

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л.Пиневиц

2018 г.

Регистрационный № 100-0918



**МЕТОД ОЦЕНКИ ИММУННОГО СТАТУСА ПАЦИЕНТОВ
С ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ ПОЧЕК ПРИ ОРГАННОЙ
ТРАНСПЛАНТАЦИИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический
центр радиационной медицины и экологии человека»

АВТОРЫ: канд. мед. наук С. В. Зыблева, канд. мед. наук, доц. С. Л. Зыблев, д-р
мед. наук, доц. А. В. Рожко, О. П. Логинова, М. Г. Шитикова, канд. мед. наук,
доц. А. В. Величко

Гомель 2018

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д. Л. Пиневиц
30.11.2018
Регистрационный № 100-0918

**МЕТОД ОЦЕНКИ ИММУННОГО СТАТУСА ПАЦИЕНТОВ
С ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ ПОЧЕК ПРИ ОРГАННОЙ
ТРАНСПЛАНТАЦИИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический
центр радиационной медицины и экологии человека»

АВТОРЫ: канд. мед. наук С. В. Зыблева, канд. мед. наук, доц. С. Л. Зыблев, д-р
мед. наук, доц. А. В. Рожко, О. П. Логинова, М. Г. Шитикова, канд. мед. наук,
доц. А. В. Величко

Гомель 2018

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод оценки иммунного статуса пациентов с хронической болезнью почек при органной трансплантации с использованием лимфоцитарного диагностикума, полученного из лимфатических узлов донора почечного трансплантата. Данный метод может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику иммунологической сенсибилизации к антигенам донора. Предназначена для врачей-специалистов: врачей-трансплантологов, врачей-иммунологов, врачей лабораторной диагностики, врачей-нефрологов и иных специалистов, оказывающих медицинскую помощь пациентам с хронической болезнью почек в стационарных условиях при трансплантации почки.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Набор инструментов для диссекции тканей (пинцет, ножницы).
2. Стерильный контейнер.
3. Раствор хлорида натрия 0,9 %.
4. Бумажный фильтр стерильный с диаметром пор 25 мкм.
5. Раствор PBS.
6. Наборы моноклональных антител.
7. Лизирующий раствор с 3,4 % формальдегида.
8. Дистиллированная вода.
9. Пробирки для проточного цитофлюориметра.
10. Пробирки стерильные объемом 10 мл.
11. Стерильная пипетка.
12. Стекланный гомогенизатор.
13. Центрифуга лабораторная.
14. Вортекс.
15. Одноканальные дозаторы переменного объема 1–5, 2–20, 10–100, 100–1000 мкл.
16. Наконечники 1–200, 100–1 000 мкл.
17. Лазерный проточный цитофлюориметр.
18. Среда RPMi-1640 с глутамином.
19. Фитогемагглютинин (ФГА).

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Оценка иммунного статуса у пациентов с хронической болезнью почек (N18) при трансплантации почки.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Этапы исследования:

1. Получение лимфоцитарного диагностикума:

1.1. Во время операции трансплантации почки на этапе подготовки трансплантата к пересадке выделяют из донорского материала парааортальные лимфатические узлы и помещают в стерильный контейнер.

1.2. Лимфатические узлы, доставленные в лабораторию, доводят до однородной массы в 5 мл стерильного физиологического раствора стеклянным гомогенизатором с целью максимального сохранения клеточных структур. Для удаления крупнодисперсных частиц полученный образец пропускают через стерильный бумажный фильтр с диаметром пор 25 мкм.

1.3. Взвесь полученных клеток отмывается двукратно в растворе PBS методом центрифугирования. В промаркированные пробирки для проточного цитометра с внутренним мыском вносят 100 мкл клеточной взвеси и добавляют моноклональные антитела, меченные различными флюорохромами, согласно панели исследования в объемах, рекомендованных фирмой-производителем с определением количества Т-лимфоцитов и их субпопуляций ($CD3^+$ клетки) и В-лимфоцитов ($CD19^+$ клетки), а также активационных маркеров указанных популяций лимфоцитов.

1.4. Образцы перемешивают на вортексе и инкубируют 20 мин в темноте при комнатной температуре. После инкубации в пробирки вносят по 100 мкл лизирующего раствора, содержащего 3,4 % формальдегида.

1.5. Тщательно перемешанные на вортексе образцы инкубируют 10 мин в темноте при комнатной температуре. В пробирки вносят по 1 мл дистиллированной воды. Образцы перемешивают на вортексе и инкубируют 10 мин при комнатной температуре без доступа света, затем исследуют на проточном цитофлюориметре.

1.6. Отбирают образцы суспензии с количеством Т-лимфоцитов ($CD3^+$ клетки) не менее 40,8 %, В-лимфоцитов ($CD19^+$ клетки) не менее 29,4 %.

2. Культивирование:

2.1. Забор крови из вены у пациента производят в количестве 5–10 мл в пробирку с гепарином (25 ЕД/мл). Пробирка с кровью должна быть доставлена в лабораторию в течение 2 ч.

2.2. Содержимое пробирки осторожно перемешивают и оставляют на 60 мин в термостате при 37 °С для осаждения эритроцитов.

2.3. После инкубации в термостате надосадочный слой плазмы, обогащенный лейкоцитами, отбирают в отдельную стерильную пробирку и определяют количество лейкоцитов в 1 мл.

2.4. Далее взвесь лейкоцитов разводят питательной средой RPMi-1640 с глутамином таким образом, чтобы в 1 мл содержалось 1–2 млн лейкоцитов, 20 % аутологичной плазмы и 80 % культуральной среды.

Полученную смесь помещают в 3 стерильные пластиковые флакона объемом по 5 мл для культивирования в течение 3 дней:

контрольную реакцию проводят культивированием в среде № 1: RPMi-1640 с глутамином в термостате при 37 °С;

в среде № 2: RPMi-1640 с глутамином и 0,1 мл лимфоцитарного диагностикума;

в среде № 3: RPMi-1640 с глутамином и 0,1 мл ФГА.

После завершения культивирования производят иммунофенотипирование клеточных взвесей из всех образцов (этап 3).

3. Этап иммунофенотипирования лимфоцитов после культивирования с ФГА, донорским лимфоцитарным диагностикумом:

3.1. Двукратная отмывка клеточной взвеси в стандартном растворе PBS методом центрифугирования (по 5 мин, при 250 g и комнатной температуре).

3.2. Супернатант удаляют, добавляют 400 мкл стандартного раствора PBS, клеточную взвесь перемешивают вихревым смесителем.

3.3. Пробирки для проточного цитометра маркируют согласно панели исследования. В каждую пробирку вносят МАТ в объемах, рекомендованных фирмами-производителями, добавляют по 100 мкл клеточной взвеси, перемешивают вихревым смесителем. Используется следующая панель МАТ: CD3/Anti-HLA-DR.

3.4. Пробы перемешивают на вортексе и инкубируют 15 мин при комнатной температуре без доступа света.

3.5. Во все пробирки добавляют по 100 мкл лизирующего раствора. Пробы перемешивают на вортексе и инкубируют 10 мин при комнатной температуре без доступа света.

3.6. Во все пробирки добавляют по 1000 мкл дистиллированной воды. Пробы перемешивают на вортексе и инкубируют 20 мин при комнатной температуре без доступа света.

3.7. Анализ на проточном цитофлюориметре.

4. Этап интерпретации результатов.

Для субпопуляции $CD3^+HLA-DR^+$ рассчитывают коэффициент прироста (КП) удельного веса субпопуляции в культуре с лимфоцитарным диагностикумом по отношению к ее удельному весу в соответствующей монокультуре (формула 1):

$$КП_{CD3+HLA-DR+лд} = \frac{(CD3^+HLA-DR^+_{лд} - CD3^+HLA-DR^+_{кон}) \times 100}{CD3^+HLA-DR^+_{кон}}, \quad (1)$$

где $CD3^+HLA-DR^+_{лд}$ — относительное число клеток субпопуляции $CD3^+HLA-DR^+$ в культуре лимфоцитов пациента с лимфоцитарным диагностикумом (ЛД), %;

$CD3^+HLA-DR^+_{кон}$ — относительное число клеток субпопуляции $CD3^+HLA-DR^+$ в монокультуре пациента (кон), %.

Для контроля технологии выполнения исследования необходимо оценить коэффициент прироста субпопуляции $CD3^+HLA-DR^+$ в среде № 1 ($кон$) и среде № 3 с добавлением ФГА как универсального активатора Т-лимфоцитов (формула 2):

$$КП_{CD3+HLA-DR+фга} = \frac{(CD3^+HLA-DR^+_{фга} - CD3^+HLA-DR^+_{кон}) \times 100}{CD3^+HLA-DR^+_{кон}}. \quad (2)$$

где $CD3^+HLA-DR^+_{фга}$ — относительное число клеток субпопуляции $CD3^+HLA-DR^+$ в культуре лимфоцитов пациента с ФГА, %;

$CD3^{+}HLA-DR^{+}_{кон}$ — относительное число клеток субпопуляции $CD3^{+}HLA-DR^{+}$ в монокультуре пациента (кон), %.

При этом $KП_{CD3+HLA-DR+фра}$ должен иметь положительное значение.

Таблица — Интерпретация результатов оценки иммунного статуса пациентов с хронической болезнью почек при органной трансплантации

$KП_{CD3+HLA-DR+фра}$	$KП_{CD3+HLA-DR+лд}$	Аллогенный иммунный ответ
+	+	+
+	-	-
-	+	Нарушение технологии выполнения исследования
-	-	

Таким образом, положительный коэффициент прироста $CD3^{+}HLA-DR^{+}_{лд}$ подтверждает положительный аллогенный иммунный ответ.

Данная оценка иммунологического статуса может быть использована в комплексном подходе определения тактики ведения пациентов с хронической болезнью почек при органной трансплантации с целью индивидуализации схем иммуносупрессивной терапии.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

При правильном использовании метода ошибки в оценке результатов исключены.