

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Р.А. Часнойть
6 марта 2008 г.
Регистрационный номер 081-0907

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ
К АНТИГЕНАМ И АЛЛЕРГЕНАМ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ
ЗАБОЛЕВАНИЙ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Витебский государственный
медицинский университет»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. Д.К. Новиков, д-р мед. наук, проф. В.И.
Новикова, канд. мед. наук, доц. В.В. Янченко, канд. мед. наук, доц. Л.Р.
Выхристенко, канд. мед. наук Н.Д. Титова

Витебск 2008

Для иммунодиагностики заболеваний используется определение антител и антигенов. Однако первые появляются поздно, а вторые исчезают из крови и биожидкостей достаточно быстро.

Сенсибилизация лимфоцитов к антигенам выявляется уже через 2–4 суток после контакта с ними. Попытки использовать ее выявление для диагностики осложнялись отсутствием достаточно простых и доступных методов. В реакции бласттрансформации сенсибилизация лимфоцитов выявлялась ко многим причинно-значимым антигенам через 2–4 суток, а в реакции ингибиции миграции через 18 ч культивирования лимфоцитов с антигенами и аллергенами.

Известно, что достаточно быстро после контакта с антигенами на поверхности сенсибилизированных лимфоцитов усиливается экспрессия рецепторов, в частности, рецепторов к ИЛ-2 (рИЛ-2). На некоторые антигены это происходит через 2–8 ч. Для выявления этих рецепторов обычно используют моноклональные антитела к CD25 молекуле (α -цепь рецептора ИЛ-2), появляющейся после активации. Еще более эффективно его выявление по связыванию рекомбинантного ИЛ-2 (rИЛ-2).

Инструкция основывается на использовании обоих методов, но с предпочтением выявления активации лимфоцитов. Метод позволяет определять сенсибилизацию лимфоцитов к антигенам и аллергенам при бактериальных, паразитарных инфекциях и аллергии.

Использование предлагаемого метода имеет определенные преимущества: простота метода, экономия реактивов, по чувствительности не уступает методу оценки активационного CD25-рецептора с использованием проточного цитометра. Предлагаемым методом можно оценивать сенсибилизацию лимфоцитов к различным антигенам и аллергенам. Перед методом иммунофлюоресценции с учетом на люминесцентном микроскопе или на проточном цитометре имеет преимущество в низкой стоимости оборудования для учета при одинаковой чувствительности и поэтому является более подходящим методом для любой клинической лаборатории в настоящее время. Экономическая эффективность предложенного метода представлена в таблице.

Таблица

Экономическая эффективность метода оценки сенсибилизации лимфоцитов

Параметры	Предлагаемый метод	Проточная цитометрия	Люминесценция
Стоимость реагентов для проведения 100 исследований	5 \$	30\$	25\$
Стоимость оборудования для учета результата	300\$	100 000\$	3 000\$
Средняя стоимость 100 исследований с учетом всех затрат	10,1\$	54,5\$	25,4\$
Сопоставление стоимости исследования с учетом всех затрат, %	100%	545%	253%

Применение комплекса методов позволит улучшить диагностику иммунопатологии, сопровождаемой бактериальными, паразитарными инфекциями и аллергией.

Область применения и уровень внедрения: диагностика всех видов иммунопатологии, сопровождаемой инфекционными синдромами, аллергические болезни. Лаборатории городских и областных лечебно-профилактических учреждений.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Центрифуга (1000 об./мин).
2. Камера Горяева или Солар.
3. Стеклообразные центрифужные пробирки — 10 мл (100 шт.).
4. Термостат.
5. Автоматические дозаторы 20–200 мкл.
6. Микроскоп с иммерсионным увеличением.
7. Предметные стекла (100 шт.).
8. Физиологический раствор хлорида натрия на фосфатном буфере (ФСБ) pH = 7,2 или раствор Хенкса.
9. Среда 199 или RPMI.
10. Азур-эозин по Романовскому.
11. Рекомбинантный ИЛ-2 («ронколейкин»).
12. Моноклональные антитела анти-CD25 меченные и/или немеченные ФИТЦ.
13. Эритроциты барана (латекс).
14. Антигены, аллергены (для конкретного заболевания).

Реактивы № 4–6 можно заменить готовым диагностикумом «гИЛ-2-частица».

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Все виды иммунопатологии. Инфекции, первичные и вторичные иммунодефицитные болезни с клиникой инфекций, аллергические заболевания. Контроль терапии заболеваний, состояния иммунитета. Разработка и проведение доклинических и клинических испытаний иммуностимулирующих препаратов.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

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

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПОСОБА

Для выявления рецепторов к ИЛ-2 (ИЛ-2R) на лимфоцитах человека применяют рекомбинантный ИЛ-2 — ронколейкин, связанный с частицами. Используют ронколейкин (с альбумином и без), который сорбируют на

фиксированных и активированных эритроцитах барана или частицах латекса. Специфичность взаимодействия диагностикума «ронколейкин-частица» с рецептором для ИЛ-2 (ИЛ-2R) подтверждена опытами блокировки связывания.

Приготовление диагностикума «гИЛ-2-частицы»: сорбция в течение 2 ч рекомбинантного ИЛ-2 500 000 ЕД на 1 мл активированных глутаровым альдегидом эритроцитов барана, затем двукратное отмывание 0,9% раствором NaCl. Используется также готовый диагностикум по заказу. Он должен удовлетворять критериям специфичности: повышать число выявляемых лимфоцитов с ИЛ-2 рецептором после стимуляции их *in vitro* ФГА, выявлять снижение количества открываемых клеток в присутствии экзогенного свободного ИЛ-2. Оптимальные условия проведения реакции розеткообразования лимфоцитов с препаратом «гИЛ-2-частицы» следующие: инкубация при 37°C 30 мин, соотношение лимфоцит : эритроцит – 1:25; их нарушение приводит к увеличению неспецифических адгезивных свойств диагностикума.

Для выявления рецепторов к ИЛ-2 могут использоваться другие методы: фенотипирование лимфоцитов с помощью частиц, покрытых моноклональными антителами к CD25; проточная цитометрия или иммунофлюоресценция с мечеными моноклональными антителами.

Для приготовления стабильных моноклональных анти-CD25-диагностикумов используют 2-х этапный метод. Активированные эритроциты или частицы латекса покрывают антителами против иммуноглобулинов мышей, а затем моноклональными антителами (мАТ) против CD25-антигена.

При отсутствии технических возможностей изготовления диагностикумов используют готовые их препараты.

Ход реакции:

I. Получение лейкосуспензии: 5–10 мл крови берут из вены в пробирку с гепарином (20 ед. на 1 мл крови) и отстаивают в узких пробирках до момента четкого отделения эритроцитов от плазмы. Плазму с лейкоцитами отсасывают, центрифугируют при 1000 об./мин 5 мин. Плазму отсасывают. К осадку лейкоцитов добавляют 10 мл раствора, лизирующего эритроциты (0,84% раствор хлористого аммония при 37°C). Ресуспензируют и снова центрифугируют. Полученную лейкосуспензию отмывают не менее трех раз стерильным физиологическим раствором на фосфатном буфере. Затем суспензию лейкоцитов разводят в зависимости от исходного уровня лейкоцитов крови в среде для культивирования в объеме, равном исходному объему плазмы крови.

Используют среды: RPMI-1640, Игла; 199. Антигены и аллергены должны быть без консервантов и в оптимальных дозах (PPD 2–10 мкг/мл, антиген кандид 1:4000, в бактериальные и паразитарные (токсокар) антигены и белки 1–100 мкг/мл, аллергены — 100 PNU/мл). Состав среды

культивирования, присутствие белков, особенности техники реакции существенно влияют на конечный результат.

II. К 0,05 (0,1) мл суспензии лейкоцитов крови, приготовленных в среде, (2 млн/мл) добавляют равный объем антигена или аллергена в рабочем разведении; контроли — без аллергена (раствор + лейкоциты) и с несенсибилизирующими, «интактными» антигенами. Пробы дублируют. Инкубируют 12 ч с бактериальными и паразитарными (токсокар) антигенами или 8 и 24 ч при бытовой и другой аллергии при 37°C. Затем к разным опытным и контрольным пробам добавляют по 0,05–0,1 мл гИЛ-2-диагностикума или анти-CD-25-диагностикума (суспензия частиц, покрытая моноклональными антителами), инкубируют 15 мин при 37°C. Центрифугируют при 500–1000 об./мин 3 мин и ставят на 1 ч или на ночь при 4°C в холодильник. Затем надосадочную жидкость сливают (встряхивают, перевернув планшет, или отсасывают), а к осадку добавляют 0,025 мл 0,12% раствора глутарового альдегида и осторожно ресуспензируют (без пены), делают мазок примерно на 1 см² площади обезжизненного предметного стекла (монослой клеток на ровной поверхности). Высушивают, фиксируют спиртом и окрашивают по Романовскому (2–3 мин) или галлоцианин-эозином так, чтобы четко были видны ядра лейкоцитов. Подсчитывают процент розеткообразующих лимфоцитов, явно связавших не менее 3-х эритроцитов «гИЛ-2-частицами» или с CD25-антителами. Гранулоциты не учитывают. Увеличение их количества на 10% и более по сравнению с контролем указывает на сенсибилизацию лимфоцитов к антигену-аллергену. Прирост на 5–9% — результат сомнительный; менее 5% — отрицательный.

Хронометраж метода

Процедура	Время, мин	
	1 проба	10 проб
Отстаивание крови в пробирке до момента четкого отделения эритроцитов от плазмы	45	45
Отсасывание плазмы с лейкоцитами и перенос в центрифужную пробирку	0,5	2,5
Установка в центрифугу и центрифугирование	5,5	6
Добавление к осадку лейкоцитов суспензии аллергена	0,5	5
Инкубация лейкоцитов	5	5
Установка в центрифугу и центрифугирование	5,5	6
Отсасывание надосадочной жидкости и добавление к осадку лейкоцитов физиологического раствора, ресуспензирование	0,5	5
Установка в центрифугу и центрифугирование	5,5	6
Добавление к осадку лейкоцитов диагностикума ИЛ-2, инкубация	0,5	5
Установка в центрифугу и центрифугирование	5,5	6

Отсасывание надосадочной жидкости и добавление к осадку лейкоцитов физиологического раствора, ресуспензирование	0,5	5
Установка в центрифугу и центрифугирование	5,5	6
Отсасывание надосадочной жидкости и добавление к осадку лейкоцитов суспензии диагностикума	0,5	5
Подсчет количества лейкоцитов в камере Горяева	5	50
Разведение суспензии	0,5	5
Разведение аллергена	0,5	5
Постановка холостой пробы	0,5	2
Установка в термостат и инкубация	45	45
Установка в центрифугу и центрифугирование планшеты или микропробирки	10	10
Перенос суспензии из микропробирок и/или круглодонной планшеты	1	10
Приготовление мазков	2	2
Высушивание мазков	0,5	2
Окраска – ↓	15	15
Оценка реакции	0,5	5
Всего	161	258,5

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

1. Использование отрицательного контроля на специфичность при постановке реакции — отсутствует розеткообразование после блокировки лимфоцитов ИЛ-2, отсутствует прирост ИЛ-2R⁺-лимфоцитов при инкубации без аллергена и с «инертным» аллергеном.

2. Контроль положительной реакции. При визуальной оценке у здоровых результаты равны норме, а качество мазков хорошее. При отличии опытной пробы от контрольной пробы менее чем на 5% результат считается идентичным.