



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **41604** (13) **U**
(51) МПК (2009)
G01N 33/48

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ IN VITRO АНТИГЕННОЇ СУМІСНОСТІ ОРГАНІЗМУ ЛЮДИНИ ЗА ОЗНАКОЮ ІЗОІМУНІЗАЦІЇ АНТИГЕНАМИ ЕРИТРОЦИТІВ

1

2

(21) u200900714

(22) 30.01.2009

(24) 25.05.2009

(46) 25.05.2009, Бюл. № 10, 2009 р.

(72) ДИЗИК ГАЛИНА МИХАЙЛІВНА, UA, ПАВЛЮК
РАЇСА ПАНТЕЛЕЙМОНІВНА, UA, МИРОНЕНКО
ГАЛИНА АНАТОЛІЙВНА, UA

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ГЕМА-
ТОЛОГІЇ ТА ТРАНСФУЗІОЛОГІЇ АМН УКРАЇНИ",
UA

(57) Спосіб діагностики in vitro антигенної сумісності організму людини за ознакою ізоімунізації антигенами еритроцитів шляхом з'єднання досліджуваної сироватки крові з донорськими еритроцитами і комплементом, який **відрізняється** тим, що діагностику проводять в реакції аглютинації в мікропробірках, заповнених гелем з додаванням поліспецифічної антиглобулінової сироватки.

Спосіб відноситься до галузі медицини, зокрема, до досліджень в гематології, трансфузіології, акушерстві і гінекології, а також трансплантології, тобто, до ситуацій, коли необхідно характеризувати сумісність донора і реципієнта за ознакою ізоімунізації еритроцитарними антигенами.

Під ізоімунізацією розуміємо сукупність системних реакцій організму, що виникають в результаті специфічної взаємодії клітин його імунної системи з антигеном груп крові, відсутнім у даної особи, і продукції специфічних імунних антитіл. Встановлено, що при наявності імунних антитіл всі або майже всі несумісні еритроцити піддаються гемолізу протягом 3 хвилин [1]. Гемоліз відбувається в результаті руйнування мембрани еритроцита комплексом антиген-антитіло [2].

Діагностика антигенної сумісності організму людини за ознакою ізоімунізації антигенами еритроцитів проводиться in vitro за допомогою реакції лізису та/або аглютинації [3].

Лізис еритроцитів використовується в якості показника споживання комплексу в реакції зв'язування комплексу (РЗК).

Суть реакції полягає в тому, що антитіла, які викликають лізис клітин-носіїв відповідного антигену. Реалізують свою дію (гемоліз) лише в присутності комплексу. Тобто вираженість гемолізу свідчить про присутність комплексу, який в свою чергу маніфестує наявність специфічних антитіл.

Таким чином, в будь-яких модифікаціях реакції гемолізу, метою яких є пошук специфічних антитіл або специфічного антигену, необхідно мати комплекс, як індикатор того, що сполучення антигену з антитілом відбулося і наступив гемоліз.

Недоліками реакції зв'язування комплексу є необхідність мати:

1. Реагенти для зв'язування еритроцитів з антигеном, проти якого визначають наявність специфічних антитіл, а саме - глютаральдегід, формальдегід, танин;

2. Гемолітичну систему (гемолізуючі антитіла, еритроцити барана або кроля, навантажені імунними антитілами);

3. Комплемент;

4. Реакція вимагає термостатування при +37°C на протязі 2 годин;

5. Навантаження еритроцитів потребує часу (1-2) години.

Найближчим аналогом запропонованої корисної моделі є спосіб діагностики антигенної сумісності організму людини за ознакою ізоімунізації антигенами еритроцитів в реакції лізису [4], яка базується на поєднанні in vitro сироватки крові досліджуваної особи із зависсю клітин крові донора, наприклад, тест еритроцитів групи A(II) та/або B(III) системи ABO. Якщо в сироватці наявні анти-A та/або анти-B антитіла, то в присутності комплексу настає гемоліз. Концентрація виявлених антитіл визначається шляхом подвійного розведення досліджуваної сироватки і виражається двоїчним логарифмом.

(13) **U**
(11) **41604**
(19) **UA**

Недоліками даного діагностичного тесту слід вважати:

1. Комплементзалежність реакції, через що необхідно в лабораторії мати комплемент.

2. В реакцію гемолізу вступають ізоантитіла, що відносяться як до ізотипу IgM (природні) так і до IgG (імунні). Внаслідок цього реакція визначає пул антитіл, що знижує інформацію про наявність саме імунних антитіл.

3. Реакцію гемолізу з метою діагностики антигенної сумісності організму людини за ознакою ізоімунізації антигенами еритроцитів необхідно проводити невідкладно, запобігаючи руйнуванню власного комплементу сироватки крові. У протилежному разі до сироватки необхідно додавати комплемент (див. п. 1).

4. Для визначення концентрації гемолізину необхідно у досліджуваної особи отримати не менш як 2 мл сироватки крові.

5. Визначення гемолізину потребує 4-5 годин робочого часу на виконання послідовно всіх етапів дослідження.

Таким чином, названі фактори утруднюють точне визначення антигенної сумісності організму людини за ознакою ізоімунізації антигенами еритроцитів.

Завданням способу, що пропонується, є підвищення точності візуальної оцінки *in vitro* антигенної сумісності організму людини за ознакою ізоімунізації антигенами еритроцитів, скорочення часу дослідження, зменшення необхідного для дослідження об'єму сироватки.

Реакція аглютинації проводиться на площині, в пробірках або в мікропробірках, заповнених гелем з антиглобуліновим реагентом. Перша фаза реакції, яка полягає в поєднанні ізоімуних антитіл сироватки крові з відповідним антигеном на еритроцитах, наступна фаза - аглютинація еритроцитів під дією антиглобулінового реагента, заключна фаза - просіювання аглютинованих еритроцитів через гель - візуалізація результату.

Спосіб, що пропонується, реалізується наступним чином:

Реакція проводиться на картках, які являють собою пластикову пластинку, в яку запаані 6 мікропробірок, заповнених гелем і з додаванням поліспецифічної антиглобулінової сироватки, і використовується для виявлення неповних імунних аглютининів у непрямому антиглобуліновому тесті.

Досліджувану сироватку в кількості 0,5 - 1 мл розводять у чотири рази 0,9 % розчином натрію хлориду, щоб уникнути коагуляції під час нагрівання, потім розливають порівну в дві пробірки, одну з них прогривають протягом 10хв. при температурі +70°C, точно дотримуючись температури і часу. Далі готують розведення прогрітої сироватки 0,9% розчином натрію хлориду від 1:4 до 1:128.

Для дослідження беруть дві картки, маркують їх, позначивши під кожною мікропробіркою розведення сироватки. Вносять в мікропробірки однієї картки по 50мкл зависі еритроцитів ID-DiaCell A₁, а в мікропробірки другої картки - ID-DiaCell B. В кожен з них додають по 25мкл досліджуваної прогрітої розведеної сироватки, відповідно маркуванню.

Інкубують картки на протязі 15 хвилин при температурі 37°C, потім центрифугують в ID-центрифузі 10хв. і оцінюють результат дослідження.

Позитивний результат свідчить про наявність анти-A і/або анти-B аглютининів, а останнє розведення сироватки, в якому спостерігається аглютинація - про їх титр. Якщо аглютинація спостерігається у всіх пробірках, дослідження треба повторити з більшим розведенням сироватки. Негативний результат у всіх пробірках свідчить про відсутність неповних імунних антитіл.

Приклад використання способу.

Вагітна П-о, 25 років, група крові O_{αβ} (I), RhCD)⁺ вагітність перша, термін вагітності 32 тижні. Біологічний батько дитини має групу крові A_β(II), Rh(D)⁺.

Вагітна проходила обстеження на наявність гемолізину у лабораторії жіночої консультації в термін гестації 8, 16 та 20 тижнів, гемолізину не були виявлені.

Звернулась для обстеження в лабораторію ДУ "ІГТ АМНУ" за направленням пологового будинку, оскільки там виникла підозра імунного конфлікту за даними УЗ дослідження.

Відомо, що при групі крові O_{αβ} (I) у жінки та при групі крові A_ρ(II) у чоловіка, дитина може успадкувати батьківський фенотип і імунізувати матір фетальними еритроцитами A_ρ(II), чим викликати несумісність з наступним розвитком гемолітичної хвороби новонароджених.

Зважаючи на те, що на попередніх етапах гестації гемолізину не були виявлені, а титр природних антитіл, визначений в нашій лабораторії, при зверненні в 32 тижні вагітності, дорівнював: анти-A - 1:512, анти-B - 1:64, в той час як у донорів спостерігаються титри 1:8 - 1:16 [3] і, знаючи недоліки і недостатню інформативність тесту на гемолізину, нами проведено реакцію на наявність імунних аглютининів у гелевому тесті.

Виявлено: імунні аглютинини анти-A в титрі 1:128.

Виконання методики потребувало 50хв.

Отримані дані свідчили про наявність ізоімунізації та про загрозу можливого розвитку у дитини гемолітичної хвороби новонароджених. Дані передано до пологового будинку для вирішення питання подальшого ведення вагітності.

Таким чином, перевагами запропонованого способу діагностики *in vitro* антигенної сумісності організму людини за ознакою ізоімунізації антигенами еритроцитів є:

1. Реакція не потребує додавання комплементу, що скорочує час і спрощує процедуру виконання.

2. Використання в реакції антиглобулінового реагенту (проти IgG) гарантує виявлення саме імунних ізоантитіл, які є патогенетичними факторами патології, пов'язаної з ізоімунізацією.

3. Реакцію можна виконувати як терміново, та і у відстроченому порядку.

4. Виконання всіх етапів дослідження потребує 1,5-2 години, тобто в 2 рази менше, ніж виконання реакції гемолізу.

5. Виконання реакції можливе у об'ємах досліджуваної сироватки в 4 рази менших у порівнянні з об'ємами сироватки, які потребує реакція гемолізу.

Список використаної літератури.

1. Клиническая трансфузиология/ под ред. В.Рудковского и С.Павловского, 1974.- Варшава.- Польское медицин, изд-во. с.172-173.

2. Е.Б. Жибурт Трансфузиология: Учебник - СПб: Питер, 2002. - 736с. (С.232).

3. У. Бойд Основы иммунологии. М.: «Мир», 1969.- 647с. (с.274 - 363).

4. Г.М. Дизик, Р.П. Павлюк, Л.Н. Лавровська та інш. Титр ізогемаглютининів як орієнтовний показник імунореактивності організму донорів// Укр. журнал гематол. та трансфузіол., 2005. - №4 (додатковий), 5. Гематологія і трансфузіологія: фундаментальні та прикладні питання /Матеріали наук.-практ.конф., Київ, 2005. - С. III -112.