

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра
Д.Л. 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

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д. Л. Пиневич

16.03.2018

Регистрационный № 011-0118

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

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

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

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 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.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Оборудование:

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

Изделия медицинского назначения:

- 1) наконечники пластиковые на 1–5; 0,1–1,0; 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.

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.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

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

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

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 до 26 °С не более 4 ч.

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 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 до 8 °С.

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 (-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 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 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.

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 мононуклеаров 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.

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 ≥ 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 (т.н. «неотвечающие» базофилы). Рекомендуется повторить ТАБ через 1–2 мес. Алгоритм учета, анализа и интерпретации проб представлен в приложении.

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.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Указан в инструкции 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

