

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра
Д.Л. Пиневиц

2013

Регистрационный № 164-1113

**СЕРОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ОСТРОЙ РЕАКЦИИ
«ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА» У ДЕТЕЙ ПОСЛЕ
ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**
инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий»

ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

АВТОРЫ:

д.м.н. Войтенко Н.Н.,

д.м.н., профессор, член-корр. НАН РБ Алейникова О.В.,

к.б.н. Дорошенко Т.М., к.б.н. Акалович С.Т, Бакерова В.А,

к.б.н. Белевцев М.В, к.б.н. Шман Т.В., Автономова Е.Н, Марейко Ю.Е.

Минск, 2013

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д. Л. Пиневиц
29.11.2013

Регистрационный № 164-1113

**СЕРОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ОСТРОЙ РЕАКЦИИ
«ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА» У ДЕТЕЙ ПОСЛЕ
ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий», ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

АВТОРЫ: д-р мед. наук Н.Н. Войтенок, д-р мед. наук, проф., чл.-кор. НАН Беларуси О.В. Алейникова, канд. биол. наук Т.М. Дорошенко, канд. биол. наук С.Т. Акалович, В.А. Бакерова, канд. биол. наук М.В. Белевцев, канд. биол. наук Т.В. Шман, Е.Н. Автономова, Ю.Е. Марейко

Минск 2013

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод диагностики острой реакции «трансплантат против хозяина» (оРТПХ) у пациентов детского возраста после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) в раннем периоде на основании исследования в динамике уровня растворимого рецептора фактора некроза опухолей- α 1 типа (рФНОР1). Данный метод является дополнительным к существующему на сегодняшний день методу диагностики, основанному на клинических критериях. Для диагностики развития оРТПХ у детей проводится определение уровня рФНОР1 в плазме до начала кондиционирования (0 день) и в контрольных точках после ТГСК (7, 14, 21, 30-й день). Значительное (в 2 раза и более) повышение концентрации рФНОР1 в плазме по сравнению с начальным уровнем свидетельствует о развитии оРТПХ.

Настоящая инструкция предназначена для врачей-гематологов, врачей-трансплантологов, врачей-онкологов.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Центрифуга лабораторная с ротором для пробирок вместимостью 1,5 мл и скоростью вращения до 14000 об./мин.
2. Встряхиватель пробирок — вортекс.
3. Встряхиватель для 96-луночных планшет.
4. Спектрофотометр для 96-луночных планшет или ИФА-ридер.
5. Набор полуавтоматических пипеток переменного объема.
6. Иммуноферментная тест-система для определения растворимого рецептора фактора некроза опухолей- α 1 типа.
7. Расходный материал: полипропиленовые пробирки вместимостью 1,5 мл, наконечники с фильтром, одноразовые перчатки.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Аллогенная ТГСК.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Нет.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

1. Получение плазмы и подготовка образца для анализа

Забор цельной венозной крови осуществляется общепринятыми методами в полипропиленовые пробирки, содержащие в качестве консерванта 5–10 ед./мл гепарина натрия. После центрифугирования 10 мин. при 500 g плазму отбирают и переносят в пробирки типа «эппендорф», замораживают и хранят замороженными при -20°C . После размораживания и перемешивания образцы центрифугируют 10 мин при 1500 g. Не допускается повторное замораживание/размораживание образцов.

2. Иммуноферментный анализ

Концентрацию рФНОР1 в плазме крови определяют методом «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа на основе моноклональных антител, специфичных к молекуле растворимого рецептора ФНО- α первого типа. В случае применения аналогичных коммерческих тест-систем необходимо следовать инструкции производителя.

1. Полистироловые 96-луночные планшеты для ИФА заполнить по 100 мкл на лунку 0,1 М карбонатным буфером, рН 9,6, содержащим 3 мкг/мл МКА В5, специфичных к рФНОР1, и инкубировать 12–18 ч при +4°C.

2. По окончании инкубации удалить содержимое лунок и провести трехкратную отмывку лунок планшета, добавляя по 300 мкл на лунку 10 мМ фосфатно-солевого буфера, рН 7,4, содержащего 300 мМ NaCl и 0,05% Твин-20 (ФСБ-Тв). После отмывки удалить остатки жидкости из лунок постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

3. Двукратные разведения стандартного рекомбинантного белка рФНОР1 в ФСБ-Тв, содержащем 0,5% бычьего сывороточного альбумина (ФСБ-Тв-БСА), внести в соответствующие лунки в дубликатах по 100 мкл раствора каждой калибровочной пробы. Подготовленные образцы биологических жидкостей развести в 20 раз ФСБ-Тв-БСА и внести в дубликатах по 100 мкл в лунки, предназначенные для исследуемых образцов. Внесение калибровочных проб и исследуемых образцов необходимо произвести в течение 5–10 мин. Планшет инкубировать при комнатной температуре (18–20°C) при встряхивании в течение 50 мин.

4. Повторить этап 2.

5. Концентрат пероксидазного конъюгата антител А11, специфичных к рФНОР1, развести буфером ФСБ-Тв-БСА, внести во все лунки по 100 мкл приготовленного раствора антител и инкубировать при комнатной температуре (18–20°C) при встряхивании в течение 30 мин.

6. Повторить этап 2.

7. Добавить по 100 мкл смеси субстратного буфера и субстрата ТМБ в каждую лунку. Пример разведения: на планшет потребуется 8,8 мл субстратного буфера и 2,2 мл субстрата ТМБ. **Внимание:** следует смешивать субстрат с буфером непосредственно перед использованием в новой посуде. Внесение смеси субстрата с буфером в лунки необходимо произвести в течение 1–2 мин. Осторожными круговыми движениями перемешать содержимое лунок. Инкубировать планшет в темноте при комнатной температуре (18–20°C) в течение 5–10 мин в зависимости от степени развития синего окрашивания.

8. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и смесь субстрата с субстратным буфером, по 100 мкл 5% H₂SO₄, при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.

9. Определить величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета на фотометре вертикального сканирования или ИФА-ридере при длине волны 450 нм. Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 5–20 мин после внесения стоп-реагента.

3. Определение концентрации рФНОР1 в исследуемых образцах

1. Построить калибровочный график: ось абсцисс (x) — концентрации рФНОР1 в калибровочных пробах (нг/мл), ось ординат (y) — оптическая плотность калибровочных проб (ОП 450 нм). Учитывая разведение концентрата, концентрации калибровочных проб составляют 0; 0,023; 0,047; 0,094; 0,187; 0,375; 0,750 и 1,500 нг/мл. Для алгоритма обсчета (аппроксимации) калибровочного графика использовать линейную зависимость.

2. Определить по калибровочному графику содержание рФНОР1 в исследуемых образцах и умножить на фактор разведения (его значение — 20). В случае, когда значение ОП в лунке с образцом выше такового в лунке с калибровочной пробой, содержащей 1,500 нг/мл рФНОР1, необходимо привести дополнительное определение концентрации рФНОР1 и развести исходный образец плазмы в 200 раз и более, учитывая данное значение фактора разведения при вычислении конечной концентрации рФНОР1 в исследуемом образце.

4. Диагностика оРТПХ у детей после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток на основании исследования уровня растворимого рецептора ФНО- α первого типа

Измерение уровня рФНОР1 в плазме детей производят до начала режима кондиционирования перед трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (0 день) и в контрольных точках после ТГСК (7, 14, 21, 30-й день). Необходимо провести дополнительное исследование для дифференциальной диагностики инфекционных осложнений. В случае повышения содержания маркера в 2 раза и более по сравнению с начальным уровнем при отсутствии инфекционных осложнений у пациента диагностируют оРТПХ. В случае выявления инфекционных осложнений настоящий метод не применим для диагностики оРТПХ.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Отсутствуют.