

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖАЮ  
Первый заместитель Министра  
Д.Л. Пиневич  
2015г.

Регистрационный номер № 046-0615

МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К  
ТОКСИКАНТАМ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ БОЛЕЗНЯХ НИЖНИХ  
ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ  
(инструкция по применению)

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов  
медицинский университет»

АВТОРЫ:

к.м.н., доцент Смирнова О.В., д.м.н., профессор Нозиков Д.К., д.м.н.,  
профессор Новиков П.Д.

Витебск, 2015

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д.Л. Пиневич  
18.06.2015  
Регистрационный № 046-0615

**МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ  
К ТОКСИКАНТАМ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ БОЛЕЗНЯХ НИЖНИХ  
ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Витебский государственный ордена  
Дружбы народов медицинский университет»

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доц. О.В. Смирнова, д-р мед. наук, проф.  
Д.К. Новиков, д-р мед. наук, проф. П.Д. Новиков

Витебск 2015

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод, который позволяет повысить эффективность диагностики хронических обструктивных заболеваний легких путем определения повышенной чувствительности лейкоцитов пациентов к токсикантам (сигаретному дыму, выхлопным газам двигателей и др.).

Инструкция предназначена для врачей-пульмонологов, врачей-аллергологов-иммунологов, других врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с хроническими обструктивными заболеваниями легких.

### **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

1. Центрифуга (500–1500 об./мин).
2. Стерильные одноразовые шприцы до 20 мл (2–3 шт.).
3. Стерильные пробирки 10–20 мл (20–30 шт.).
4. Стерильные пробирки 10–20 мл с плотно закрывающейся крышкой (10 шт.).
5. Стерильные стеклянные прозрачные трубки диаметром 5–8 мм, длиной 10–20 см (1–2 шт.).
6. Стерильный стеклянный флакон 500 мл (1–2 шт.).
7. Поливиниловая трубка диаметром 5–8 мм, длиной 20 см (15 шт.).
8. Термостат.
9. Холодильник.
10. Автоматические дозаторы 20–200 мкл.
11. Планшеты полистироловые для иммуноферментного анализа (ИФА).
12. Автоматический ИФ-анализатор.

#### **Реактивы**

1. Физиологический раствор хлорида натрия на фосфатном буфере (ФСБ), рН 7,2, или раствор Хенкса.
2. Лизирующий раствор: 0,84% раствор хлористого аммония (в случаях малого количества крови для полного лизиса эритроцитов).
3. Фосфат-цитратный буферный раствор с рН = 5,0.
4. Перекись водорода 0,015% раствор.
5. Хромоген: тетраметилбензидин (ТМБ) или ортофенилендиамин (ОФД).
6. Серная кислота 4%.
7. Физиологический раствор хлорида натрия 0,9%.
8. Модельный раствор, имитирующий действие токсикантов.

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Хронические обструктивные заболевания легких: хроническая обструктивная болезнь легких, бронхиальная астма.

## **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Метод применяется в условиях *in vitro*; абсолютных и относительных противопоказаний нет.

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

1. Подготовка клеток пациента для постановки реакции выброса миелопероксидазы.

1.1. Получение лейкосуспензии. Берут венозную кровь пациента в пробирку с гепарином (20 ед. на 1 мл крови). В зависимости от количества проб с токсикантами достаточно от 3 до 10 мл крови. Кровь отстаивают в узких пробирках до момента четкого отделения эритроцитов от плазмы (не переставать — осядут лейкоциты). Плазму с лейкоцитами забирают, центрифугируют при 1000 об./мин 5 мин. Плазму удаляют. К осадку лейкоцитов добавляют 8–10 мл лизирующего эритроциты 0,84% (37°C) раствора хлористого аммония. Ресуспензируют и снова центрифугируют. Затем полученную лейкосуспензию отмывают не менее трех раз стерильным физиологическим раствором ФСБ.

1.2. Разведение клеток в лейкосуспензии должно быть от  $6 \times 10^6$  до  $9 \times 10^6$  кл/мл.

2. Подготовка токсикантов.

В реакции используют модельные растворы, имитирующие действие токсикантов (сигаретный дым, выхлопные газы двигателей внутреннего сгорания).

2.1. Для приготовления экстракта используют одну сигарету и 5,0 мл стерильного физиологического раствора натрия хлорида 0,9%. Сигарету измельчают, заливают стерильным физиологическим раствором, настаивают 24 ч при комнатной температуре. Затем настой фильтруют. Маточный раствор готов. Непосредственно перед постановкой теста маточный раствор разводят 1:100 стерильным физиологическим раствором натрия хлорида 0,9%.

2.2. Для приготовления раствора сигаретного дыма используют стерильную пробирку на 10 мл с плотно закрывающейся крышечкой. В пробирку вносят 5 мл стерильного физиологического раствора и опускают на дно пробирки стеклянную стерильную трубку. Через трубку выдыхают под давлением сигаретный дым при выкуривании одной сигареты. Пробирку с раствором плотно закрывают пробкой.

2.3. Для приготовления раствора выхлопных газов во время работы двигателя внутреннего сгорания газы из выхлопной трубы по поливиниловым

трубкам поступают в стерильный стеклянный флакон с 500 мл физиологического раствора в течение 5 мин. Маточный раствор готов. Непосредственно перед постановкой теста маточный раствор разводят 1:100 стерильным физиологическим раствором.

### 3. Ход реакции:

- в круглодонные лунки иммунологических планшет вносят 0,1 мл (100 мкл) раствора токсикантов и добавляют равный объем лейкосуспензии. Пробы дублируют. Параллельно ставятся холостые пробы лейкосуспензии со стерильным физиологическим раствором натрия хлорида 0,9% (отрицательный контроль);

- смесь инкубируют 45 мин при 37°C;

- центрифугируют на планшеточной центрифуге в течение 10 мин при 1500 об./мин;

- из каждой лунки круглодонной планшеты осторожно (чтобы не поднять клетки) забирают 50 мкл надосадочной жидкости и переносят в лунку (под тем же номером) полистиролового планшета для ИФА;

- внесение проявляющего раствора. Во все лунки планшеты для ИФА к надосадочной жидкости добавляют по 150 мкл хромоген-субстратной смеси (0,015% перекись водорода и ТМБ или ОФД, разведенные фосфат-цитратным буфером с рН = 5,0). Проявляющий раствор готовят непосредственно перед внесением;

- инкубируют при комнатной температуре в течение 15–25 мин до появления выраженного окрашивания синего цвета;

- реакцию останавливают внесением 50 мкл 4% серной кислоты, цвет раствора изменяется на желтый.

### 4. Учет результатов.

Оценку реакции проводят на фотометре при длине волны 450 нм.

*Примечание:* Отрицательный контроль — оптическая плотность в отрицательной лунке не должна превышать 0,300 оптические единицы.

Положительной реакция считается при превышении оптической плотности опытной пробы над таковой отрицательного контроля не менее чем на 6% в реакциях с растворами сигаретного дыма, 32% — выхлопных газов и 109% — с экстрактом из сигареты.

## **ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

Интенсивное окрашивание в лунке отрицательного контроля:

1. Не допускать взбалтывания при переносе надосадочной жидкости.

2. Не допускать очень густой лейкосуспензии более  $9 \times 10^6$  кл/мкл (в этом случае все лунки опытных проб будут неодинаково окрашены).