

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель

министра здравоохранения

_____ В.В. Колбанов

2 марта 2005 г.

Регистрационный № 55-0403

МЕТОД ДИАГНОСТИКИ АЛЛЕРГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ В РЕАКЦИИ АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ

Инструкция по применению

Учреждение-разработчик: Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет

Авторы: канд. мед. наук В.В. Янченко, канд. мед. наук, доц. Л.Р. Выхристенко

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Диагностика тромбоцитозависимых аллергических заболеваний: профилактика анафилактического шока и других аллергических заболеваний.
2. Контроль над иммунотерапией аллергических заболеваний.
3. Разработка, проведение доклинических и клинических испытаний антиаллергических препаратов.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ

1. Центрифуга ОПН-3 (1000-1500 об/мин).
2. Агрегометр AP 2110 (АО НТЦ "СОЛАР", Беларусь).
3. Автоматические дозаторы 20 – 200 мкл.
4. Пластиковые пробирки на 8 мл (10 шт.).
5. Одноразовые пластиковые кюветы на 1 мл (50 шт.).
6. Стеклообразные пробирки на 10 мл (10 шт.).
7. Фольга алюминиевая.
8. Магнитные якоря (50 шт.).

РЕАКТИВЫ

1. Физиологический раствор хлорида натрия на фосфатном буфере (ФСБ) рН 7,2.
2. Адреналина гидрохлорид 0,1 % - 1 мл или Адреналина гидротарtrat 0,18 % - 1 мл.
3. Стандартные аллергены (домашняя пыль - 4,5 мл 10 000 PNU/мл, клещ, перо подушки и другие).
4. Цитрат натрия.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Кровь для исследования в количестве 10,0 мл берут утром, натощак, пунктируя иглой локтевую вену (самотёком) в 2 пластмассовые пробирки (по 5 мл в каждую), содержащие по 0,5 мл 3,8 % раствора цитрата натрия для предупреждения свёртывания. Сначала кровь центрифугируют 15 мин при 1000

об/мин, после чего забирают по 0,4 мл тромбоцитной плазмы в пластмассовые кюветы на каждое исследование, а оставшуюся кровь снова центрифугируют 15 мин, но уже при 1500 об/мин. После второго центрифугирования отсасывают весь верхний слой - безтромбоцитную плазму, которую используют для калибровки шкалы оптической плотности прибора и, при необходимости, для разведения богатой тромбоцитами плазмы до стандартного содержания клеток, которое для достоверного исследования должно составлять не менее 200×10^9 клеток/л. Агрегометр автоматически подсчитывает количество тромбоцитов в пробе.

Агрегацию тромбоцитов исследуют на агрегометре AP 2110 (АО НТЦ “СОЛАР”, Беларусь). Условия проведения реакции: температура 37 °С и постоянная скорость перемешивания в интактной среде (одноразовые пластиковые кюветы).

Таблица

Приготовление растворов агрегантов

Растворы	Разведение	Конечная концентрация в смеси теста
Адреналин-5 (0,1 мл 0,1 % адреналина гидрохлорида + 9,9 мл 0,9 % натрия хлорида)	1:100 10 мкг/мл	1 мкг/мл, или $5 \times 10^{-6}M$
Адреналин-2,5 (0,5 мл Адреналин-5 + 0,5 мл 0,9 % натрия хлорида)	1:200 5 мкг/мл	0,5 мкг/мл или $2,5 \times 10^{-6}M$
Стандартный	1:100	10 PNU/мл

аллерген 10000 PNU/мл (0,1 мл аллергена + 9,9 мл 0,9 % натрия хлорида)	100 PNU/мл	
--	------------	--

ХОД ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Пластмассовую кювету с 0,5 мл безтромбоцитной плазмы помещают в прибор AP 2110 и устанавливают уровень 100 %. Вынимают кювету из прибора.

2. Тест № 1. В пластмассовую кювету с 0,4 мл тромбоцитарной плазмы опускают магнитный якорь и помещают кювету в прибор. Добавляют 0,05 мл физиологического раствора и измеряют агрегацию тромбоцитов в течение 30 с. Убедившись в отсутствии спонтанной агрегации, добавляют в кювету 0,05 мл Адреналин-2,5 и измеряют агрегацию тромбоцитов в течение 10 мин. Сохраняют результаты измерения в компьютере и вынимают кювету из прибора.

3. Тест № 2. В пластмассовую кювету с 0,4 мл тромбоцитарной плазмы опускают магнитный якорь и помещают кювету в прибор. Добавляют 0,05 мл исследуемого стандартного аллергена в разведении 1:100 и измеряют агрегацию тромбоцитов в течение 30 с. Убедившись в отсутствии спонтанной агрегации, добавляют в кювету 0,05 мл Адреналин-2,5 и измеряют агрегацию тромбоцитов в течение 10 мин. Сохраняют результаты измерения в компьютере и вынимают кювету из прибора.

Интерпретация результатов метода

а) уменьшение времени завершения агрегации тромбоцитов в тесте № 2 на 16 % и более по сравнению с агрегацией без аллергена (тест № 1) указывает на сенсibilизацию (аллергию);

б) увеличение скорости агрегации за 30 с (% в мин) в тесте № 2 на 20 % и более по сравнению с тестом № 1 указывает на сенсibilизацию (аллергию);

в) развитие агрегации в тесте № 2 под влиянием только одного аллергена (вещества, не являющегося индуктором агрегации) указывает на сенсibilизацию (аллергию).

Реакция может быть ложно отрицательной, если в тесте № 1 регистрируется однофазная гиперагрегационная кривая.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Метод применяется в условиях *in vitro* и не имеет противопоказаний.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Ежедневный контроль качества

Агрегометр тромбоцитов AP 2110 автоматически подсчитывает количество тромбоцитов в пробе. Для достоверного исследования содержание тромбоцитов в плазме, подготовленной к исследованию, должно составлять не менее 200×10^9 клеток/л, а количество тромбоцитов одного больного, внесённое в кюветы для исследований, не должно отличаться более чем на 5 %. При выполнении каждого исследования проводить дублирование проб пациента. Различия между дублями в показателях агрегаторгамм (степень агрегации тромбоцитов в %; время агрегации, сек; скорость за 30 с, % в мин) должны быть не более 4 %.

Периодический контроль качества

Сопоставление результатов анализа с данными, полученными другими методами *in vitro* и *in vivo* диагностики.

Таблица

ХРОНОМЕТРАЖ ИССЛЕДОВАНИЙ

с использованием одного прибора AP 2110 (АО НТЦ “СОЛАР”, Беларусь)

	Процедура	Время, мин	
		1 проба	10 проб
1.	Приготовление растворов агрегантов, подготов-	8	10

	ка прибора и кювет		
2.	Установка в центрифугу и центрифугирование пробирок с кровью для получения плазмы, обогащенной тромбоцитами.	17	18
3.	Отсасывание плазмы, обогащенной тромбоцитами, и перенос её в пластмассовые кюветы	1	6
4.	Установка в центрифугу и центрифугирование пробирок с кровью для получения безтромбоцитной плазмы	17	18
5.	Отсасывание безтромбоцитной плазмы и перенос её в пластмассовые кюветы	1	6
6.	Калибровка шкалы прибора и приготовление необходимого для исследования разведения тромбоцитов	4	20
7.	Проведение реакции агрегации тромбоцитов	11	110
8.	Внесение результатов в компьютерную базу данных	1	7
9.	Распечатка результатов исследования на принтере	1	10
10.	Выдача заключения по результатам исследования	1	10
Всего		52	215