

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

«*Пиневиц*» 2018 г.

Регистрационный № 011-0118



**МЕТОД ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ И
ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ, ВЫЗВАННЫХ РЕАКЦИЯМИ
ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ НЕМЕДЛЕННОГО ТИПА НА
ПЫЛЬЦУ РАСТЕНИЙ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ - РАЗРАБОТЧИКИ:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»

Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

АВТОРЫ: канд. мед. наук Гончаров А.Е., Романова И.В., д-р. мед. наук, проф. Маслова Л.В., канд. мед. наук Осипова А.В.

Минск, 2018

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод диагностики заболеваний и патологических состояний, вызванных реакциями гиперчувствительности немедленного типа на пыльцу растений, основанный на определении маркеров дегрануляции базофилов. Метод, изложенный в настоящей инструкции, может быть использован в комплексах медицинских услуг, направленных на диагностику аллергических заболеваний.

Инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-аллергологов, врачей-иммунологов, иных врачей-специалистов, оказывающих медицинскую помощь пациентам в амбулаторных и (или) стационарных условиях.

1 Показания к применению

Аллергический конъюнктивит (H10), аллергический ринит (J30.1), бронхиальная астма (J45.0), вызванные пыльцой растений.

2 Перечень необходимых изделий медицинского назначения, медицинской техники и др.

2.1 Медицинская техника:

1. цитофлуориметр проточный (минимум 4 канала флуоресценции);
2. дозаторы автоматические лабораторные с объемами дозирования 0,5–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1000 мкл и 1–5 мл;
3. центрифуга низкоскоростная (1000–3000 об./мин.);
4. термостат с рабочей температурой +37 °С;
5. холодильник бытовой с рабочей температурой от +2 °С до +8 °С с морозильной камерой;
6. шейкер орбитальный.

2.2 Изделия медицинского назначения:

1. наконечники пластиковые на 1–5 мл, 0,1–1,0 мл, 0,01–0,1 мл, 0,5–10 мкл;
2. одноразовые полипропиленовые пробирки объемом 1,5 мл;

3. пробирки для цитофлуориметра;
4. пробирки полипропиленовые объемом 10–15 мл;
5. вакутайнеры с гепарином;
6. контейнеры для хранения и транспортировки пробирок с кровью;
7. емкости для хранения и дезинфекции отработанного биологического материала;
8. моноклональные антитела к антигенам HLA-DR, CD63, CD123 и CD107a, конъюгированные с флуорохромами;
9. неконъюгированное моноклональное антитело к IgE, клон 4H10;
10. лизирующий раствор на основе хлорида аммония;
11. фосфатный буферный раствор Дульбекко (DPBS), не содержащий ионов двухвалентных металлов;
12. аллерген, в отношении которого проводится тестирование: официальный аллерген для диагностики и лечения, изготовленный фабрично-заводским путем, или аллерген, полученный в лаборатории из пыльцы растения.

2.3 Средства индивидуальной защиты и дезинфектанты:

1. лабораторный халат;
2. латексные или нитриловые перчатки;
3. дезинфицирующий раствор, предназначенный для обработки рук медицинских работников;
4. дезинфицирующий раствор для инактивации биологического материала.

3 Технология использования метода

3.1 Забор материала, хранение и транспортировка

Материалом для диагностики является периферическая венозная кровь пациента, которую забирают в количестве 5–7 мл в вакутайнер, содержащий гепарин в качестве антикоагулянта. Образец крови до исследования хранят при температуре от +18 °С до +26 °С не более 4 ч.

3.2 Получение аллергена из пыльцы растения

В случае отсутствия коммерческого аллергена для выполнения метода может быть использован аллерген, полученный в лабораторных условиях при помощи водно-солевой экстракции. Для этого собранную высушенную пыльцу растений обезжиривают этиловым эфиром. После чего проводят экстрагирование с помощью фосфатного буфера (рН в диапазоне от 7,5 до 8,0) в соотношении 1:10 (в/о) в шейкере в течение 72 ч при температуре от +4 °С до +8 °С и постоянном перемешивании. Надосадочную жидкость центрифугируют, проводят стерилизующую фильтрацию через мембранные фильтры с диаметром пор не выше 0,22 мкм. Экстракты аллергенов стандартизуют по содержанию единиц белкового азота (1 PNU) и хранят при температуре +2 °С до +8 °С.

3.3 Пробоподготовка

Рабочие растворы исследуемых аллергенов готовят непосредственно перед исследованием. Маркируют пробирки объемом 1,5 мл и добавляют в каждую 100 мкл DPBS. Затем добавляют в пробирки по 1 мкл исследуемого аллергена, получая рабочий раствор в разведении 1:100.

Маркируют пробирки для цитометра:

1. отрицательный контроль (ОК) – добавляют DPBS 10 мкл;
2. положительный контроль (ПК) – добавляют антитело к IgE в количестве 1 мкг/мл;
3. рабочий раствор аллергена(ов) в количестве 10 мкл.

Во все пробирки добавляют 100 мкл испытуемой крови и смешивают на шейкере. Важно избегать грубых манипуляций с образцом крови: грубое пипетирование крови, не допускать вспенивания. Пробирки помещают в инкубатор (+37 °С) на 15 мин. После чего их переносят в морозильную камеру холодильника (–20 °С) на 1 мин. для остановки активации базофилов (стоп-реакция). В каждую пробирку вносят антитела: CD63

(FITC), CD123 (PE), HLA-DR (PerCP), CD107a (APC). Данная панель антител является рекомендуемой, сочетание флуорохромов может быть иным. Тщательно смешивают на шейкере и инкубируют на протяжении 15 мин. при температуре от +2 °С до +8 °С в темноте. После чего добавляют 2 мл лизирующего раствора в каждую пробирку, перемешивают на шейкере и инкубируют на протяжении 10 мин. при температуре от +18 °С до +25 °С в темноте. Пробирки центрифугируют (200–300 g – 5 мин.) для осаждения клеток, аккуратно сливают супернатант. Добавляют 300 мкл DPBS и перемешивают на шейкере.

3.4 Учет данных

Учет проб осуществляют на проточном цитометре, при этом насчитывают не менее 250 базофилов в каждой пробирке. Учет всех пробирок *одного пациента* проводят при абсолютных одинаковых настройках цитофлуориметра с минимальным интервалом времени. Рекомендуется использовать аппаратные возможности проточного цитометра для исключения конгломератов клеток. Идентификацию базофилов осуществляют путем гейтирования моноклеаров на цитограмме прямого и бокового светорассеяния с последующим построением региона CD123⁺HLA-DR⁻ на следующей цитограмме. Показатели дегрануляции базофилов оценивают в регионе базофилов по маркерам CD63 и CD107a. При этом регистрируется процент CD63⁺ и CD107a⁺ клеток в ОК, ПК и пробах с аллергеном.

3.5 Анализ полученных данных

Определяют индексы активации для маркеров дегрануляции CD63 (ИА⁶³) и CD107a (ИА^{107a}) путем расчета соотношения процента CD63⁺ и CD107a⁺ базофилов в пробах с аллергеном к проценту CD63⁺ и CD107a⁺ базофилов в ОК.

Контроль качества исследования заключается в оценке значений

показателя дегрануляции базофилов CD63⁺ в ОК и ПК. В ОК процент спонтанно дегранулировавших CD63⁺ базофилов не должен превышать 10%. Содержание CD63⁺ базофилов в ОК > 10% чаще всего является следствием нарушения условий забора или хранения крови. В данном случае рекомендуется повторить исследование и/или забор крови. ПК считается пройденным в случае, если процент CD63⁺ базофилов $\geq 20\%$. Низкая отвечаемость базофилов в ПК с использованием антитела к IgE (ПК) указывает на то, что в связи с индивидуальными особенностями иммунофункционального состояния базофилов, результаты ТАБ у данного пациента могут быть недостоверны (так называемые «неотвечающие» базофилы). Рекомендуется повторить ТАБ через 1–2 месяца. Алгоритм учета, анализа и интерпретации проб представлен в приложении.

3.6 Интерпретация данных

Значение ИА⁶³ $\geq 2,2$ и/или ИА^{107a} $\geq 1,5$ в пробе с аллергеном (при этом разница в процентном содержании дегранулировавших базофилов в пробах с аллергеном и ОК должна превышать 5%) указывает на то, что аллергическое заболевание у пациента обусловлено реакцией гиперчувствительности немедленного типа на пыльцу исследуемых растений.

4 Противопоказания к применению

Отсутствуют.

5 Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении и пути их устранения

См. инструкцию по применению «Метод диагностики заболеваний и патологических состояний, обусловленных реакциями гиперчувствительности немедленного типа на лекарственные средства из группы противомикробных препаратов для системного применения», рег. № 093–1117, утв. 01.12.2017.

Алгоритм учета проб, анализа и интерпретации результатов

