

«УТВЕРЖДАЮ»

Первый заместитель Министра

Ю. Л. Горбич

2024 г.

Регистрационный № 145-1223



**МЕТОД ДИАГНОСТИКИ СЕЛЕКТИВНОГО  
(ИЗБИРАТЕЛЬНОГО) ДЕФИЦИТА ИММУНОГЛОБУЛИНА А**

инструкция по применению

**УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:**

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»<sup>1</sup>

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека»<sup>2</sup>

Авторы: Шитикова М.Г.<sup>1</sup>, Жаранкова Ю.С.<sup>1</sup>, Алешкевич С.Н.<sup>1</sup>, к.б.н.  
Корестелева Л.Б.<sup>1</sup>, к.б.н. Саливончик А.П.<sup>2</sup>, д.м.н., доцент  
Зыблева С.В.<sup>2</sup>, к.б.н., доцент Белевцев М.В.<sup>1</sup>

Минск, 2024

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод диагностики селективного (избирательного) дефицита иммуноглобулина А (СДА, D80.2 (МКБ-10)).

Настоящая инструкция предназначена для врачей общей практики, врачей-аллергологов-иммунологов, врачей-педиатров, врачей-гематологов, врачей-ревматологов, а также для других врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающим первичными иммунодефицитами.

### **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Основные клинические проявления у пациентов с подозрением на селективный дефицит IgA:

инфекции респираторного тракта (риниты, бронхиты, пневмонии);  
аллергические заболевания (бронхиальная астма, аллергический ринит, пищевая аллергия);

поражения желудочно-кишечного тракта (целиакия, неспецифический язвенный колит, болезнь Крона, лямблиоз);

аутоиммунные заболевания (системная красная волчанка, ревматоидный артрит, аутоиммунная гемолитическая анемия, иммунная тромбоцитопеническая пурпура, антифосфолипидный синдром, сахарный диабет 2 типа).

### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Нет.

**ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ,  
РЕАКТИВОВ И РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ**

**МЕДИЦИНСКИЕ ИЗДЕЛИЯ**

- Лазерный проточный цитометр;
- вихревой смеситель настольный;
- анализатор типа нефелометр;
- автоматический иммуноферментный анализатор стрипового или картриджного типа;
- автоматическое или полуавтоматическое промывающее устройство для 96-луночных микропланшетов;
- многоцелевой абсорбционный микропланшетный ридер для 96-луночных планшетов (с фильтром  $450 \pm 10$  нм, референтная длина волны  $\geq 620$  нм);
- центрифуга с охлаждением с относительной центробежной силой 1000 g (температурный режим от +2 ... +8 °С, объем пробирок 10 – 15 мл);
- центрифуга без охлаждения с относительной центробежной силой 3000 g (объем пробирок 10-15 мл);
- термостат (37 °С  $\pm$  0,1°С);
- низкотемпературная морозильная камера, поддерживающая температуру минус (80  $\pm$  5) °С;
- холодильник, поддерживающий температуру +4 °С...+8 °С;
- микровесы от 0,01 до 1000 г;
- лабораторный таймер;
- дозаторы для работы с объемами растворов в диапазоне от 1 до 1000 мкл.



## РЕАКТИВЫ

Деонизированная или дистиллированная вода;

моноклональные антитела, конъюгированные с флуорохромами (FITC, фикоэритрином (PE), PC5, PC7, APC, APC Alexa Fluor 750), для детекции субпопуляций лимфоцитов;

лизирующий раствор для лизиса эритроцитов (155 мМ хлорида аммония; 10 мМ гидрокарбоната калия; 10 мМ двукальевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты);

фосфатно-солевой буферный раствор (10 мМ фосфат натрия; 2,7 мМ хлорид калия; 137 мМ хлорид натрия; 1,76 мМ фосфат калия, pH 7,0–7,2);

тест-система для количественного определения концентрации секреторного иммуноглобулина класса А в смешанной нестимулированной слюне методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА);

тест-система для количественного определения концентрации секреторного иммуноглобулина класса А в кале методом твердофазного ИФА;

тест-система для количественного определения концентрации лизоцима в слюне методом твердофазного ИФА;

тест-системы (стрипы/картриджи) для количественного определения уровня аутоиммунных антител в сыворотке крови методом ИФА (иммуноглобулины класса G к глиадину, иммуноглобулины класса G к тканевой трансглутаминазе, антинуклеарные антитела (ANA-screen), иммуноглобулины класса G к маркерам щитовидной железы, иммуноглобулины класса G к *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA), иммуноглобулины класса M и G к бета-2-гликопротеину).

## **РАСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ**

Пробирки с антикоагулянтом  $K_2$  ЭДТА (двукальциевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты) для иммунологических исследований;

- пробирки без антикоагулянта (для серологических исследований);
- фильтровальная бумага (лабораторные бумажные полотенца);
- емкость для отмывающего раствора (объем не менее 700 мл);
- мерный цилиндр (1000 мл);
- наконечники для дозаторов (объем – от 1 до 1000 мкл);
- пробирки типа эшендорф на 1,5 или 2 мл;
- штативы для заморозки (для микропробирок объемом 1,5 – 2 мл);
- пробирки центрифужные объемом 15 мл;
- пробирки для проточного цитофлуориметра;
- емкость для утилизации изделий медицинского назначения с 0,5% раствором гипохлорита;
- перчатки медицинские нестерильные.

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА ДИАГНОСТИКИ СЕЛЕКТИВНОГО (ИЗБИРАТЕЛЬНОГО) ДЕФИЦИТА ИММУНОГЛОБУЛИНА А**

Схема метода включает в себя следующие этапы:

1. Определение концентрации иммуноглобулинов классов G, M и A в сыворотке крови.
2. Определение концентрации секреторного иммуноглобулина класса A в смешанной нестимулированной слюне.
3. Определение концентрации секреторного иммуноглобулина класса A в кале.



4. Проведение стандартного иммунологического исследования с определением относительного и абсолютного содержания Т-, В-лимфоцитов и естественных киллеров методом проточной цитометрии, расчет иммунорегуляторного индекса (ИРИ) (отношение Т-хелперов к цитотоксическим Т-лимфоцитам).

5. Углубленное иммунофенотипирование субпопуляций В-лимфоцитов.

6. Углубленное иммунофенотипирование субпопуляций Т-лимфоцитов.

7. Определение концентрации лизоцима в слюне.

8. Определение уровня аутоиммунных антител в сыворотке крови (иммуноглобулины класса G к глиадину, иммуноглобулины класса G к тканевой трансглутаминазе, антинуклеарные антитела (ANA-screen), иммуноглобулины класса G к маркерам щитовидной железы, иммуноглобулины класса G к *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA), иммуноглобулины класса M и G к бета-2-гликопротеину).

### **1. Определение концентрации иммуноглобулинов M, G, A в сыворотке крови**

Исследования проводят иммунотурбидиметрическим или нефелометрическим методом с использованием тест-системы, согласно инструкции производителя. На основании градиента величины оптической плотности автоматически рассчитывают показатель концентрации иммуноглобулинов в исследуемом образце (в г/л).

## **2. Определение концентрации секреторного иммуноглобулина класса А в смешанной нестимулированной слюне**

Проводят методом количественного твердофазного иммуноферментного анализа с использованием тест-системы, согласно инструкции производителя. Результат выражается в мкг/мл.

## **3. Определение концентрации секреторного иммуноглобулина класса А в кале**

Проводят методом количественного твердофазного иммуноферментного анализа по принципу сэндвич-метода с использованием тест-системы, согласно инструкции производителя. Результат выражается в мкг/г.

## **4. Проведение стандартного иммунологического исследования с определением относительного и абсолютного содержания Т-, В-лимфоцитов и естественных киллеров методом проточной цитометрии методом безотмывочной технологии, расчет ИРИ**

Для проведения стандартного иммунологического исследования у пациентов берут периферическую кровь в пробирки с антикоагулянтом ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота). Иммунофенотипирование лимфоцитов проводят методом многоцветной проточной цитометрии с использованием процедуры безотмывочной технологии лизирования эритроцитов с использованием моноклональных антител, конъюгированных с FITC, фикоэритрином (PE), PC5, PC7, APC, APC Alexa Fluor 750. Иммунологические параметры для исследования состояния иммунной системы включают в себя следующие показатели клеточного иммунитета:

- стандартное иммунологическое исследование (стандартная иммунограмма методом проточной цитометрии): Т-лимфоциты (CD3+), Т-хелперы (CD3+CD4+), цитотоксические Т-лимфоциты (CD3+CD8+),



В-лимфоциты (CD19+), естественные киллеры (CD3-CD16+CD56+), иммунорегуляторный индекс (ИРИ) - соотношение CD3+CD4+ и CD3+CD8+ клеток, Т-естественные киллеры (CD3+CD56+CD16+), активированные Т-лимфоциты (CD3+HLADR+), Т-хелперы с экспрессией маркера поздней активации (CD3+CD4+HLADR+), Т-хелперы с экспрессией маркера ранней активации (CD3+CD4+CD38+), цитотоксические Т-лимфоциты с экспрессией маркера поздней активации (CD3+CD8+HLADR+), цитотоксические Т-лимфоциты с экспрессией маркера ранней активации (CD3+CD8+CD38+), расчет абсолютного количества Т-лимфоцитов (CD3+), В-лимфоцитов (CD19+) и естественных киллеров (CD3-CD56+CD16+).

Результат выражают в %, для математического вычисления абсолютных значений используются данные гемограммы, выполненной в тот же день (абсолютные значения лимфоцитов).

Расчет ИРИ производится математическим вычислением отношения Т-хелперов к цитотоксическим Т-лимфоцитам.

#### **5. Углубленное иммунофенотипирование В-лимфоцитов методом безотмывочной технологии.**

Образец крови пациента из пробирки с антикоагулянтом ЭДТА окрашивают моноклональными антителами, конъюгированными с FITC, фикоэритрином (PE), PC7, APC, используют процедуру безотмывочного лизирования эритроцитов. Иммунофенотипические параметры для определения дополнительных субпопуляций В-лимфоцитов включают в себя следующие маркеры:

- IgD-переключенные В-лимфоциты памяти (CD19+CD27+IgD-), IgD-непереключенные В-лимфоциты памяти или В-лимфоциты маргинальной зоны (CD19+CD27+IgD+), наивные В-лимфоциты



(CD19+CD27-IgD+), функционально незрелые В-лимфоциты (CD19+CD21-/low).

#### **6. Углубленное иммунофенотипирование Т-лимфоцитов методом безотмывочной технологии**

Используют образец периферической крови из пробирки с антикоагулянтом ЭДТА, используемый для стандартного иммунологического исследования. Образец крови окрашивают моноклональными антителами, конъюгированными с FITC, фикоэритрином (PE), APC, APC Alexa Fluor 700, APC Alexa Fluor 750, Pacific Orange. Иммунологические параметры для определения дополнительных субпопуляций Т-лимфоцитов включают в себя следующие маркеры:

- наивные Т-хелперы (CD3+CD4+CD45RA+), Т-хелперы центральной памяти (CD3+CD4+CD45RA-CD197+), Т-хелперы эффекторной памяти (CD3+CD4+CD45RA-CD197-), терминально-дифференцированные эффекторные Т-хелперы (CD3+CD4+CD45RA+CD197-), наивные Т-цитотоксические лимфоциты (CD3+CD8+CD45RA+), цитотоксические Т-лимфоциты центральной памяти (CD3+CD8+CD45RA-CD197+), цитотоксические Т-лимфоциты эффекторной памяти (CD3+CD8+CD45RA-CD197-), терминально-дифференцированные эффекторные цитотоксические Т-лимфоциты (CD3+CD8+CD45RA+CD197-), мукозассоциированные инвариантные Т-лимфоциты (CD3+TCRVa7.2+CD161+).

#### **7. Определение концентрации лизоцима в слюне**

Проводят методом количественного твердофазного иммуноферментного анализа с использованием тест-системы, согласно инструкции производителя. Результат выражается в нг/мл.

## **8. Определение уровня аутоиммунных антител в сыворотке крови**

Определение уровня аутоиммунных антител в сыворотке крови (иммуноглобулины класса G к глиадину, иммуноглобулины класса G к тканевой трансглутаминазе, антинуклеарные антитела (ANA-screen), иммуноглобулины класса G к маркерам щитовидной железы, иммуноглобулины класса G к *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA), иммуноглобулины класса M и G к бета-2-гликопротеину) проводят согласно инструкции производителя. Результат выражается в AU/ml.

## **9. Интерпретация полученных результатов**

Диагноз селективный (избирательный) дефицит иммуноглобулина A выставляется при снижении концентрации сывороточного иммуноглобулина A в крови до 0,07 г/л при определении двухкратно с интервалом не менее 2 недель.

Согласно международным критериям (Kniffin C., et al; Selective deficiency IgA) диагноз селективного дефицита иммуноглобулина A имеет несколько клинико-иммунологических фенотипов:

1. Иммунодефицитный или Инфекционный фенотип. Проявляются рецидивирующими синусно-пульмональными, желудочно-кишечными инфекциями, хроническими отитами. Может протекать с поражением T-звена иммунитета. Характерны изменения T-клеточного звена с увеличением эффекторных T-клеток памяти, терминально-дифференцированных T-лимфоцитов, повышенного количества клеток центральной памяти, снижения мукозассоциированных инвариантных T-лимфоцитов. Вовлечение T-клеток в патологический процесс ухудшает прогноз течения инфекционного процесса и риск развития осложнений (облитерирующий бронхит, бронхоэктазы, пневмонии и др.).



2. Аутоиммунный фенотип. Характерно наличие аутоиммунных антител к одному или нескольким антигенам, характерных для одного или нескольких аутоиммунных заболеваний (высокая частота целиакии, болезни Крови, СКВ, болезни Грейвса, встречаются аутоиммунные цитопении и др.).

3. Аллергический фенотип. Обычно отмечаются аллергический конъюнктивит, экзема, аллергический ринит, крапивница, пищевая аллергия и бронхиальная астма. Клиническое течение, принципы диагностики и лечения аллергических заболеваний не имеет особенностей.

4. Неопластический фенотип. Развитие доброкачественных (тератомы, кератомы, полипы) и злокачественных лимфоидных (В-клеточные лимфомы, лейкозы) и соматических новообразований (аденокарцинома желудка).

5. Смешанный фенотип. При наличии клинических, лабораторных данных нескольких фенотипов.

## **10. Ошибки при реализации метода и пути их устранения**

При правильном выполнении рекомендаций данных инструкцией производителя тест-систем ошибки маловероятны.