

ВЫЯВЛЕНИЕ АУТО- И АЛЛОАНТИТЕЛ К АНТИГЕНАМ ГРАНУЛОЦИТОВ МЕТОДОМ АГГЛЮТИНАЦИИ В ГЕЛЕ

Минеева Н.В., Елхина Е.В., Бодрова Н.Н., Заварзина О.А.

Лаборатория изосерологии ФГУРосНИИ Гематологии и трансфузиологии ФМБА России, Санкт-Петербург

Резюме. Антитела к антигенам гранулоцитов могут являться причиной таких клинических синдромов, как аутоиммунная нейтропения, неонатальная аллоиммунная нейтропения и синдром острой легочной недостаточности после трансфузии. Однако выявление и идентификация клинически значимых антигранулоцитарных антител является технически сложной задачей. Для этих целей мы адаптировали метод агглютинации в геле — ID Micro Typing System (DiaMed AG, Switzerland), обычно используемый для диагностики антиэритроцитарных антител. Метод показал воспроизводимость результатов обнаружения антигранулоцитарных антител и определения их принадлежности к различным классам иммуноглобулинов.

Ключевые слова: нейтропения, гранулоциты, антигены, антитела, иммуноглобулины.

Mineeva N.V., Elkhina E.V., Bodrova N.N., Zavarzina O.A.

DETECTION OF AUTO- AND ALLOANTIBODIES AGAINST GRANULOCYTES BY MEANS OF GEL AGGLUTINATION TECHNIQUE

Abstract. Granulocyte antigen-specific autoantibodies may be implicated into pathogenesis of auto- and alloimmune neutropenia, neonatal alloimmune neutropenia, and acute pulmonary insufficiency occurring post-transfusion. However, detection and identification of clinically significant granulocyte antibodies still represent a technically difficult task. To detect immunoglobulins and/or activated complement on granulocyte surface, we have adapted a Gel Test (ID Micro Typing System, DiaMed, Switzerland) which is commonly applied for diagnostics of RBC-specific antibodies. Our results suggest that the data from this gel test are quite reproducible, and the system may be used for detection of granulocyte-specific antibodies belonging to different immunoglobulin classes. (*Med. Immunol.*, 2011, vol. 13, N 2-3, pp 253-256)

Keywords: neutropenia, granulocytes, antigens, antibodies, immunoglobulins.

Введение

Термин «гранулоциты» включает в себя нейтрофилы, эозинофилы и базофилы. Поскольку большинство гранулоцитов представлено нейтрофилами, термин «гранулоциты» и «нейтрофилы» обычно используется параллельно.

Антигранулоцитарные антитела могут являться причиной таких клинических синдромов, как аутоиммунная и неонатальная аллоиммунная нейтропения. В литературе имеются также данные о роли антигранулоцитарных антител доноров и реципиентов в возникновении иммунологических конфликтов, приводящих к негемолитическим фебрильным трансфузионным реакциям, а также острой легочной недостаточности после трансфузии [2, 3, 5, 6, 10].

Адрес для переписки:

Минеева Наталья Витальевна
191024, Санкт-Петербург, ул. 2-ая Советская, 16.
Тел.: (812) 717-44-66.
Факс: (812) 717-25-50.
E-mail: RNIINT@mail.ru

Считают, что механизм разрушения гранулоцитов антителами аналогичен таковому, который имеет место при разрушении антителами эритроцитов [3]. Однако мало известно о роли антигранулоцитарных антител различной специфичности в этих процессах, т.к. используемые на практике методы исследования не всегда позволяют выявить антитела.

Скрининг антигранулоцитарных аллоантител до настоящего времени остается технически сложной задачей. Это обусловлено несколькими причинами. Во-первых, используемые в настоящее время методы обладают различной эффективностью при выявлении некоторых образцов клинически важных антител, например, к системам антигенов нейтрофилов HNA-1 и HNA-2. Во-вторых, для исследования должны быть использованы интактные нейтрофилы, которые имеют короткую продолжительность жизни и не могут храниться. Поэтому для скрининга антител необходимо ежедневно готовить свежие тест-гранулоциты.

Определенную трудность в стандартизацию методов выявления аллоантител к нейтрофилам вносит отсутствие референтных образцов с уста-

новленной специфичностью антигранулоцитарных аллоантител. Обычно такие образцы используются для постановки положительного контроля для подтверждения правильности исследования антител. Коммерческие специфические моноклональные антитела к антигенам гранулоцитов до настоящего времени не получены, что также тормозит разработку эффективных методов диагностики антител [7].

Отсутствие эффективных методов выявления антигенов гранулоцитов и антител к ним приводит к тому, что остаются неизученными особенности аллосенсибилизации к гранулоцитам, а также частота встречаемости антигранулоцитарных антител среди больных, имеющих многократные трансфузии. Мало данных об особенностях проявления аллоиммунных нейтропений у новорожденных, матери которых имеют антигранулоцитарные антитела [3, 11].

Для выявления антигранулоцитарных антител используются несколько методов [1, 4, 6, 8, 11].

Метод лейкоагглютинации, проводимый в пробирках и микроячейках, предполагает использование свежезаготовленных гранулоцитов доноров. Иммунофлуоресцентные тесты, оцениваемые посредством флуоресцентной микроскопии или цитометрии, а также метод иммобилизации гранулоцитарных антигенов моноклональными антителами (МАIGA), предполагают наличие моноклональных антител, специфичных к каждому из множества гранулоцитарных гликопротеинов. При этом каждый метод обладает разной чувствительностью в отношении антител к антигенам гранулоцитов разных классов иммуноглобулинов, что может приводить к ложноотрицательным результатам при скрининге антител. Кроме того, представленные методы являются дорогостоящими для использования их в рутинной практике. Все это затрудняет сопоставление результатов исследования антигранулоцитарных антител, полученных в разных лабораториях.

Целью нашего исследования явилось усовершенствование метода выявления антигранулоцитарных ауто- и аллоантител путем использования способа агглютинации в геле.

Материалы и методы

Материалом исследования служила кровь 339 больных, имеющих в анамнезе многократные трансфузии компонентов крови, а также лиц с клиническими проявлениями нейтропении и лейкопении.

Исследование аутоантител проводили у 293 больных с симптомами лейкопении и нейтропении. К группе больных с симптомами лейкопении относили лиц с общим количеством лейкоцитов ниже $1,8 \times 10^9/\text{л}$, к группе с симптомами нейтропении — лиц со сниженным количеством нейтрофилов при нормальном количестве лейкоцитов.

Исследование антигранулоцитарных аллоантител проводили в сыворотках 339 больных с различным диагнозом: гемофилия, острый лейкоз, апластическая анемия, тромбоцитопения, лейкопения. Все больные имели в анамнезе множественные гемотрансфузии.

Выявление антигранулоцитарных ауто- и аллоантител осуществляли методом лейкоагглютинации в стандартной постановке и с использованием микрометода агглютинации в геле с применением ID-карт, содержащих анти-IgG реактив фирмы DiaMed AG (Швейцария) [6]. Принадлежность аутоантител к классам иммуноглобулинов, а также наличие компонентов комплемента на гранулоцитах определяли в ID-картах "DC-Screening II", содержащих анти-IgG, -IgA, -IgM, -C3c, -C3d реактивы.

Гранулоциты больных и доноров выделяли из крови, стабилизированной 5% EDTA калия. Лизис эритроцитов проводили 0,83% раствором хлорида аммония.

При выявлении антигранулоцитарных аутоантител для метода агглютинации в геле гранулоциты больных вносили в ID-карту и центрифугировали. Для визуализации агглютинации гранулоцитов антителами в каждую микропробирку добавляли эритроциты и снова центрифугировали. При положительной реакции агглютинированные клетки задерживали эритроциты и на поверхности или в толще геля образовывали красный слой. При отрицательной реакции эритроциты оседали на дне микропробирки вместе с гранулоцитами.

Отрицательная реакция в контрольной микропробирке свидетельствовала о правильности проведения теста и отсутствии неспецифической реакции.

Положительная реакция в пробирках с анти-IgG, анти-IgM, анти-C3c, анти-C3d, анти-IgA реактивами свидетельствовала о присутствии аутоантител соответствующей специфичности и (или) компонентов комплемента (рис. 1).

Выявление антигранулоцитарных аллоантител в сыворотках больных осуществляли со свежезаготовленными гранулоцитами произвольно отобранных доноров. Сыворотку больных и гранулоциты доноров вносили в ID-карту, инкубировали в течение 10 мин при 37 °С и центрифугировали. Для визуализации агглютинации гранулоцитов антителами в каждую микропробирку добавляли эритроциты и снова центрифугировали. Результаты оценивали так же как при определении антигранулоцитарных аутоантител.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием критерия χ^2 . Величину вероятности P находили в обратной зависимости от величины показателя χ^2 (чем больше величина χ^2 , тем меньше значение P и тем больше степень уверенности, что наблюдаемые различия закономерны).

Результаты и обсуждение

Аутоантитела были выявлены у 179 из 203 (88,18%) больных с лейкопенией. У больных с нейтропенией антитела выявлены в 81 (90%) случае из 90 исследованных. В качестве группы контроля исследовались 53 донора. Аутоантитела были выявлены у 4 (7,5%) из них (табл. 1).

Исследование принадлежности выявленных аутоантител к классам иммуноглобулинов в ID картах для прямого антиглобулинового теста, содержащих анти-IgG, -IgA, -IgM, -C3c и C3d реактивы приведено в таблице 2.

Результаты исследования показали, что принадлежность антигранулоцитарных аутоантител к классам иммуноглобулинов у больных с нейтропенией отличалась от таковой у больных с лейкопенией. Аутоантитела, выявленные у больных с нейтропенией, чаще являлись смесью иммуноглобулинов IgG + IgM (27,1%) по сравнению с антителами у больных с симптомами лейкопении (20,1%) ($P < 0,001$). Аутоантитела представленные только иммуноглобулинами класса G, выявлены в 60,5% у больных с нейтропенией, а у больных с лейкопенией — 76,5% ($P < 0,001$). В десять раз чаще у больных с нейтропенией выявлялись аутоантитела IgG в комбинации с компонентом комплемента C3d, по сравнению с больными с лейкопенией (6,2% и 0,6% соответственно) ($P < 0,001$).

Аллоантитела в сыворотках больных гематологическими заболеваниями исследовали 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 антигранулоцитарных аллоантител. В 167 из 339 тестированных сывороток больных были выявлены аллоантитела методом агглютинации в геле (49,3%), в то время как методом лейкоагглютинации в 63 образцах (18,6%).

Анализ результатов выявления антител в сыворотках указанными методами показал, что имелись случаи, когда антитела в образце сыворотки выявлялись обоими методами или выявлялись только одним методом (табл.3).

Количество образцов, показавших положительный результат только методом агглютинации в геле, составило 120 (65,6%). Количество

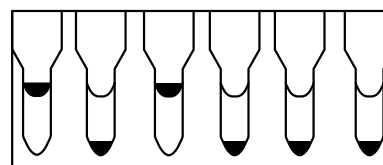
	IgG	IgA	IgM	C3c	C3d	Ctl
4+	—	4+	—	—	—	—

Рисунок 1. Исследование антигранулоцитарных антител в ID-карте "DC-Screening II"

Примечание. 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 антигранулоцитарных антител к классам IgG и IgM. Отрицательные результаты в пробирках, анти-IgA и C3c и C3d реактивы, свидетельствуют об отсутствии антигранулоцитарных антител класса IgA и адсорбции на клетках компонентов комплемента.

сывороток, в которых аллоантитела выявлены только в методе лейкоагглютинации, составило 16 (8,7%). Антитела, активные в обоих методах исследования, содержались в 47 сыворотках (25,7%). Таким образом, оба метода значительно различаются по способности выявлять антигранулоцитарные аллоантитела в сыворотках.

Высокий процент выявленных антигранулоцитарных антител при использовании метода агглютинации в геле, вероятно, обусловлен присутствием в исследуемых сыворотках HLA антител, а также возможностью выявления в методе агглютинации в геле антител, принадлежащих к разным классам иммуноглобулинов. Метод лейкоагглютинации выявляет только IgM антитела и не выявляет IgG антител (в том числе и антиHLA антител), которые не обладают способностью вступать в прямую реакцию агглютинации.

Присутствие HLA антигенов на тест-гранулоцитах может затруднить определение специфичности антител в сыворотках [1]. Для уточнения специфичности антител к антигенам гранулоцитов целесообразно в дальнейшем проводить генотипирование гранулоцитов доноров, что позволит охарактеризовать антигены и получить антигранулоцитарные сыворотки, которые в дальнейшем можно использовать в качестве контроля при оценке чувствительности методов исследования.

ТАБЛИЦА 1. РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АУТОАНТИТЕЛ К ГРАНУЛОЦИТАМ У БОЛЬНЫХ С НЕЙТРОПЕНИЕЙ И ЛЕЙКОПЕНИЕЙ

Обследованные лица	Количество обследованных	Аутоантитела к гранулоцитам	
		Выявлены	Не выявлены
Больные с симптомами лейкопении	203	179 (88,2%)	24 (11,8%)
Больные с симптомами нейтропении	90	81(90%)	9 (10%)
Доноры	53	4 (7,5%)	49 (92,5%)

ТАБЛИЦА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АУТОАНТИТЕЛ У БОЛЬНЫХ С НЕЙТРОПЕНИЕЙ И ЛЕЙКОПЕНИЕЙ И ИХ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ К КЛАССАМ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

Категория больных	Количество обследованных	Антитела не выявлены	Антитела выявлены								
			IgG	IgM	IgG + IgM	IgG + C3d	IgA	IgG + IgA	IgM + C3d	IgG + IgM + IgA + C3d	IgG + IgA + C3c + C3d
Нейтропения	90	9	49	1	22	5	1	1	1	1	-
	%	10	60,5	1,2	27,1	6,2	1,2	1,2	1,2	1,2	
Лейкопения	203	24	137	2	36	1	-	-	-	-	3
	%	11,82	76,5	1,1	20,1	0,6					1,7

ТАБЛИЦА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СРАВНЕНИЯ ВЫЯВЛЯЕМОСТИ АЛЛОАНТИТЕЛ В ОБРАЗЦАХ СЫВОРОТОК, ПОКАЗАВШИХ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ РЕЗУЛЬТАТ ПРИ ТЕСТИРОВАНИИ МЕТОДАМИ ЛЕЙКОАГГЛЮТИНАЦИИ И АГГЛЮТИНАЦИИ В ГЕЛЕ

Количество сывороток, показавших положительный результат при тестировании			
Всего	Методом лейкоагглютинации и агглютинации в геле	Только методом агглютинации в геле	Только методом лейкоагглютинации
183	47 (25,7%)	120 (65,6%)	16 (8,7%)

Вероятно, антигранулоцитарные антитела, так же как и антитела к антигенам эритроцитов, представляют собой гетерогенную группу – смесь разных классов иммуноглобулинов, поэтому для их выявления требуются различные типы реактивов и методы исследования.

Проведенные нами исследования показали, что метод агглютинации в геле эффективен при исследовании принадлежности аутоантител к классам иммуноглобулинов и их способности адсорбировать на себя компоненты комплемента.

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. – Vol. 77. – P. 44-51.
2. Bruin M., Dassen A., Pajkrt D., Buddelmeyer L., Kuijpers T., de Haas M.. Primary autoimmune neutrophil antibodies and clinical course // Vox Sang. – 2005. – Vol. 88. – P. 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. – Vol. 91, Suppl. 2, 5.
4. Ivankovic Z., Gojceta K., Golubic Cepulic B., Bojanic I., Lukic M., Mazic S., Orlic D. Testing of granulocyte-associated antibodies, part I test features and differences using anti-IgG and anti-IgM

reagents of two manufacturers // Vox Sang. – 2006. – Vol. 91, Suppl. 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. – Vol. 114-1. – P. 198.

6. Klein H., Anstee D. Mollisons Blood Transfusion in Clinical Medicine // 11th ed. – Blackwell Publishing, 2005. – 891 p.

7. Lucas G. Granulocyte immunology workshops: Update and progress // Vox Sang. – 2006 – Vol. 91, Suppl. 2. – P. 4-5.

8. Lucas G., Metcalfe P. Platelet and granulocyte glycoprotein polymorphism // Transfusion Medicine. – 2000. – Vol. 10. – P. 157-174.

9. Noonan K., Johnson T. Examining technical aspects of the monoclonal antibody immobilization of granulocyte antigen assay // Vox Sang. – 1997. – Vol. 73. – P. 87-92.

10. Riedler G., Dakin H. Serious Hazards of transfusion underestimates the incidence of transfusion-related acute lung injury in the UK // Vox Sang. – 2004. – Vol. 86. – P. 268.

11. Stroneck D. Granulocyte antigens and antibodies detection // Vox Sang. – 2004. – Vol. 87, Suppl. 1. – P. 91-94.

поступила в редакцию 04.10.2010
принята к печати 17.11.2010