

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра

_____ Д.Л. Пиневиц

«16» декабря 2016 г.

Регистрационный № 088-1116

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТАДИИ ИММУНОДЕПРЕССИИ
У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

Учреждение образования

«Гродненский государственный медицинский университет»,

Государственное учреждение

«Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ:

д.м.н., доцент Н. В. Матиевская, д.м.н., профессор В. М. Цыркунов,

к.м.н. А. Е. Гончаров, И. О. Токунова.

Гродно 2016

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц
16.12.2016
Регистрационный № 088-1116

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТАДИИ ИММУНОДЕПРЕССИИ
У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: УО «Гродненский государственный медицинский университет», ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, доц. Н.В. Матиевская, д-р мед. наук, проф. В.М. Цыркунов, канд. мед. наук А.Е. Гончаров, И.О. Токунова

Гродно 2016

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод определения стадии иммунодепрессии у ВИЧ-инфицированных пациентов, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение ВИЧ-инфекции.

Инструкция предназначена для врачей-инфекционистов, врачей-лаборантов и иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь ВИЧ-инфицированным пациентам.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Оборудование:

- проточный цитофлуориметр (минимум 4 канала флуоресценции);
- центрифуга низкоскоростная (1000–3000 об./мин);
- шейкер орбитальный;
- весы лабораторные;
- автоматические дозаторы на разные объемы;
- контейнеры для хранения и транспортировки пробирок с кровью;
- штативы для пробирок;
- мерные колбы для приготовления растворов;
- емкости для хранения и дезинфекции отработанного биологического материала.

Расходные материалы:

- наконечники пластиковые с аэрозольным барьером объемом 1–5; 0,01–0,1; 0,1–1,0 и 0,5–10 мл;
- пробирки для цитофлуориметра;
- вакутайнеры с ЭДТА.

Реагенты:

- моноклональные антитела к антигенам человека: CD4, CD45, CD184, CD195;
- неорганические соли (натрия фосфат двузамещенный двенадцативодный, натрия хлорид, калия фосфат однозамещенный безводный, калия хлорид, калия гидрокарбонат, аммония хлорид);
- тетранатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты;
- параформальдегид;
- вода аналитического качества.

Панели антител подбирают таким образом, чтобы антитела к CD184 и CD195 были конъюгированы с наиболее яркими из доступных флуорохромов: Brilliant Violet 421, фикоэритрином (PE), аллофикоцианином (APC), тандемом фикоэритрина и Cy7 (PE-Cy7). Антитела к молекулам CD4 и CD45 могут быть конъюгированы с любым другим флуорохромом, который позволяет четко идентифицировать позитивную/негативную популяцию клеток, и требует минимальной спектральной компенсации. Для уточнения списка флуорохромов, пригодных для использования, см. инструкцию по эксплуатации проточного цитофлуориметра.

К примеру, может быть предложена следующая панель антител: CD4 FITC, CD184 PE, CD45 PerCP-Cy5.5, CD195 APC.

Приготовление растворов

Растворы готовят согласно приведенным ниже прописям и хранят до использования при температуре от 2 до 8 °С в течение не более 1 мес.

Лизирующий раствор (10× раствор, 100 мл):

- аммония хлорид — 8,29 г;
- калия гидрокарбонат — 1,0 г;
- тетранатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты — 0,37 г;
- воды аналитического качества до 100 мл.

Фиксирующий раствор (1× раствор, 100 мл):

- параформальдегид — 4,0 г;
- калия фосфат однозамещенный безводный — 0,2 г;
- хлорид калия — 0,2 г;
- натрия фосфат двузамещенный двенадцативодный — 2,9 г;
- натрия хлорид — 8,0 г;
- воды аналитического качества до 100 мл.

Средства индивидуальной защиты и дезинфектанты:

- лабораторный халат;
- латексные или нитриловые перчатки;
- дезинфицирующий раствор, предназначенный для обработки рук персонала;
- дезинфицирующий раствор для инактивации биологического материала.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Установленный диагноз ВИЧ-инфекции.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Забор, транспортировка и хранение материала, анализ данных осуществляется общепринятыми методами.

Интерпретация данных

Определяется показатель соотношения экспрессии хемокиновых рецепторов CXCR4 (CD184)⁺/CCR5 (CD195)⁺ на лимфоцитах крови.

В случае, если показатель равен 0,4 или ниже, у ВИЧ-инфицированного пациента определяется стадия выраженной иммунодепрессии, независимо от клинических проявлений заболевания и содержания CD4⁺ лимфоцитов.

Если у пациента определяется стадия выраженной иммунодепрессии, принимается управленческое решение:

- назначается антиретровирусная терапия независимо от уровня CD4⁺ лимфоцитов и клинических проявлений заболевания;
- проводится профилактика оппортунистических инфекций.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Проблема	Возможная причина	Пути устранения
Анализ иммунофенотипа: слабая интенсивность свечения, плохое разделение популяций	Недостаточное количество антител	Добавить достаточное количество антител
	«Выгорание» флуорохромов	Инкубация клеток в темноте, сведение времени манипуляций с клетками к минимуму
	«Тусклые» флуорохромы	Использовать наиболее яркие флуорохромы (BV421, PE, APC, PE-Cy7)
	Недостаточное смешивание антител с пробой	Тщательно смешивать антитела с клетками
Высокая фоновая флуоресценция	Некорректно выполненная настройка цитометра	Настраивать цитофлуориметр согласно инструкции по эксплуатации
	Клетки не отмыты от антител	Тщательно отмывать клетки в буфере для окрашивания
	Некачественные антитела	Использовать другие антитела
Чрезмерные потери клеток	Некорректно выполненная настройка цитометра	Настраивать цитофлуориметр согласно инструкции по эксплуатации
	Недостаточное время центрифугирования	Соблюдать время центрифугирования
	Непригодные растворы, длительное время инкубации	Правильно удалять супернатант
Недостаточный лизис эритроцитов	Неправильно приготовленный раствор	Следовать пунктам инструкции
	Некорректный температурный режим	Строгое соблюдение правил подготовки раствора
	Недостаточное перемешивание	Лизис при комнатной температуре
		Двукратное перемешивание на шейкере

название

учреждения

Здравоохранения

УТВЕРЖДАЮ
Главный врач

_____ 201 ____
МП

И.О.Фамилия

А К Т

учёта практического использования инструкции по применению

1. Инструкция по применению: «Метод диагностики стадии иммунодепрессии у ВИЧ-инфицированных пациентов».

2. Утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь
№ _____

3. Кем предложена разработка: сотрудниками кафедры инфекционных болезней УО «Гродненский государственный медицинский университет» доцентом Н. В. Матиевской, профессором В. М. Цыркуновым, заведующим лабораторией иммунологии и клеточной биотехнологии ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» А. Е. Гончаровым, И. О. Токуновой.

4. Материалы инструкции использованы для _____

5. Где внедрено: _____

_____ подразделение и название учреждения здравоохранения
6. Результаты применения метода за период с _____
по _____

общее кол-во наблюдений «_____»

положительные «_____»

отрицательные «_____»

7. Эффективность внедрения (восстановление трудоспособности, снижение заболеваемости, рациональное использование коечного фонда, врачебных кадров и медицинской техники) _____

8. Замечания, предложения: _____

_____ 201 ____ Ответственные за внедрение

Должность подпись И.О.Фамилия

Примечание: акт о внедрении направлять по адресу:
кафедра инфекционных болезней
УО «Гродненский государственный медицинский университет»
ул. Горького, 80, 230009, г. Гродно