

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель

Министра здравоохранения

_____ В.В. Колбанов

27 декабря 2005 г.

Регистрационный № 141-1105

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ
УРОВНЯ ИОНОВ КАЛИЯ В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ ДЛЯ
ДИАГНОСТИКИ ПОЛЛИНОЗОВ**

Инструкция по применению

Учреждение–разработчик: Республиканский научно-практический центр
гигиены

Авторы: д-р мед. наук, проф. С.В. Федорович, О.А. Цыганкова, Л.Ф. Яковлева,
А.Г. Маркова, И.Л. Арсентьева, В.А. Жарин, О.В. Усовик

Инструкция предназначена для использования метода определения уровня ионов калия в лимфоцитах крови с целью диагностики поллинозов *in vitro*.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Клиническая медицина, клиническая лабораторная диагностика.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Реакция выброса ионов калия из сенсibilизированных лимфоцитов, способных к интенсивной пролиферации и дифференцировке в ответ на антигенный стимул, по патогенетическому механизму близка к тесту либерации гистамина. Лимфоциты, инкубированные с пыльцевыми аллергенами растений, выделяют в надосадочную жидкость внутриклеточный калий, по приросту которого судят о сенсibilизации лимфоцитов.

РЕАКТИВЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Реактивы:

- гепарин 5 000 Ед;
- фиколл-верографинный раствор;

Для приготовления рабочего раствора фиколл-верографинной смеси готовят 9% раствор фиколла (взвешивают 10,8 г фиколла, растворяют в 109,2 мл дистиллированной воды) и 33,9 % раствор верографина (33,8 мл 76,6 % раствора верографина, к которому добавляют 42,1 мл воды). Смешивают 12 частей 9 % фиколла и 5 частей 33,9 % верографина, плотность 1,077 г/мл.

- раствор хлорида натрия 0,9 %;
- комплект аллергенов из пыльцы растений и разводящей жидкости. Аллергены (10000 PNU/мл) готовят в разведении 1:10. Срок использования аллергена после его разведения – 7 сут.

Оборудование:

- пипетка пастеровская;
- варипипетка;

- весы аналитические;
- термостат;
- центрифуга;
- камера Горяева;
- анализатор электролитов.

Ход определения

Для исследования у обследуемых берут кровь из вены в процедурном кабинете по обычной методике в количестве 5 мл, смешивают в пробирке с 0,5 мл рабочего раствора гепарина (0,5 мл гепарина 5000 Ед и 4,5 мл хлорида натрия). Содержимое пробирки перемешивают путем осторожного покачивания её не менее 3 раз. Пробирку с кровью и антикоагулянтом оставляют в штативе при комнатной температуре (18-25 °С) в течение 0,5-2 часов. Плазму с лейкоцитами и некоторой примесью эритроцитов наносят на 3 мл фиколл-верографинового раствора и центрифугируют при 1500 об/мин в течение 30 мин. При этом лимфоциты и моноциты сохраняются на поверхности градиента, а эритроциты и гранулоциты оседают на дне пробирки. Интерфазный слой (кольцо) переносят пастеровской пипеткой в отдельную пробирку, отмывают 2 раза 0,9 % раствором хлорида натрия. Подсчет лимфоцитов проводят в камере Горяева. Лимфоцитарная суспензия должна содержать 2×10^6 клеток в 1 мл.

Готовят два контроля, в которых определяют концентрации ионов калия на каждую исследуемую пробу:

- контроль 1 – спонтанный выброс ионов калия ($СК^+$): в пробирку вносят по 0,2 мл лимфоцитарной взвеси и 0,2 мл 0,9 % физиологического раствора;
- контроль 2 – раствор аллергена 0,2 мл и 0,2 мл 0,9 % физиологического раствора.

Определение уровня ионов калия в исследуемой пробе проводят путем внесения в пробирку 0,2 мл исследуемой лимфосуспензии и 0,2 мл аллергена. Смесь инкубируют в термостате 1 час при 37 °С, затем центрифугируют 10 мин. при 1000 об/мин. В надосадочной жидкости определяют концентрацию ионов калия с использованием анализатора электролитов.

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Оценка результатов реакции выброса ионов калия проводится по измерению разницы концентраций ионов калия в опытных и контрольных пробах, выраженной в процентах. При наличии концентрации калия в опыте больше, чем сумма в контролях 1+2, необходимо провести расчет по формуле:

$$P = \frac{CK_{\text{опыт}}^+ - CK_{\text{контроль 1+2}}^+}{CK_{\text{контроль 1+2}}^+} \times 100\%$$

где P – прирост концентрации калия, выраженный в процентах;
 $CK_{\text{опыт}}^+$ – концентрация ионов калия в ммоль/л в опытной пробе;
 $CK_{\text{контроль 1+2}}^+$ – концентрация ионов калия в ммоль/л в контрольных пробах 1 и 2.

При выбросе ионов калия менее 15 % тест считают отрицательным. Превышение концентрации калия в опыте более на 20 % – тест положительный.