

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневич

2017 г.

Регистрационный № 093-1117



**МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ И ПАТОЛОГИЧЕСКИХ
СОСТОЯНИЙ, ОБУСЛОВЛЕННЫХ РЕАКЦИЯМИ
ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ НЕМЕДЛЕННОГО ТИПА НА
ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА ИЗ ГРУППЫ
ПРОТИВОМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ СИСТЕМНОГО
ПРИМЕНЕНИЯ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ - РАЗРАБОТЧИКИ:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический
центр эпидемиологии и микробиологии»

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский
университет»

АВТОРЫ: Романова И.В., канд. мед. наук Гончаров А.Е., д-р. мед. наук,
профессор Доценко Э.А.

Минск, 2017

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод диагностики заболеваний и патологических состояний, обусловленных реакциями гиперчувствительности немедленного типа на лекарственные средства (ЛС) из группы противомикробных препаратов для системного применения на основе определения маркеров активации и дегрануляции базофилов.

Инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-аллергологов, врачей-иммунологов, иных врачей-специалистов, оказывающих медицинскую помощь пациентам в амбулаторных и стационарных условиях.

1 Показания к применению

Аллергическая крапивница (L50.0), ангионевротический отек (T78.3), анафилактический шок (T88.6), обусловленные патологической реакцией гиперчувствительности немедленного типа на адекватно назначенное и правильно примененное ЛС следующих групп согласно анатомо-терапевтическо-химической классификации (АТХ): J01 – противомикробные препараты для системного применения, J02 – противогрибковые препараты для системного применения, J04 – препараты, активные в отношении микобактерий.

2 Перечень необходимых изделий медицинского назначения, медицинской техники

2.1 Медицинская техника:

1. проточный цитофлуориметр (минимум 4 канала флуоресценции);
2. автоматические дозаторы на объемы 0,5–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1000 мкл, 1–5 мл;
3. центрифуга низкоскоростная (1000–3000 об./мин.);
4. термостат с рабочей температурой +37 °С;

5. холодильник с рабочей температурой +2 – +8 °С с морозильной камерой;
6. шейкер орбитальный.

2.2 Изделия медицинского назначения:

1. наконечники пластиковые на 1–5 мл, 0,1–1,0 мл, 0,01–0,1 мл, 0,5–10 мкл;
2. одноразовые полипропиленовые пробирки объемом 1,5 мл;
3. пробирки для цитофлуориметра;
4. пробирки полипропиленовые объемом 10–15 мл;
5. вакутайнеры с гепарином;
6. штатив для пробирок;
7. контейнеры для хранения и транспортировки пробирок с кровью;
8. емкости для хранения и дезинфекции отработанного биологического материала;
9. 4-форбол-12-мирилат-13-ацетата (ФМА);
10. человеческий рекомбинантный интерлейкин (ИЛ)-3;
11. моноклональные антитела к антигенам CD63, CD123, CD203с и HLA-DR, конъюгированные с флуорохромами;
12. моноклональное антитело к IgE, клон 4H10;
13. лизирующий раствор на основе хлорида аммония;
14. фосфатный буферный раствор Дульбекко (DPBS), не содержащий ионов двухвалентных металлов;
15. ЛС, в отношении которого проводится тестирование.

2.3 Средства индивидуальной защиты и дезинфектанты:

1. лабораторный халат;
2. латексные или нитриловые перчатки;
3. дезинфицирующий раствор, предназначенный для обработки рук персонала;

4. дезинфицирующий раствор для инактивации биологического материала.

3 Технология использования метода

3.1 Забор материала, хранение и транспортировка.

Материалом для диагностики является периферическая венозная кровь пациента, которую забирают в количестве 5–7 мл из кубитальной вены в вакутайнер, содержащий гепарин в качестве антикоагулянта. Образец крови до исследования хранят при температуре (18–26 °С) не более 4-х часов.

3.2 Пробоподготовка

Рабочие растворы исследуемого ЛС готовят непосредственно перед исследованием. В качестве растворителя выступает, как правило DPBS, реже – этанол или диметилсульфоксид (ДМСО). Для выбора подходящего растворителя следует учитывать сведения о растворимости ЛС из справочной литературы. Концентрация ЛС, применяемого для теста активации базофилов (ТАБ), должна составлять 0,1–0,01% от разовой минимальной терапевтической дозы ЛС. Рекомендуемые концентрации для наиболее часто применяемых в лечении инфекционных заболеваний ЛС указаны в приложении А. В постановке ТАБ используют не менее двух концентраций ЛС.

Маркируют пробирки для цитометра:

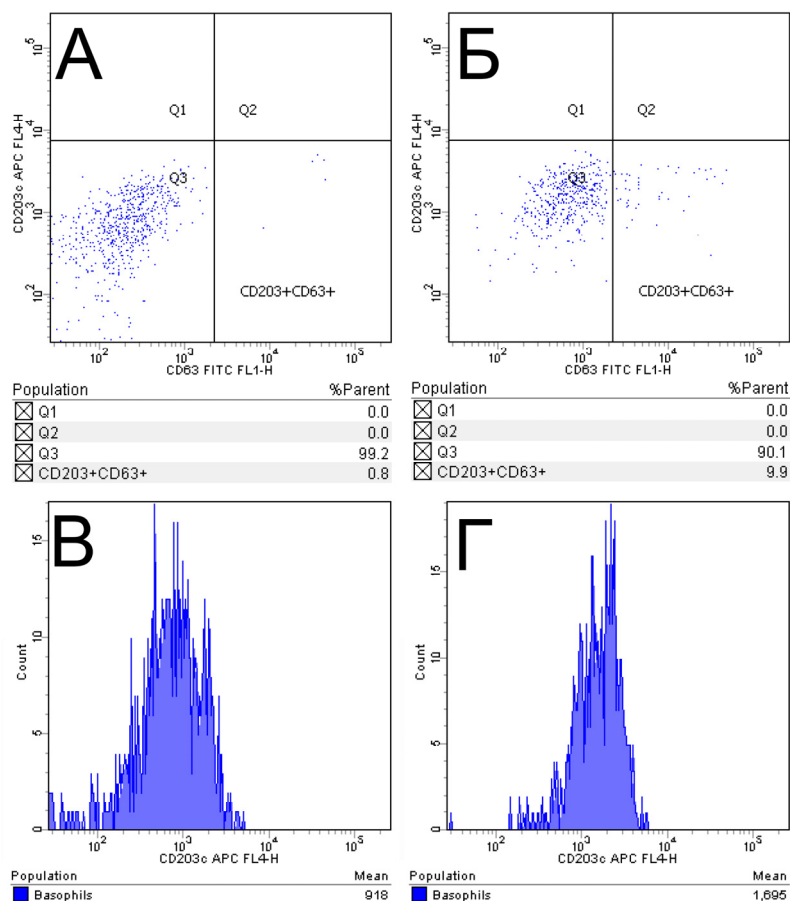
1. Отрицательный контроль (ОК) – добавляют DPBS 10 мкл;
2. Положительный контроль (ПК) 1 (ПК1) – добавляют ФМА 20 пг;
3. ПК2 – добавляют антитело к IgE в количестве 1 мкг/мл;
4. Разведение ЛС (концентрация №1) в количестве 20 мкл;
5. Разведение ЛС (концентрация №2) в количестве 20 мкл.

В каждую из пробирок вносят ИЛ-3 в концентрации 2 нг/мл. Во все пробирки добавляют 100 мкл испытуемой крови и смешивают на шейкере.

Важно избегать грубых манипуляций с образцом крови: грубое пипетирование крови, не допускать вспенивания. Пробирки помещают в инкубатор (+37 °C) на 30 минут. После чего их переносят в морозильник (-20 °C) на 1 мин. для остановки активации базофилов (стоп-реакция). В каждую пробирку вносят антитела: CD63 (FITC), CD123 (PE), HLA-DR (PC7), CD203c (APC). Данная панель антител является рекомендуемой, сочетание флуорохромов может быть иным. Тщательно смешивают на шейкере и инкубируют на протяжении 15 мин. при температуре +2 – +8 °C в темноте. После чего добавляют 2 мл лизирующего раствора в каждую пробирку, перемешивают на шейкере и инкубируют на протяжении 10 мин. при температуре +18 – +25 °C в темноте. Пробирки центрифугируют (200–300 g – 5 мин.) для осаждения клеток, аккуратно сливают супернатант. Добавляют 300 мкл DPBS и перемешивают на шейкере.

3.3 Учет данных

Учет проб осуществляют на проточном цитометре, при этом насчитывают не менее 250 базофилов в каждой пробирке. Учет всех пробирок *одного пациента* проводят при абсолютных одинаковых настройках цитофлуориметра с минимальным интервалом времени. Рекомендуется использовать аппаратные возможности проточного цитометра для исключения конгломератов клеток. Идентификацию базофилов осуществляют путем гейтирования мононуклеаров на цитограмме прямого и бокового светорассеяния с последующим построением региона CD123⁺HLA-DR⁻ на следующей цитограмме. Показатели активации и дегрануляции базофилов оценивают в регионе базофилов по маркерам CD63 и CD203c (рисунок). При этом регистрируется процент CD63⁺-клеток в ОК и пробах с ЛС, а также оценивается средняя интенсивность флуоресценции (ИФ) молекулы CD203c в ОК и пробах с ЛС.



А – CD63⁺CD203c⁺ базофилы (ОК); Б – CD63⁺CD203c⁺ базофилы (проба с ЛС); В – гистограмма интенсивности экспрессии CD203c (ОК); Г – гистограмма интенсивности экспрессии CD203c (проба с ЛС)

Рисунок – Пример учета результатов ТАБ

3.4 Анализ полученных данных

Рассчитывают индекс активации для маркера дегрануляции CD63 (ИА⁶³) путем соотношения процента CD63⁺CD203c⁺ базофилов в пробах с ЛС к проценту CD63⁺CD203c⁺ базофилов в ОК. Индекс активации для маркера активации базофилов CD203c (ИА^{203c}) рассчитывают путем соотношения ИФ молекулы CD203c на базофилах в пробе с ЛС к ИФ CD203c на базофилах в ОК.

Контроль качества исследования заключается в оценке значений показателей дегрануляции базофилов (CD63⁺CD203c⁺) в ОК и ПК. В ОК процент спонтанно дегранулировавших CD63⁺ базофилов не должен превышать 10%. Содержание CD63⁺ базофилов в ОК > 10% чаще всего

является следствием нарушения условий забора или хранения крови. В данном случае рекомендуется повторить исследование и/или забор крови. ПК считается пройденным в случае, если процент CD63⁺ базофилов $\geq 20\%$ в двух ПК. Низкая отвечаемость в ПК с ФМА (ПК1), как правило, свидетельствует о нарушении условий забора и хранения крови, или нарушении техники пробоподготовки. В данном случае рекомендуется повторить исследование с точным соблюдением всех пунктов протокола. Низкая отвечаемость базофилов в ПК с использованием антитела к IgE (ПК2) указывает на то, что в связи с индивидуальными особенностями иммунофункционального состояния базофилов, результаты ТАБ у данного пациента могут быть недостоверны (так называемые «неотвечающие» базофилы). Рекомендуется повторить ТАБ через 1–2 месяца. В случае, если разница в процентном содержании CD63⁺ базофилов в пробах с ЛС и ОК составляет меньше 5%, следует выполнить повторную постановку теста.

Алгоритм учета, анализа и интерпретации проб при проведении ТАБ представлен в приложении Б.

3.5 Интерпретация данных

Значение ИА⁶³ $\geq 1,6$ (при этом разница в процентном содержании CD63⁺ базофилов в пробах с ЛС и ОК должна превышать 5%) и/или ИА^{203c} $\geq 1,6$ в пробе с ЛС (по крайней мере, при использовании одной из двух концентраций ЛС) указывает на наличие у пациента заболевания или патологического состояния, обусловленного гиперчувствительностью немедленного типа на данное ЛС.

4 Противопоказания к применению

Отсутствуют.

5 Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении и пути их устранения

В таблице представлены проблемы и методические ошибки, которые могут возникнуть при выполнении метода с описанием причин возникновения и путей их устранения (таблица).

Таблица – Возможные ошибки или осложнения при выполнении метода и пути их устранения

Проблема	Возможная причина	Пути устранения
Недостаточный лизис эритроцитов	Неправильно приготовленный раствор	Правильно готовить и хранить раствор
	Некорректный температурный режим	Лизис при комнатной температуре
	Недостаточное перемешивание	Двухкратное перемешивание на шейкере
Большой процент спонтанной дегрануляции базофилов в ОК (CD63+клетки)	Не соблюден температурный режим образца крови	Хранить образец крови при комнатной температуре (20-25°C)
	Не соблюдено время хранения образца крови	Хранить образец крови не более 4-х часов до исследования
	Грубые манипуляции с образцом крови	Не допускать интенсивного перемешивания и грубого пипетирования
Количество базофилов при учете менее 250	Низкое содержание базофилов в крови, в том числе, при острых аллергических реакциях	Повторить тест, подготавливая пробы в 3-х повторах с последующим их объединением и учетом. В случае, если количество подсчитанных базофилов не достигает 250, следует повторить тест через 1 месяц

Рекомендуемые концентрации наиболее часто применяемых в лечении инфекционных заболеваний ЛС для постановки ТАБ

№ п/п	Лекарственное средство	Концентрации
1.	Бензилпенициллин	2 и 0,2 мг/мл
2.	Амоксициллин	1,2 и 0,25 мг/мл
3.	Амоксициллин с клавулановой кислотой	2,5 и 1,25 мг/мл
4.	Ампициллин	1,2 и 0,25 мг/мл
5.	Цефазолин	2,5 и 0,5 мг/мл
6.	Цефалексин	2,5 и 0,25 мг/мл
7.	Цефуроксим	2,5 и 0,5 мг/мл
8.	Цефтриаксон	2,0 и 0,2 мг/мл
9.	Цефотаксим	2,0 и 0,2 мг/мл
10.	Цефоперазон	2,0 и 0,2 мг/мл
11.	Цефепим	2,0 и 0,2 мг/мл
12.	Меропенем	2,5 и 0,25 мг/мл
13.	Кларитромицин	2,5 и 0,25 мг/мл
14.	Азитромицин	2,0 и 0,2 мг/мл
15.	Гентамицин	1,0 и 0,4 мг/мл
16.	Амикацин	2,5 и 0,25 мг/мл
17.	Офлоксацин	2,0 и 0,2 мг/мл
18.	Ципрофлоксацин	100 и 20 мкг/мл
19.	Норфлоксацин	2,0 и 0,2 мг/мл
20.	Левифлоксацин	2,0 и 0,2 мг/мл
21.	Моксифлоксацин	0,5 и 0,1 мг/мл
22.	Ванкомицин	2,5 и 0,25 мг/мл
23.	Тейкопланин	2,0 и 0,2 мг/мл
24.	Метронидазол	2,5 и 0,25 мг/мл
25.	Флуконазол	2,0 и 0,2 мг/мл
26.	Этамбутол	2,0 и 0,4 мг/мл
27.	Изониазид	2,5 и 0,25 мг/мл

Алгоритм учета, анализа и интерпретации проб при проведении ТАБ

