

LAŠTELIŲ MEMBRANOS IMUNOFLUORESCENCIJOS METODO TAIKYMAS DIAGNOZUOJANT ŠUNŲ AUTOHEMOLITINĘ ANEMIJĄ (AIHA) IR PALYGINIMAS SU COOMB'S AGLIUTINACIJOS METODU

Gintarė Kučinskienė¹, Juozas Pieškus²

¹Lietuvos veterinarijos akademijos Imunologijos laboratorija, Tilžės g. 18, LT – 3022 Kaunas; tel.(8~37) 36 28 44; el. paštas: gkucinskiene@yahoo.co.uk

²Imunologijos institutas, Molėtų pl. 29, LT – 2021 Vilnius; tel.(8~5) 246 9249; el. paštas: jpieskus@imi.lt

Santrauka. Autoimuninės ligos, apimančios 5–7% žmonių populiacijos, užima trečią vietą pagal mirtingumą po širdies ir kraujagyslių bei vėžinių ligų. Diagnozuojant vieną dažniausiai pasitaikančių autoimuninių ligų – autoimuninę hemolitinę anemiją (AIHA) – ir medicinos, ir veterinarijos laboratorijose iki šiol taikomas Coomb's agliutinacijos metodas. Tačiau šis diagnostikos metodas nėra pakankamai jautrus, todėl vis dažniau susilaukia skeptiško mokslininkų vertinimo.

Mūsų darbo tikslas buvo paruošti laštelių membranos imunofluorescencijos (MIF) metodą šunų AIHA diagnostiniams tyrimams ir palyginti jį su Coomb's agliutinacijos metodu.

Ištyrus 26 šunis, kuriems buvo įtarta AIHA (kontrolei panaudota 13 kliniškai sveikų šunų), paaiškėjo, kad laštelių MIF metodas beveik du kartus jautresnis nei Coomb's agliutinacijos metodas. Daugiausia tirtų šunų ant eritrocitų paviršiaus turėjo IgG ir IgM autologinius antikūnus. Taikant MIF metodą su ožkos antiserumu prieš šuns IgG HL grandines, teigiamai reagavo 53% tiriamosios grupės (n=26) šunų, o Coomb's agliutinacijos – 26%. Ženklus minėtų metodų jautrumo skirtumas pastebėtas ir naudojant ožkos antiserumą prieš šuns IgM – MIF metodu teigiamai reagavo 50% tiriamų šunų, o Coomb's – tik 3,84%. Be to, MIF ir Coomb's agliutinacijos teigiami rezultatai, naudojant minėtus ožkos antiserumus, buvo dažnesni tiriant pateleis.

Raktažodžiai: autoimuninė hemolitinė anemija (AIHA), Coomb's agliutinacijos metodas, laštelių membranos imunofluorescencijos metodas (MIF).

APPLICATION OF CELLS MEMBRANE IMMUNOFLUORESCENCE (MIF) METHOD FOR AUTOIMMUNE HAEMOLYTIC ANEMIA (AIHA) DIAGNOSTIC IN DOGS AND COMPARISON OF MIF WITH COOMB'S AGGLUTINATION TEST

Summary. Autoimmune diseases are relatively frequent complex of diseases, which occur when the body's immune system attacks internal organs, affecting approximately 5–7% of human population. After cardio-vascular diseases and cancer they are third in mortality. The diagnosis of AIHA provides few difficulties since the introduction of the popular Coomb's test: at the last years clerisies find the disadvantage of low sensitivity routinely used Coomb's test.

The objective of the present work was to appropriate cells membrane immunofluorescence (MIF) test in AIHA diagnostic and to compare it with Coomb's agglutination.

Twenty six anemic dogs were investigated (experimental group) and 13 clinically healthy dogs were used as a control. Our results demonstrated that cell's flocytometric analysis is precise, reliable and two times more sensitive method for detecting of RBC-bound autoantibodies compared to Coomb's agglutination test. The results have shown that IgG and IgM were the most frequent autoantibodies in anemic dogs: 53% of tested dogs (n=26) were positive to goat antiserum according to dog IgG HL chain in MIF test, whereas using Coomb's agglutination with the same antiserum positive were only 26% of tested dogs. Similar difference between two tests (MIF and Coomb's) was shown with goat antidog antibodies to IgM, when 50% and 3.8% of dogs, respectively, were positive. Interestingly the percentage of females positive to MIF and Coomb's tests was higher compared to males.

Keywords: Autoimmune hemolytic anaemia (AIHA), Coomb's agglutination, cells membrane immunofluorescence (MIF).

Įvadas. Autoimuninė hemolizinė anemija (AIHA) priskiriama II tipo (antikūnų citotoksiškumo) autoimuninių ligų kategorijai: šuns antikūnai *in vivo* autologinius eritrocitus atpažįsta kaip antigenus (Day, 1999; Pedersen, 1999; Tizard, 2000). Pagal prigimtį AIHA gali būti pirminė ir antrinė. Pirminės AIHA priežastys iki šiol nėra aiškios, tačiau manoma, kad jas gali lemti genetinės ar imuninės sistemos sutrikimai: nespecifinis B limfocitų aktyvavimas (Alcorta et al., 1993), ant eritrocitų (E) esantys kraujo grupių antigenai (Garratty, 1991) ar pakitę sialo rūšties dariniai ant E membranos (Jones et al., 1990).

Antrinės anemijos priežastys dažniau siejamos su infekcinėmis, vėžinėmis ligomis, antibiotikų terapija.

Pastebėta, kad beveik du trečdaliai žmonių ir kačių AIHA yra antrinės kilmės. Šunims dažniausiai diagnozuojama pirminė AIHA (Tizard, 2000).

Moksliniais tyrimais įrodyta, kad šunų organizme autologiniai antikūniai (AAK) dažniausiai gaminasi prieš šiuos E membranos antigenus: 29-42 kDa glikoforinų peptidus, 37-100 kDa nežinomus peptidus ir citoskeleto fosfolipidus bei kitus proteinus (Dodds, 1977; Barker et al., 1991, 1992; Tsuchida et al., 1991; Pedersen, 1999; Tizard, 2000). Ant AIHA sergančių pacientų E paviršiaus aptinkama nuo 650 iki 1000 AAK molekulių (natūraliai, nesergant AIHA – tik 38–50). Yra duomenų, jog silpnai

teigiama agliutinacijos reakcija gali vykti tada, kai ant E esti tik 100–120 IgG molekulių (Gutowsky et al., 1991).

Priklausomai AIHA priežasties, AAK aplipę E iš cirkuliuojančio kraujo šalinami dviem būdais: vykstant intravaskulinei (kai į ligos patogenezę įtraukta komelemento sistema) arba ekstravaskulinei hemolizei (kai eritrocitus naikina blužnyje ir kepenyse esančios makrofagų sistemos ląstelės) (Dodds, 1977; Pedersen, 1999; Tizard, 2000).

Daugelyje literatūros šaltinių teigiama, kad anemija du kartus dažniau serga patelės nei patinai (Pedersen, 1999; Tizard, 2000). Manoma, kad susirgimą lemia patelių organizme padidėjęs estrogenų kiekis (Tizard, 2000).

Pagal klinikinius simptomus nustatyti, ar anemija yra pirminės kilmės, neįmanoma, nes daugeliu atveju sergantiems šunims pasireiškia įprasti anemijos simptomai: silpnumas, mieguistumas, pasikartojantis karščiavimas, tachikardija, anoreksija, vėmimas ar viduriavimas. Anemiškų šunų gleivinės esti blyškios, blužnis – padidėjusi. Šunų AIHA tiriama, kai šunų hematokritas sumažėja iki 10% ar mažiau, nustatoma anizocitozė, retikulocitozė, sferocitozė bei neutrofilija (Bush, 1991). Išsiaiškinta, kad liga dažniau linkę sirgti vokiečių aviganiai, airių seterai, škotų terjerai, amerikiečių kokerspanieliai. Vidutinis AIHA sergančiųjų amžius – 4–5 metai (Tizard, 2000).

Iki šiol ir medicinos, ir veterinarijos diagnostikos laboratorijose rutininei AIHA diagnostikai taikomas Coomb's agliutinacijos metodas, kurio esmė – E agliutinacija antikūnais prieš IgG, IgM ir C3. Neretai pasitaiko atveju, kai paciento ligos klinikiniai požymiai, morfologinis kraujo vaizdas bei anamnezė labai panašūs į AIHA, o Coomb's agliutinacijos tyrimas – neigiamas.

Pastaruoju metu literatūroje pasirodė pavienių pranešimų, kad žmonių AIHA pradėta tirti ląstelių tėkmės citometru. Prietaisas vertina E fluorescencijos intensyvumą po inkubacijos su specifiniais antikūnais, žymėtais švytinčiais dažais.

Darbo tikslas – paruošti šunų AIHA nustatymo sąlygas E membranos imunofluorescencijos (MIF) metodu ir jį palyginti su klasikiniu Coomb's agliutinacijos metodu.

Medžiagos ir metodai. Tiriama šunys ir kraujo mėginiai. Tyrėme 39 įvairaus amžiaus (1–14 metų) šunis. Kontrolinių šunų grupę sudarė 13 kliniškai sveikų 2–8 metų šunų: 9 kalės ir 4 patinai. Įtariamų dėl AIHA šunų grupę sudarė 26 pacientai: 18 (1–14 metų) patinų ir 8 kalės (1–6 metų). Tyrimams naudotas 2–5 ml šviežias, EDTA stabilizuotas kraujas.

Antikūnai. Siekiant ant E nustatyti autologinius IgG, IgM, IgA klasių antikūnus ir C3, naudoti keturi afiniškai išgryninti ožkos antiserumai (pirminiai antikūnai): a-IgG (Ak prieš šuns IgG lengvasias ir sunkiasias grandines), a-IgM (Ak prieš šuns IgM miu grandinę), a-IgA (Ak prieš šuns IgA alfa grandinę) ir a-C3 (Ak prieš šuns C3 komponentą; Bethyl laboratories, INC, Jungtinė Karalystė). Visi naudoti a-Ig tirti praskiesti su PBS taip: 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320. Tyrimams su tėkmės citometru E inkubuoti su afiniškai išgrynintais (antriniais antikūnais) asilo Ak prieš ožkos IgG lengvasias ir sunkiasias grandines, žymėtais fluoresceinu (FITC, Dianova, Hamburg, Vokietija), 1:100 skiestais su PBS.

Tyrimų metodai. Coomb's agliutinacijos metodas. Šis metodas buvo taikytas pagal Chaplin Hugh aprašytą metodiką (1985). Išsiaiškinti optimaliai E agliutinacijos temperatūrai, kiekvieno šuns kraujas vieną valandą inkubuotas 4°C (šaldytuve) ir 37°C (termostate) temperatūroje. Du kartus E plauti inkubacijos temperatūrą atitinkančiu PBS (centrifuguoti 200 g 5 min., viršuje susikaupęs supernatantas pašalintas). Išplauti E praskiesti 1:40 terpe RPMI1640 (su 2% inaktyvuotu FCS). Nustatyti a-Ig skiedimą (1:20–1:320), kuriame E agliutinuojama, į dvi U formos duobelėmis plokšteles naudota 20 µl paruoštos E suspensijos ir 20 µl paruoštų a-Ig. Plokštelės kratytos 1 min. (300 aps./min.). Agliutinacija vertinta po 30 min., E su a-Ig inkubavus skirtingoje temperatūroje (4°C ir 37°C).

Ląstelių membranos imunofluorescencijos metodas (MIF). Kraujas du kartus plautas su PBS (centrifuguotas 200 g 5 min.). E praskiesti 1:40 su RPMI1640 (2% inaktyvuotu FCS). 20 µl E suspensijos 30 min. inkubuoti ant ledų šaldytuve (4°C) su 20 µl pirminių a-Ig. Inkubavus E du kartus plauti šaltu (4°C) 100 µl PBS-BN (PBS, 0,5% BSA, 0,02% Na₃N): plokštelė centrifuguota (200 g 5 min., 4°C), pašalintas supernatantas. E inkubuoti su 20 µl antrinių antikūnų, žymėtų su FITC. Inkubavus E vėl du kartus plauti su PBS-BN. E lašas (50 µl) suspenduotas 200 µl steriliai filtruotame PBS. Bandiniai tirti ląstelių tėkmės citometru (FacScan®, Becton Dickinson, Heidelberg, Vokietija). Ląstelių fluorescencijai įvertinti skaičiuota 10 tūkst. E.

Tyrimų rezultatai. Kaip matyti iš pateiktų rezultatų (1 lentelė), didžiausias kontrolinės grupės šunų E membranos fluorescencijos intensyvumas (MFI) buvo nustatytas naudojant a-IgG (HL grandines), o naudojant a-IgM (miu grandinę), a-IgA (alfa grandinę) ir a-C3 MFI buvo mažesni. Kuo antiserumas praskiestas labiau, tuo imunofluorescencija silpnesnė.

Teigiamai reagavusių patinų eritrocitų MFI (1 lentelė), naudojant a-IgG, buvo didžiausias ir kelis kartus viršijo kontrolinės grupės šunų MFI (antiserumas skiestas 1:20–1:80, p<0,01; 1:160 – p<0,005; 1:320 – p<0,001) (1 pav.). Teigiamai reagavusių į a-IgM patinų MFI taip pat buvo didesnis nei kontrolinės grupės šunų (p<0,001). Tyrimams naudojant a-IgA, teigiamai reagavo tik vienas patinas (1:20–1:160).

Su a-C3 padidėjęs MFI buvo nustatytas tik esant praskiestam antiserumui 1:20 ir 1:40 (atitinkamai p<0,01 ir 0,005).

Tirdami teigiamai reagavusių patelių eritrocitų MFI (1 lentelė) su a-IgG nustatėme, kad jis buvo gerokai padidėjęs palyginti su kontrolinės grupės šunų (antiserumas skiestas 1:20 – p<0,025; 1:40 – p<0,005; 1:80 – p<0,01; 1:160 – p<0,001; 1:320 – p<0,005). Naudojant a-IgM – taip pat didesnis (antiserumas skiestas 1:20 – p<0,005; 1:40 – p<0,001; 1:80 – p<0,005; 1:160 – p<0,001 ir 1:320 – p<0,005). Teigiamai reagavusių patelių E į a-IgA nebuvo, o naudojant a-C3, tik vienos patelės E rodė šiek tiek padidėjusį MFI.

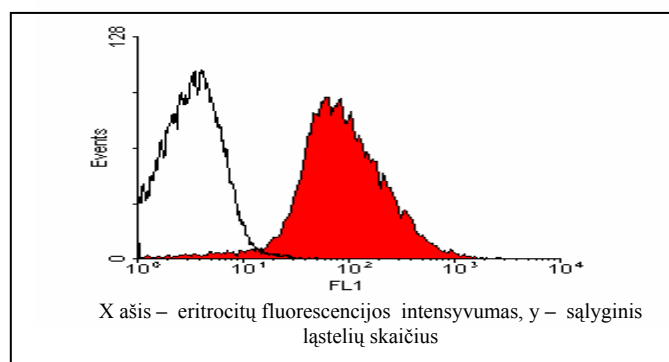
Nors buvo pastebėtas MFI skirtumas tarp teigiamai MIF reaguojančių patinų ir patelių E (1 lentelė), rezultatų skirtumo patikimumas naudojant a-IgG nustatytas, kai antiserumas praskiestas daugiau – 1:160 ir 1:320 (p<0,025). Lyginant šių tiriamų grupių atitinkamus

rezultatus, naudojant a-IgM, nustatyta, kad su nedaug atskiestas daugiau, minėtas skirtumas patikimesnis atskiestu antiserumu skirtumas tarp patinų ir patelių ($p < 0,025-0,001$). eritrocitų MFI nėra patikimas ($p < 0,5$). Jei a-IgM

1 lentelė. Kontrolinių ($n=13$) ir tiriamų šunų ($n=26$) eritrocitų membranos imunofluorescencijos (MIF) intensyvumas

Ožkos anti-serumai prieš šuns	Anti-serumo skiedimas	Kontrolinių šunų eritrocitų imunofluorescencija ($n=13$)		Tiriamų šunų eritrocitų imunofluorescencija ($n=26$)				Patikimumas tarp patinų ir patelių, $p <$
		Vidutinis eritrocitų imunofluorescencijos intensyvumas, \pm standartinis nuokrypis	$\bar{x} \pm 3s$	Patinai ($n=18$)		Patelės ($n=8$)		
				Vidutinis eritrocitų imunofluorescencijos intensyvumas, \pm standartinis nuokrypis	Patikimumas palyginti su kontrole, $p <$	Vidutinis eritrocitų imunofluorescencijos intensyvumas, \pm standartinis nuokrypis	Patikimumas palyginti su kontrole, $p <$	
IgG (HL grandinė)	20	4,6 \pm 1,3	8,4	47,41 \pm 64,75	0,01	38,09 \pm 50,17	0,025	nepatikima
	40	4,0 \pm 1,0	7,0	44,2 \pm 61,93	0,01	32,05 \pm 37,09	0,005	nepatikima
	80	3,6 \pm 0,7	5,7	36,28 \pm 46,09	0,01	27,2 \pm 23,22	0,010	nepatikima
	160	3,0 \pm 0,5	4,5	56,50 \pm 21,92	0,005	15,4 \pm 12,87	0,001	0,025
	320	2,5 \pm 0,4	3,7	26,2 \pm 11,73	0,001	8,46 \pm 5,72	0,005	0,025
IgM (miu grandinė)	20	2,5 \pm 0,7	4,6	6,35 \pm 6,23	0,001	10,87 \pm 8,00	0,005	0,5
	40	2,0 \pm 0,3	2,8	5,31 \pm 7,71	0,001	10,7 \pm 10,40	0,001	0,001
	80	1,8 \pm 0,3	2,6	5,14 \pm 9,69	0,001	12,97 \pm 12,7	0,005	0,025
	160	1,8 \pm 0,3	2,6	5,63 \pm 9,79	0,001	12,03 \pm 11,5	0,001	0,01
	320	1,8 \pm 0,3	2,5	4,62 \pm 6,68	0,001	9,91 \pm 7,61	0,005	0,005
IgA (alfa grandinė)	20	2,4 \pm 0,8	4,8	- (5,9)*	-	-	-	-
	40	2,2 \pm 0,6	4,1	- (4,9)	-	-	-	-
	80	2,1 \pm 0,6	4,0	- (4,0)	-	-	-	-
	160	2,0 \pm 0,5	3,6	- (3,7)	-	-	-	-
	320	1,9 \pm 0,4	3,1	-	-	-	-	-
C3	20	3,3 \pm 0,5	4,7	6,57 \pm 0,99	0,001	- (5,7)	-	-
	40	2,8 \pm 0,4	4,1	5,1 \pm 1,13	0,005	- (5,1)	-	-
	80	2,5 \pm 0,4	3,6	- (5,1)	-	- (4,9)	-	-
	160	2,3 \pm 0,3	3,2	-	-	-	-	-
	320	2,1 \pm 0,2	2,8	-	-	-	-	-

*Pastaba. (5,9) teigiamai reagavo tik vienas tiriamas šuo; teigiamai reagavusių tiriamų šunų nebuvo.



1 pav. Teigiamai į ožkos antiserumą (1:80) prieš šuns IgG reagavusio tiriamo paciento eritrocitų fluorescencijos intensyvumas (raudona spalva) palygintas su kontrolinio šuns eritrocitais, inkubuotais su tuo pačiu antiserumu (balta spalva)

Nagrinėjant praskiestų antiserumų įtaką MIF rezultatams nustatyta, kad, skiedžiant a-IgG 1:20 ir 1:40, teigiamai reagavo 44,44%, arba 8 vnt., patinų (n=18) ir 75%, arba 6 vnt., patelių (n=8), o antiserumą praskiedus

1:80 – atitinkamai 33,33%, arba 6 vnt., ir 50%, arba 4 vnt. a-IgG praskiedus 1:160 ir 1:320, teigiamai į MIF reagavo 11,11%, arba 2 vnt., patinų ir 50%, arba 4 vnt., patelių (2 lentelė).

2 lentelė. Tiriant membranos imunofluorescencijos (MIF) metodu pagal įvairius antiserumus ir jų skiedimą, teigiamai reagavo šunys (n=26)

Antiserumas	Antiserumo skiedimas	Patinai (n=18)			Patelės (n=8)		
		Reag. teig., vnt.	Reag., %	Vidut. amžius, m.	Reag.teig., vnt.	Reag., %	Vidut. amžius, m.
IgG (HL grandinė)	20	8	44,44	6,5	6	75	4,8
	40	8	44,44	6,5	6	75	4,8
	80	6	33,33	7,5	4	50	5
	160	2	11,11	7,5	4	50	5
	320	2	11,11	7,5	4	50	5
IgM (miu grandinė)	20	7	38,89	6,43	7	87,5	5,01
	40	7	38,89	6,43	7	87,5	5,01
	80	7	38,89	6,43	7	87,5	5,01
	160	4	22,22	8,75	6	75	4,83
	320	4	22,22	8,75	6	75	4,83
IgA (alfa grandinė)	20	1	5,56	6	0	0	-
	40	1	5,56	6	0	0	-
	80	1	5,56	6	0	0	-
	160	1	5,56	6	0	0	-
	320	0	0	-	0	0	-
C3	20	3	16,67	3,33	1	12,5	6,1
	40	2	11,11	2	1	12,5	6,1
	80	1	5,56	1	1	12,5	6,1
	160	0	0	-	0	0	-
	320	0	0	-	0	0	-

Tiriant a-IgM skiedimo įtaką MIF rezultatams paaiškėjo, kad, antiserumą praskiedus 1:20–1:80, teigiamai reagavo 38,89%, arba 7 vnt., patinų (n=18) ir 87,5%, arba 7vnt., patelių (n=8). Jei skiedžiama 1:160 ir 1:320 – atitinkamai 22,22%, arba 4 vnt., patinų ir 75%, arba 6 vnt., patelių (2 lentelė).

Kaip matyti iš pateiktų rezultatų, daugiausia tiriamų šunų (patinų ir patelių) į MIF teigiamai reagavo naudojant a-IgG ir a-IgM, su a-IgA teigiamai reaguojančiųjų buvo tik 5,56%, arba 1 vnt., patinų, o su a-C3 skiedžiant 1:20 – 16,67%, arba 3 vnt., 1:40 – 11,11%, arba 2 vnt., 1:80 – 5,56%, arba 1 vnt., patinų. Teigiamai į MIF reagavusių patelių su a-C3 buvo mažiau: skiedžiant 1:20–1:80 – 12,5%, arba 1 vnt., patelių.

Tiriamus šunis suskirsčius pagal lytį, pastebėti teigiamai į MIF reagavusių patinų ir patelių skaičiaus bei amžių skirtumai: beveik du kartus daugiau patelių teigiamai reagavo į MIF naudojant a-IgG ir a-IgM. Be to, jos buvo jaunesnės, nei teigiamai į minėtus antiserumus reagavę patinai (2 lentelė).

Visų kontrolinės grupės šunų Coomb's agliutinacijos metodas rodė neigiamą reakciją (reakcijos vertintos 4°C ir 37°C temperatūroje). Tiriamosios grupės šunų E teigiami rezultatai buvo gauti naudojant a-IgG ir a-C3 (3 lentelė). A-IgG praskiedus 1:20, teigiamai reagavo 27,78%, arba 5 vnt., patinų (n=18) ir 37,5%, arba 3 vnt., patelių (n=8);

1:40 – atitinkamai 11,11%, arba 2 vnt., ir 37,5%, arba 3 vnt., o 1:80 – atitinkamai 5,56%, arba 1 vnt., ir 37,5%, arba 3 vnt., patinų ir patelių.

Su a-IgG praskiedus 1:160, teigiamai reagavo tik viena patelė (12,5%). Skiedžiant a-IgM, tik esant didelei antikūnų koncentracijai – 1:20 – teigiami reagavo vienas patinas (5,56%) (3 lentelė). Panašiai tiriami šunys teigiamai reagavo ir į a-C3: skiedžiant antiserumą 1:20–1:80, agliutinaciją rodė vieno patino E (5,56%). Teigiamai į a-IgA, taikant Coomb's metodą, nereagavo nė vienas šuo.

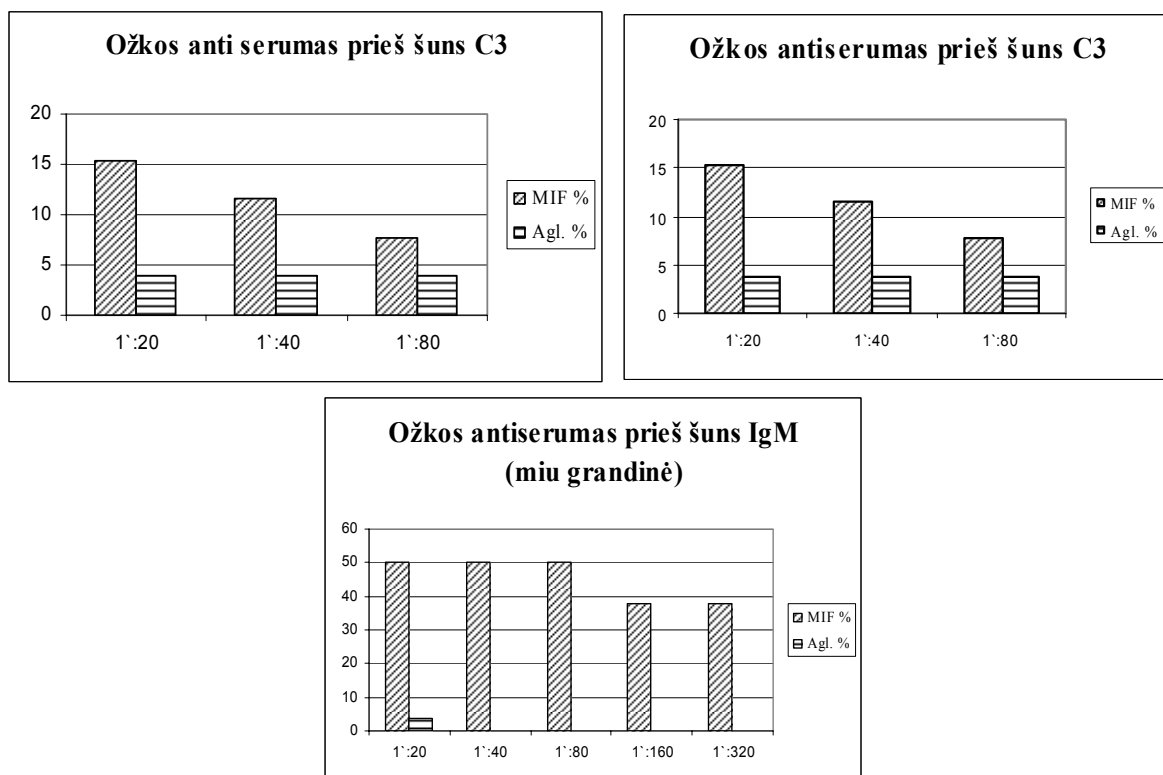
Ištirus 26 šunis AIHA atžvilgiu Coomb's ir MIF metodais, procentaliai palyginome gautus teigiamus rezultatus įvairiai skiestame antiserume (2 pav.). Iš pateiktų rezultatų matyti, kad MIF metodu nustatėme gerokai daugiau šunų, ant E turinčių autoantikūnų.

Tiriamus šunis suskirsčius pagal teigiamai į antiserumų grupes reagavusius E paaiškėjo, kad taikant Coomb's metodą 66,67%, arba 6 vnt., iš visų teigiamai reagavusių šunų (n=9) ant E turėjo IgG autoantikūnus, 11,11%, arba 1 vnt., ant E turėjo IgG + IgM, C3 + IgG bei IgM autoantikūnus. Iš viso teigiamai reagavo 9 tiriamosios grupės šunys (n=26) (4 lentelė).

Vertinant MIF metodą pagal antiserumų grupes, rezultatai skyrėsi: 11,11%, arba 2 vnt., iš visų teigiamai reagavusių šunų (n=18) ant E turėjo tik IgG

autoantikūnus. Gerokai daugiau – 61,11%, arba 11 vnt., aptikome šunų, ant kurių E buvo IgG + IgM autoantikūnų. 11,11%, arba 2 šunys, ant E turėjo C3 + IgG

autoantikūnus. 5,56%, arba 1 vnt., šunų ant E turėjo IgA, C3, C3 + IgM autoantikūnus (4 lentelė).



2 pav. Membranos imunofluorescencijos (MIF) ir Coomb's agliutinacijos metodų palyginimas

3 lentelė. Tiriant Coomb's agliutinacijos metodu pagal įvairius antiserumus ir jų skiedimą, teigiamai reagavo šunys (n=26)

Antiserumas	Antiserumo skiedimas	Patinai (n=18)			Patelės (n=8)		
		Reag. teig., vnt.	Reag., %	Vidut. amžius, m.	Reag. teig., vnt.	Reag., %	Vidut. amžius, m.
IgG (HL grandinė)	20	5	27,78	7,4	3	37,5	4,5
	40	2	11,11	4	3	37,5	3,3
	80	1	5,55	1	3	37,5	2,6
	160	0	0	0	1	12,5	6
	320	0	0	0	0	0	-
IgM (miu grandinė)	20	1	5,5	6	0	0	-
	40	0	0	-	0	0	-
	80	0	0	-	0	0	-
	160	0	0	-	0	0	-
	320	0	0	-	0	0	-
IgA (alfa grandinė)	20	0	0	-	0	0	-
	40	0	0	-	0	0	-
	80	0	0	-	0	0	-
	160	0	0	-	0	0	-
	320	0	0	-	0	0	-
C3	20	1	5,56	1	0	0	-
	40	1	5,56	1	0	0	-
	80	1	5,56	1	0	0	-
	160	0	0	-	0	0	-
	320	0	0	-	0	0	-

4 lentelė. Membranos imunofluorescencijos (MIF) ir Coomb's agliutinacijos metodų palyginimas pagal teigiamai į antiserumų grupes reagavusius tiriamus šunis

Antiserumas	MIF		Coomb's agliutinacija	
	Vnt.	Teigiamai reagavusiųjų, % (n=18)	Vnt.	Teigiamai reagavusiųjų, % (n=9)
IgG (HL grandinės)	2	11,11	6	66,67
IgA (alfa grandinė)	1	5,56	0	0
C3	1	5,56	0	0
IgG+IgM	11	61,11	1	11,11
C3+IgG	2	11,11	1	11,11
C3+IgM	1	5,56	0	0
IgM (miu grandinė)	0	0	1	11,11
Iš viso teigiamai reagavo:	18	-	9	-

Remdamiesi anksčiau pateiktais tyrimų rezultatais galime teigti, kad MIF metodas yra jautresnis nei Coomb's.

Diskusija. AIHA sergančių individų organizme susidariusių AAK priežastys iki šiol nėra žinomos. Daugelis mokslininkų daro prielaidą, kad tam tikras AAK kiekis ant E būtinas „susidėvėjusioms“ ląstelėms iš organizmo pašalinti – nedideli jų titrai yra fiziologinė norma. ELISA metodu nustatyta, kad ant sveikų žmonių ir šunų E yra apie 38–50 molekulių IgG (Cambell, George, 1984; Bayer et al., 2001).

Maždaug 8% kliniškai sveikų žmonių (Garratty, 1991) ir apie 10% šunų (Victoria et al., 1990; Barker et al., 1993) ant E paviršiaus aptinkama daugiau nei įprastai, t. y. apie 200 AAK molekulių. Ar padidėjęs jų kiekis daro įtaką organizmo imuninei sistemai, vieningos nuomonės nėra. Vieni mokslininkai teigia, kad organizme AAK gali padaugėti po polikloninės B limfocitų aktyvacijos (Alcorta et al., 1993), o padidėjęs jų kiekis prieš E gali būti siejamas ir ne su AIHA (Andrzejewski et al., 1991; Barker et al., 1992): pavyzdžiui, IgG klasės AAK gali būti nespecifiškai adsorbuoti E membranos, kai plazmoje padaugėja IgG.

Kai kurių tyrėjų duomenimis (Garratty, 1991), padidėjęs AAK kiekis gali būti siejamas ir su autoimuninės hemolitinės anemijos pradžia. Iki šiol nėra žinoma, kokią įtaką AIHA patogenezei gali turėti AAK kiekybiniai (prie E nespecifiškai prisijungę Ig molekulės), kokybiniai (prie E Fc receptorių prisijungę Ig molekulės) ar abu faktoriai. Koreliacijos tarp AAK molekulių, prisijungusių prie E, ir tokių ląstelių šalinimo *in vivo*, kol kas neaptikta (Garratty, 1991).

Vis dažniau mokslininkai užsimena apie nepakankamai jautrų iki šiol AIHA diagnostikai taikomą Coomb's agliutinacijos metodą (Chaplin Hugh, 1985; Asmussen et al., 1996; Wang et al., 2001): nedideli AAK titrai ant E taikant šį metodą gali būti ir neaptikti. Mažiausias AAK kiekis, kurį galima aptikti, – 120 IgG molekulių. Taigi Coomb's metodo rezultatai yra neigiami, kai ant E yra daugiau nei 50 ir mažiau nei 120 IgG molekulių. Iki šiol tokie AIHA atvejai buvo diagnozuojami tik pagal kraujo tepinėlio vaizdą.

Nuo 1994 metų, atsiradus galimybei detaliau tirti ląsteles – AIHA nustatyti ląstelių tėkmės citometru, mokslininkai Coomb's agliutinacijos metodu siūlo tirti lygiagrečiai su ląstelių MIF metodu (Lynen et al., 1995).

Šiuo metu pasirodo pavieniai straipsniai apie žmonių E imunofluorescencijos tyrimus su ląstelių tėkmės citometru bei jų lyginimą su Coomb's agliutinacijos metodu. Z. Wang ir kiti tyrėjai 2001 metais paskelbė duomenis, kad 3 (arba 37,5%) iš 8 tirtų pacientų (su žmonių eritrocitais) Coomb's agliutinacijos metodu rezultatai buvo neigiami, tuo tarpu ląstelių MIF liudijo ant šių pacientų E esant IgG klasės AAK. Iki šiol literatūroje paskelbtų duomenų apie Coomb's agliutinacijos palyginimą su MIF metodu, tiriant gyvulių E, nėra.

Mūsų tyrimų duomenys taip pat įrodo, kad ne visi AIHA atvejai yra diagnozuojami taikant Coomb's agliutinacijos metodą: neretai, net ir esant didelei E imunofluorescencijai, agliutinacija buvo neigiama. Lyginant MIF su Coomb's agliutinacija, pirmasis tyrimų metodas pasirodė jautresnis net 50%. Minėtų diagnostikos metodų jautrumo priežastis – metodų vertinimas, kuris Coomb's agliutinacijos atveju atliekamas akimi vertinant agliutinacijos stiprumą, o MIF tėkmės citometras įvertina kiekvieno eritrocito imunofluorescenciją.

Remiantis paskutinių mokslinių tyrimų duomenimis, šunims, kaip ir žmonėms, AIHA atveju ant E dažniausiai Coomb's agliutinacijos metodu aptinkami IgG (57%), IgG+IgM (21,42%) klasės AAK bei IgM+C3 (7,14%) (Day, 1996). Mūsų atliktų Coomb's agliutinacijos tyrimų duomenimis, šie rodikliai skyrėsi neženkiai: 66,6% tirtų šunų ant E aptikome IgG klasės AAK, IgG+IgM – 11,11%, IgG+C3 – 11,11%.

Kaip vienos ar kitos klasės AAK veikia šunų AIHA patogenezę (arba kuris iš tiriamų imunoglobulinų izotipas aktyvuoja komplemento sistemą), iki šiol nežinoma. Kol kas galime remtis tik moksliniais tyrimais, atliktais su žmonių E. Literatūroje teigiama, kad vieni reikšmingiausių AIHA patogenezėje yra IgG klasės AAK. Atskiri šio izotipo imunoglobulino poklasiai ligos patogenezėje dalyvauja skirtingai: IgG1 ir IgG3 komplemento sistemą aktyvuoja klasikiniu keliu, o IgG2 šiuo būdu komplemento sistemą aktyvina tik tada, kai ant E yra didelė antigeno koncentracija. Antigenų ant E esant mažiau, IgG2 komplementas aktyvuojamas alternatyviu keliu. Žmonių AIHA atveju vienas dažniausiai pasitaikančių IgG izotipų – IgG1 (Lucisano, Lachmann, 1991). Mūsų atliktas tyrimas dėl naudoto antiserumo specifiškumo (ožkos antiserumas prieš šuns IgG HL grandinės) nepadedą atsakyti į klausimą, kuris iš šiuo metu žinomų keturių šunų IgG izotipų poklasijų vyravo

tiriamų teigiamai reagavusių šunų grupėje. Literatūros duomenys teigia, jog IgG1 izotipo poklasis šunims sergant AIHA aptinkamas dažniausiai (Day, 1996). Tad galime daryti prielaidą, kad tokių šunų komplemento sistema taip pat gali būti aktyvinama klasikiniu keliu.

Ant žmonių E aptinkamas IgM klasės AAK komplemento sistemą aktyviai skatina klasikiniu keliu. Įdomu, jog dėl šio imunoglobulino patogeniškumo AIHA atveju mokslininkų nuomonės šiek tiek skiriasi. Vieni teigia, kad IgM nėra labai svarbus nustatant AIHA eigą ir prognozę, mat ant E padidėję IgM titrai liudija apie paciento gydymui naudotus imunosupresinius vaistus (pvz., slopinančius T ląstelių imuninį atsaką) (Bras, Aguas, 1995). Kiti mokslininkai linkę manyti, jog beveik penkis kartus savo molekuline mase už IgG didesnis IgM, aktyvindamas komplemento sistemą, gali sukelti rimtus organų funkcinius pažeidimus, pavyzdžiui, insktų (Tizard, 2000).

Mūsų atliktų MIF tyrimų duomenimis, šunų grupė, ant kurių E buvo aptikti IgM klasės antikūnai, buvo gausiausia: IgG+IgM – 61,11%, o C3+IgM – 5,56%. Kadangi minėtu atveju ant E nustatyti ne vieni IgM klasės antikūnai – kartu su IgG bei C3 komponentu, galime teigti, jog šie šunys sudaro gan rizikingą pacientų grupę, kurių gydymo sėkmė (dėl stipriai aktyvinamos komplemento sistemos) ateityje abejotina.

Beje, literatūroje akcentuojama (Tizard, 2000), kad du kartus dažniau AIHA (kaip ir kitomis autoimuninėmis ligomis dėl organizme esančių estrogenų) linkę sirgti patelės nei patinai. Mūsų atliktų tyrimų duomenys (2 ir 3 lentelės) akivaizdžiai įrodo minėto teiginio pagrįstumą: ląstelių MIF ir Coomb's aglutinacijos tyrimų rezultatai, naudojant ožkos antiserumus prieš IgG (HL grandinė) ir IgM (miu grandinė), beveik du kartus dažniau buvo teigiami tiriant patelas. Lyginant tiriamosios grupės šunų amžių su literatūroje aprašytu (Tizard, 2000) paaiškėjo, kad beveik visais atvejais ant E esančius AAK turėjo jaunesnės patelės nei patinai. Pastebėtas metų skirtumas (vidutiniškai – 2,38 metų) tarp skirtingos lyties tiriamų šunų leidžia daryti prielaidą, kad patelės ne tik dažniau, bet, būdamos jaunesnės, labiau linkusios sirgti autoimuninėmis ligomis.

Išvados.

1. Daugiausia tirtų šunų ant eritrocitų paviršiaus turėjo IgG ir IgM autologinius antikūnus: su a-IgG, tiriant MIF metodu, teigiamai reagavo 53% šunų, Coomb's metodu – tik 26%, o su a-IgM – atitinkamai 50% ir 3,84%.

2. AIHA dažniau linkusios sirgti patelės nei patinai: su a-IgG teigiamai reagavo 75% patelių, o patinų – 44,44%, su a-IgM – atitinkamai 87,5% ir 38,89%.

3. MIF yra beveik du kartus jautresnis diagnostikos metodas palyginti su Coomb's aglutinacija (2:1). Tačiau dėl iki šiol neišskios AAK įtakos *in vivo* eritrocitų ilgaamžiškumui, Coomb's aglutinacijos metodu diagnozuojant siūlome taikyti kartu su MIF metodu.

Literatūra

- Alcorta I., Terol M. J., Lopez-Guillermo A., Pereira A., Ordinas A. Transient appearance of anti-erythrocyte autoantibodies during Rh alloimmunization. *Sangre Barc.* 1993. Vol. 38. P. 323–326.
- Andrzejewski-C. Jr., Young-PJ., Cines-DB, Silberstein-LE. Heterogeneity of human red cell autoantibodies assessed by isoelectric focusing. *Transfusion.* 1991. Mar-Apr, Vol. 31. Nr. 3. P. 236–244.

- Asmussen C., Gutensohn K., Wittkopf D., Kuhl P. Rapid detection of IgG subclasses on DAT positive RBC membranes by flow cytometry (FC). *Beitr. Infusionsther.* 1996. *Transfusionsmed.* Vol. 33. P. 35–39.
- Bayer PM., Fabian B., Hubl W. Immunofluorescence assays (IFA) and enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) in autoimmune disease diagnostic: technique, benefits, limitations and applications. *Scan. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 2001. Vol. 235. P. 68–76.
- Barker R. N., Casswell K. M., Reid M. E., Sokol R. J., Elson C. J. Identification of autoantigens in autoimmune haemolytic anaemia by a non-radioisotope immunoprecipitation method. *Br-J-Haematol.* 1992. Sep Vol. 82. Nr. 1. P. 126–132.
- Barker R. N., T. J. Gruffydd Jones, C. R. Stokes and C. J. E. Elson. Identification of autoantigens in canine autoimmune haemolytic anaemia. *Clin. Exp. Immunol.* 1991. Vol. 85. P. 33–40.
- Bras A., Aguas A. P. Mycobacteria-induced autoantibody production is associated with susceptibility to infection but not with host propensity to develop autoimmune disease. *Clin. Exp. Immunol.* 1995. Vol. 100. Nr. 1. P. 75–80.
- Bush B. M. Interpretation of laboratory results for small animal clinicians. *Blacwell Science, London, UK.* 1991. P. 126–128.
- Cambell K. L. and George J. W. Application of enzyme-linked immunosorbent assay to detect canine erythrocyte antibodies. *Am. J. vet. Res.* 1984. Nr. 45. P. 747.
- Chaplin Hugh. *Immune hemolytic anemias.* Churchill Livingstone Inc., USA. 1985. P. 14–15.
- Day J. M. Serial monitoring of clinical, haematological and immunological parameters in canine autoimmune haemolytic ananemia. *J. Small Anim. Pract.* 1996. Nov, Vol. 37. Nr. 11. P. 523–534.
- Day J. M. IgG subclasses of canine anti-erythrocyte, antinuclear and anti-thyroglobulin autoantibodies. *Res. Vet. Sci.* 1996. Vol. 61. P. 129–135.
- Day J. M. *Clinical immunology of the dog and cat.* Manson publication, London, UK. 1999. P. 69–85.
- Dodds W. J. Autoimmune haemolytic disease and other causes of immune-mediated anemia: an overview. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 1977. Vol. 13. P. 437.
- Garratty G. Effect of cell-bound proteins on the *in vivo* survival of circulating blood cells. *Gerontology.* 1991. Vol. 37. Nr. 1-3. P. 68–94.
- Gutowsky K. A., Hudson J. L., Aminoff D. Flow cytometric analysis of human erythrocytes: I. probed with lectins and immunoglobulins. *Exp-gerontol.* 1991. Vol. 26. Nr. 4. P. 315–326.
- Jones D. R. E., Gruffydd Jones T. J., Stokes C. R. and Bourne F. J. Investigation into factors influencing performance of the canine antiglobulin test. *Res.vet. Sci.* 1990. Nr. 48. P. 53.
- Lynen R., Neuhaus R., Schwarz D. W., Simson G., Riggert J., Mayr W. R., Kohler M. Flow cytometric analyses of the subclasses of red cell IgG antibodies. *Vox-Sang.* 1995. Vol. 69. Nr. 2. P. 126–130.
- Lucisano Valim Y. M., Lachmann P. J. The effect of antibody isotype and antigenic epitope density on the complement-fixing activity of immune complexes: a systemic study using chimeric anti-NIP antibodies with human Fc regions. *Clin. Exp. Immunol.* 1991. Vol. 84. Nr. 1. P. 1–8.
- Pedersen N. C. A review of immunologic diseases of the dog. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1999. Vol. 69. P. 251–342.
- Packman C. H. and Leddy J. P. *Acquired hemolytic anemia due to warm-reacting autoantibodies.* New York (McGraw-Hill). 1990. P. 666.
- Tizard Ian R. *Veterinary Immunology (An introduction).* Texas, USA. 2000. P. 379.
- Tsuchida S., Usui R., Muramatsu U., Ejima H., Ikemoto S. Autoantibodies and red blood cell membrane proteins in a case of canine autoimmune hemolytic anemia. *J. Vet. Med. Sci.* 1991. Feb, Vol. 53. Nr. 1. P. 19–22.
- Victoria E. J., Pierce S. W., Branks M. J., Masauredis S. P. IgG red blood cells autoantibodies in autoimmune hemolytic anemia bind to epitopes on red blood cells membrane band 3 glycoprotein. *J. Lab. Clin. Med.* 1990. Jan, Vol. 115. Nr. 1. P. 74–88.
- Wang Z., Shi J., Zhou Y., Ruan C. Detection of red blood cell-bound immunoglobulin G by flow cytometry and its application in the diagnosis of autoimmune hemolytic anemia. *Int. J. hematomol.* 2001. Feb, Vol. 73. Nr. 2. P. 188–193.