантов. Уровень внедрения: многопрофильные больницы.

**Организация заявитель:** Федеральное государственное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии» Федерального медико-биологического агентства (ФГУ РосНИИГТ ФМБА России). 191024, Санкт-Петербург, ул.2-я Советская, 16.

### **Авторы:**

Доктор биологических наук, профессор Н.В.Минеева

Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Е.В. Елхина,

Научный сотрудник Н.Н.Бодрова, мл.н.сотр. Заварзина О.А., мл.н.с. Гавровская С.В., мл.н.с. Поединенко И.В.

### **Рецензенты:**

И.Г. Дуткевич, доктор медицинских наук, профессор кафедры трансфузиологии МАПО, Санкт-Петербург.

Т.В.Вавилова, доктор медицинских наук, профессор, зав кафедрой клинической лабораторной диагностики Санкт-Петербургской медицинской академии им. И.И.Мечникова.

Серия АА



0001159

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ  
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

# РАЗРЕШЕНИЕ

НА ПРИМЕНЕНИЕ НОВОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ

ФС № 2011/ 210

от «28» мая 2011 г.

**«Диагностика ауто-и аллоантител к антигенам гранулоцитов»**

Разрешение выдано на имя: Федеральное государственное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии» Федерального медико-биологического агентства (ФГУ «РосНИИГТ» ФМБА России)  
191024, Санкт-Петербург, 2-я Советская ул., д. 16

**Показания к использованию медицинской технологии:**

- Исследование аутоантител к гранулоцитам при диагностике причин нейтропении, обусловленной аутоантителами.
- Исследование аллоантител к антигенам гранулоцитов при диагностике несовместимости мать-плод по антигенам гранулоцитов

**Противопоказания к использованию медицинской технологии:**

Противопоказаний нет.

**Возможные осложнения при использовании медицинской технологии и способы их устранения:**

При использовании данной медицинской технологии осложнений не выявлено.

Врио руководителя



Е.А.Тельнова

Санкт-Петербург

Лист 1

## ВВЕДЕНИЕ

Нейтропения проявляется снижением количества нейтрофилов ниже  $1,8 \times 10^9$  / л. и может сопровождать течение гематологических, онкологических и инфекционных заболеваний. Синдром сопровождается рецидивными бактериальными инфекциями.

При этом нейтропения может быть обусловлена разрушением нейтрофилов ауто- или аллоантителами (иммунная нейтропения), а может развиваться без присутствия антител как результат инфекционных процессов (приобретенная нейтропения). Приобретенная нейтропения типична для вирусного гепатита, эпидемического паротита, гриппа, кори, краснухи, полиомиелита, ветряной оспы, брюшного и сыпного тифа, паратифа А и В, бруцеллеза, орнитоза, малярии, висцерального лейшманиоза, тяжелых инфекционно-токсических процессов (сепсис, дифтерия), коклюша, инфекционного мононуклеоза, а также коллагенозов.

Аутоиммунная нейтропения обусловлена разрушением нейтрофилов аутоантителами или ассоциирована с другими аутоиммунными заболеваниями.

Нейтропения может быть также вызвана аллоантителами. Чаще всего встречается неонатальная аллоиммунная нейтропения, вызванная разрушением нейтрофилов плода антителами матери. Формирование антител у матери вызывают антигены нейтрофилов плода, наследуемые от отца и отсутствующие у матери. Антитела матери проходят через плаценту к плоду и вызывают разрушение его нейтрофилов. Количество нейтрофилов при этом может снижаться до  $0,1-0,2 \times 10^9$ /л. Наиболее часто неонатальная аллоиммунная нейтропения вызывается материнскими антителами против NA1, NA2 антигенов нейтрофилов плода. Антитела другой специфичности могут также вызвать нейтропению, но встречаются такие случаи редко.

Аллоиммунная неонатальная нейтропения встречается в одном-двух случаях на 300-1000 родов). Так как симптомы заболевания часто легкие и неспецифические, зачастую она остается не выявленной. Однако имеются случаи тя-

желой нейтропении, сопровождающейся инфекциями, при которых смертность составляет 5%.

Скрининг аллоантител к антигенам гранулоцитов до настоящего времени остается технически сложной задачей. Наиболее широко используемый метод лейкоагглютинации, проводимый в пробирках и микроячейках, выявляет только антитела IgM. Другие методы, такие как иммунофлуоресцентные тесты, оцениваемые посредством флуоресцентной микроскопии или цитометрии, а также метод иммобилизации гранулоцитарных антигенов моноклональными антителами (MAIGA), предполагают наличие моноклональных антител, специфичных к каждому из множества гранулоцитарных гликопротеинов. При этом все методы обладают разной чувствительностью в отношении антител к антигенам гранулоцитов разных классов иммуноглобулинов, что может приводить к ложноотрицательным результатам при скрининге антител. Кроме того, эти методы являются дорогостоящими для применения в рутинной практике. Для скрининга антител необходимо ежедневно готовить свежие тест-гранулоциты, так они имеют короткую продолжительность жизни и не могут храниться. Все это затрудняет сопоставление результатов исследования антител гранулоцитов, полученных в разных лабораториях

Отсутствие эффективных методов выявления антигенов гранулоцитов и антител к ним приводит к тому, что остаются неизученными особенности ауто- и аллосенсибилизации к гранулоцитам, а так же частота встречаемости антигранулоцитарных антител среди больных, имеющих многократные трансфузии. Мало данных об особенностях проявления аллоиммунных нейтропений у новорожденных, матери которых имеют антигранулоцитарные антитела.

Медицинская технология «Диагностика ауто- и аллоантител к антигенам гранулоцитов» является новой, так как в ней впервые представлен простой метод, позволяющий выявлять ауто- и аллоантител к антигенам гранулоцитов путем использования способа агглютинации в геле.

## **ПОКАЗАНИЯ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ**

1. Для исследования аутоантител к гранулоцитам при диагностике причин нейтропении, обусловленной аутоантителами.
2. Для исследования аллоантител к антигенам гранулоцитов при диагностике несовместимости мать-плод по антигенам гранулоцитов.

## **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ МЕТОДИЧЕСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ**

Противопоказаний нет.

## **МАТЕРИАЛЬНО-ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ МЕДИ- ЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ**

- Стандартное обеспечение клинико-диагностической лаборатории.
- ID-карты “DC-Screening ” и анти- IgG производства фирмы «ДиаМед ГмбХ» Швейцария, регистрационное удостоверение № ФСЗ 2010/08227 от 03 ноября 2010г.
- ID-центрифуга производства фирмы «ДиаМед ГмбХ» Швейцария, регистрационное удостоверение № ФСЗ 2010/08227 от 03 ноября 2010г.

## **ОПИСАНИЕ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ**

Образцы крови для выделения гранулоцитов заготавливают на стабилизаторе 5% EDTA натрия, центрифугируют 10 мин при 1500 оборотах в мин. Лейкопленку переносят в другую пробирку и заливают 0,83% раствором хлорида аммония, смесь выдерживают 10 мин для лизиса эритроцитов. После повторного центрифугирования удаляют супернатант, а осадок гранулоцитов отмывают дважды физиологическим раствором натрия хлорида.

Выявление аутоантител к антигенам гранулоцитов осуществляют методом агглютинации в геле. Для дифференциации принадлежности аутоантител к

классам иммуноглобулинов или выявления компонентов комплемента используют ID-карты «DC-Screening I». ID-карта «DC-Screening I» состоит из пяти микропробирок, содержащих моноспецифические антиглобулиновые реагенты: анти-IgG, -IgA, -IgM, -C3c и анти-C3d, суспензированные в геле, и одной микропробирки отрицательного контроля.

Конфигурация ID-карты позволяет выявлять клинически значимые антитела и проводить исследования одновременно за один этап.

Для выявления аутоантител методом агглютинации в геле 10мкл гранулоцитов суспендируют в 1 мл раствора ID-Diluent 2. Маркируют ID-карту «DC-Screening I», указав имя или номер пациента. Во все микропробирки карты добавляют 50 мкл суспензии гранулоцитов. Центрифугируют ID-карту в течение 10 мин. Для визуализации агглютинации гранулоцитов антителами добавляют в каждую микропробирку 50 мкл эритроцитов и снова центрифугируют 10 мин. Результаты интерпретируют следующим образом:

*Положительная реакция:* агглютинированные клетки образуют красный слой на поверхности или в толще геля.

*Отрицательная реакция:* клетки образуют компактный осадок на дне микропробирки.

В микропробирке отрицательного контроля (ctl) агглютинация должна отсутствовать, что свидетельствует о правильности проведения теста и отсутствии неспецифичности реакции.

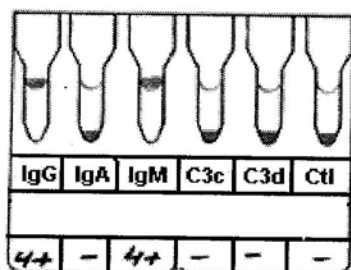


Рис. 1. Исследование аутоантител к гранулоцитам в ID-карте «DC-Screening I».

Агглютинированные клетки на поверхности геля – положительный результат, осадок на дне пробирки – отрицательный результат. Положительный результат в пробирках, содержащих анти-IgG и анти-IgM реактивы, свидетельствует о принадлежности гранулоцитарных антител к классам IgG и IgM. Отрицательные результаты в пробирках, содержащих анти-IgA и C3c и C3d реактивы, свидетельствуют об отсутствии гранулоцитарных антител класса IgA и адсорбции на клетках компонентов компонента.

Исследование аллоантител к гранулоцитам проводят в сыворотке с образцами гранулоцитов доноров. При диагностике иммунологических конфликтов мать-плод/новорожденный по антигенам гранулоцитов, аллоантитела у матери исследуют с образцами свежезаготовленных гранулоцитов ребенка или отца ребенка. Используют агглютинацию в геле в картах, содержащих анти-IgG. Для выявления аллоантител во все микропробирки карты добавляют 50 мкл суспензии гранулоцитов, затем 50 мкл сыворотки. Выдерживают карту при 37<sup>0</sup>С 15 мин. Затем центрифугируют в ID центрифуге в течение 10 мин.

Для визуализации агглютинации гранулоцитов антителами добавляют в каждую микропробирку 50 мкл эритроцитов и снова центрифугируют 10 мин, затем оценивают результат.

Исследование аллоантител методом лейкоагглютинации проводят в микрокамерах, для чего помещают в 10 мкл исследуемой сыворотки в микропробирки и добавляют равное количество гранулоцитов, инкубируют 60 мин в термостате при 37<sup>0</sup>С, после чего легко встряхивают и учитывают результат под микроскопом по наличию или отсутствию агглютинатов лейкоцитов.

## **ВОЗМОЖНЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ И СПОСОБЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ**



При использовании предлагаемой медицинской технологии осложнений не наблюдается.

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ

С целью оценки эффективности использования медицинской технологии было проведено исследование аутоантител к гранулоцитам в крови больных с признаками нейтропении, а также исследование пар мать-плод на наличие аллоантител и иммунологического конфликта.

Для исследования аутоантител к антигенам гранулоцитов были отобраны образцы крови 293 больных, имеющих в анамнезе нейтропению или лейкопению. Результаты выявления антител методом агглютинации в геле приведены в таблице 1.

Антитела были выявлены у 179 человек из 203 больных с лейкопенией (88,18%). У больных с нейтропенией антитела выявлены в 81 случае из 90 исследованных (90% обследованных).

*Таблица 1*

### Выявляемость аутоантител к гранулоцитам у больных с нейтропенией и лейкопенией

Больные с симптомами	Количество обследованных больных	Аутоантитела к гранулоцитам	
		Выявлены	Не выявлены
Лейкопения	203	179	24
Нейтропения	90	81	9

Группой контроля служили образцы нейтрофилов, выделенные из крови здоровых лиц – доноров. Аутоантитела были выявлены у двух доноров из 76, что составило 2,6%.

Для исследования принадлежности выявленных аутоантител к классам иммуноглобулинов использовали ID карты для прямого антиглобулинового теста, содержащие следующие реактивы: анти-IgG, -IgA, -IgM, -C3c и C3d.

Результаты исследования показали, что принадлежность гранулоцитарных аутоантител к классам иммуноглобулинов у больных с нейтропенией отличались от таковой у больных с лейкопенией. Аутоантитела, выявленные у больных с нейтропенией чаще являлись смесью иммуноглобулинов IgG+IgM (27,1%) по сравнению с больными с симптомами лейкопении (20,1%). Количество больных с нейтропенией, аутоантитела которых являлись только иммуноглобулинами класса G, составило 60,5%, а у больных с лейкопенией- 76,5%. В десять раз больше выявлено аутоантител IgG+ C3d у больных с нейтропенией, по сравнению с больными с лейкопенией (табл.2).

Таблица 2. Результаты определения принадлежности аутоантител к классам иммуноглобулинов

Категория больных	Кол-во обследованных	Анти-тела не выявлены	Антитела выявлены								
			IgG	Ig M	IgG + IgM	IgG + C3d	Ig A	IgG + IgA	IgM + C3d	IgG + IgM + IgA + C3d	IgG + IgA + C3c + C3d
Нейтропения	90	9	49	1	22	5	1	1	1	1	-
	%		60,5	1,2	27,1	6,2	1,2	1,2	1,2	1,2	
Лейкопения	203	24	137	2	36	1	-	-	-	-	3
	%		76,5	1,1	20,1	0,6					1,7

Аллоантитела к антигенам гранулоцитов исследовали в сыворотках 339 больных с различным диагнозом: гемофилия, острый лейкоз, апластическая анемия, тромбоцитопения, лейкопения. Все больные имели в анамнезе множественные гемотрансфузии. Исследование проводили с пятью образцами гранулоцитов доноров. При выявлении положительной реакции хотя бы с одним образцом

гранулоцитов делали заключение о наличии антител в сыворотке. Мы сравнивали эффективность использования метода лейкоагглютинации и агглютинации в геле для выявления аллоантител к гранулоцитам. Из 339 обследованных сывороток больных, имеющих многократные гемотрансфузии, методом лейкоагглютинации аллоантитела были выявлены в 60 случаях (17,7%), в то время как методом агглютинации в геле антитела выявлены в 167 случаях (49,3%).

Проведенный нами анализ сывороток 103 беременных женщин на наличие IgG ауто- и аллоантител показал, что 4,7% обследованных имели антитела к гранулоцитам, которые вызвали иммунологический конфликт мать- плод: у всех детей, родившихся от сенсibilизированных матерей, выявлена нейтропения разной степени тяжести.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Araki N., Nose Y., Kohsaki M., Mito H., Ito K. Anti-Granulocyte Antibody Screening with Extracted Granulocyte Antigens by a Micro-Mixed Passive Hemagglutination Method.// *Vox Sang.*, 1999- 77, 44-51.
2. Bruin M., Dassen A., Pajkrt D., et.all. Primary autoimmune neutrophil antibodies and clinical course.// *Vox Sang* 2005-88, 52-59.
3. Evans R., Green F., Lucas G. A review of referrals for neonatal alloimmune neutropenia over a 4- year period (2002-2006).// *Vox Sang.* 2006- 91,Suppl.2,
4. Ivankovic Z., Gojceta K., Gobulic Cepulic B., et.al. Testing of granulocyte-associated antibodies, part I test features and differences using anti-IgG and anti-IgM reagents of two manufacturers. // *Vox Sang.*, 2006-91, Supl.2, 8.
5. Kameoka J., Funato .T, Miura T., Harigae H., Saito J., Yokoyama H., Takahashi S., Yamada M., Sasaki O., Imaizumi M., Takata N., Meguro K., Sasaki T. Autoimmune neutropenia in pregnant women causing neonatal neutropenia.// *British Journal of Haematology*, 2001- 114-1, 198.
6. Klein H., Anstee D. *Mollisons Blood Transfusion in Clinical Medicine.*//-11th ed. Blackwell Publishing 2005, 891p.
7. Lucas G. Granulocyte immunology workshops: Update and progress.// *Vox Sang.* 2006- 91- S2, 4-5.

8. Lucas G., Metcalfe P. Platelet and granulocyte glycoprotein polymorphism.  
// *Transfusion Medicine*, 2000- 10, 157-174.
9. Noonan K., Johnson T. Examining technical aspects of the monoclonal antibody immobilization of granulocyte antigen assay. // *Vox Sang*, 1997-73, 87-92.
10. Stroncek D. Granulocyte antigens and antibodies detection. // *Vox Sang.*, 2004- 87(Suppl.1), 91-94.