

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



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

Инструкция по применению

Учреждение–разработчик:

ГУ «Республиканский научно-практический центр гигиены»
(директор – доктор медицинских наук, профессор С.М. Соколов).

Авторы:

С.В. Федорович – заведующий клиническим отделом профпатологии
ГУ «РНПЦ гигиены», доктор медицинских наук, профессор, тел. 240-21-44.

О.А.Цыганкова – старший научный сотрудник клинического отдела профпатологии
ГУ «РНПЦ гигиены».

Л.Ф. Яковлева – старший научный сотрудник клинического отдела профпатологии
ГУ «РНПЦ гигиены».

А.Г.Маркова – научный сотрудник клинического отдела профпатологии ГУ «РНПЦ ги-
гиены».

И.Л. Арсентьева – врач пульмонологического отделения ЛПУ «6-я ГКБ» г. Минска.

В.А. Жарин – заместитель начальника – начальник медицинской части ГУ "432 ордена
Красной Звезды Главный военный клинический госпиталь Вооруженных Сил Республики
Беларусь".

О.В. Усовик – аспирант кафедры фармакогнозии и ботаники УО «Витебский
государственный университет».

Минск – 2005

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:

1. Гепарин 5 000 Ед.
2. 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.

3. Раствор хлорида натрия 0,9%.
4. Комплект аллергенов из пыльцы растений и разводящей жидкости. Аллергены (10000 PNU/мл) готовят в разведении 1:10. Срок использования аллергена после его разведения – 7 суток.

Оборудование: пипетка пастеровская, варипипетка, весы аналитические, термостат, центрифуга, камера Горяева, анализатор электролитов.

Ход определения

1. Для исследования берут кровь из вены у обследуемых 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, центрифугируют при 1500 об/мин в течение 30 минут. 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.

2. 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.

3. 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 $37^\circ C$, 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:

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

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

Обоснование целесообразности использования Инструкции

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

В последнее десятилетие отмечается рост аллергических заболеваний, в т.ч. поллинозов, как во всем мире, так и в Республике Беларусь. Поллиноз является одним из распространенных аллергических заболеваний от воздействия пыльцы растений, встречающийся у 8-16 % населения. Разработка новых методов диагностики, лечения и профилактики поллинозов является весьма актуальной.

Имеются литературные данные (Новиков Д.К., Янченко В.В., 2002; Зубарева И.В., 2003) о том, что под влиянием аллергенов из сенсibilизированных лейкоцитов выбрасываются внутриклеточные ионы калия. По приросту калия в надосадочной жидкости суспензии лейкоцитов, инкубированной с аллергенами, можно судить о сенсibilизации лейкоцитов. Аллерготестирование по данной методике проводилось *in vitro* для диагностики лекарственной и пищевой аллергии, с инфекционными антителами.

Реакция выброса ионов калия из лимфоцитов сыворотки крови в ответ на воздействие аллергена использована нами для диагностики поллинозов. В инструкции имеется описание принципа метода, названы реактивы, описаны ход определения и учет результатов, представлен клинический опыт по отработке методики. Ценность методики, заключается в том, что диагностика поллинозов может осуществляться в период обострения заболевания. Данная методика достаточно информативна, проводится *in vitro*, не имеет противопоказаний и доступна в выполнении в любом ЛПО.

Инструкция окажет существенную помощь врачам-аллергологам, терапевтам, врачам-лаборантам.

Авторы:

Заведующий клиническим отделом профпатологии ГУ «РНПЦ гигиены», д.м.н., профессор	С.В. Федорович
Ст.н.с. клинического отдела профпатологии ГУ «РНПЦ гигиены», к.м.н.	О.А.Цыганкова
Ст.н.с. клинического отдела профпатологии ГУ «РНПЦ гигиены», к.м.н.	Л.Ф. Яковлева
Научный сотрудник клинического отдела профпатологии ГУ «РНПЦ гигиены»	А.Г.Маркова
Врач пульмонологического отделения ЛПУ «6-я ГКБ» г. Минска	И.Л. Арсентьева
Заместитель начальника – начальник медицинской части ГУ "432 ордена Красной Звезды Главный военный клинический госпиталь Вооруженных Сил Республики Беларусь"	В.А. Жарин
Аспирант кафедры фармакогнозии и ботаники УО «Витебский государственный университет»	О.В. Усовик

УТВЕРЖДАЮ

Директор Республиканского
научно-практического центра
гигиены, д-р мед. наук, профессор
_____ С.М. Соколов
“ ____ ” _____ 2005г.

Отчет

о проведенных исследованиях по разработке
Инструкции по применению, регистрационный № 141-1105
**« ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ ИОНОВ
КАЛИЯ В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ
ПОЛЛИНОЗОВ »**

Исследования проведены на основании темы НИР «Изучить влияние пылевых аллергенов в окружающей среде разных регионов Республики Беларусь с целью обеспечения экологической безопасности, разработать тест-системы и методы лечения»

Задание 5.2.11 ГНТП "Экологическая безопасность", период выполнения 1 кв. 2003 г. – 4 кв. 2005г.

Значение и место методики определения выброса ионов калия из лимфоцитов сыворотки крови *in vitro* в диагностике поллинозов

Общепринятыми методами для диагностики поллиноза являются следующие пробы *in vivo*: скарификационные внутрикожные, назальные капельные пробы, ингаляционный тест [1,2]. Противопоказаниями для проведения аллерготестирования *in vivo* являются: обострение аллергического заболевания; возможность ложноположительной реакции из-за повышенной чувствительности капилляров кожи к механическому раздражению или к консерванту (фенолу); острый инфекционный процесс (ангина, грипп, ОРВИ); обострение общесоматических заболеваний; туберкулезный процесс любой локализации в периоде обострения; беременность; декомпенсированные (или субкомпенсированные) болезни сердечно-сосудистой системы и крови; печени и почек; психические заболевания в периоде обострения; длительная терапия глюкокортикостероидами; прием антигистаминных препаратов; возраст свыше 60 лет. Внутрикожные пробы с аллергенами могут вызвать общие и очаговые реакции у больного [4, 6].

Во время обострения поллинозов, при наличии противопоказаний для проведения аллерготестирования *in vivo* рекомендуется проводить диагностику поллинозов *in vitro*, в основу которой положена реакция выброса ионов калия из лимфоцитов сыворотки крови [5].

На основании литературных данных [3,7] нами адаптирована методика определения реакции выброса ионов калия из лимфоцитов сыворотки крови при воздействии пылевых аллергенов, которая не применялась ранее для определения сенсibilизации к пыльце растений.

Отработка методики

Для отработки методики провели определение ионов калия в сыворотке крови ионно-селективным методом у 30 человек, не страдающих аллергическими заболеваниями. Спонтанный выброс ионов калия составил $0,8 \pm 0,06$ ммоль/л. Опытную группу составили 30 пациентов, находившихся на лечении в отделении аллергологии 10-й ГКБ г. Минска; возраст обследуемых от 20 до 48 лет. Из них у 22 человек имелась сенсibilизация к пыльцевым аллергенам по клиническим проявлениям и результатам скарификационных проб; 8 человек с диагнозом «атопическая бронхиальная астма (домашняя пыль)» и «крапивница» не имели сенсibilизации к пыльцевым аллергенам.

Установлено, что у больных поллинозом, чувствительных к пыльце злаковых трав, уровень выброса ионов калия из лимфоцитов составил $3,12 \pm 0,03$ ммоль/л, что на 73,0 % выше по сравнению с контролем; к пыльце полыни – $1,5 \pm 0,05$ ммоль/л (на 41,6% выше контроля); к одуванчику – $2,2 \pm 0,07$ ммоль/л (на 37,5% превышает контроль). Лабораторное подтверждение аллергии на пыльцу совпадало с установленным диагнозом «поллиноз» в 95% случаев. В тоже время, у 8 пациентов, не сенсibilизированных к пыльце растений, средний показатель выброса ионов калия составил от 5 до 11% по сравнению с контролем.

Полученные данные позволяют дать оценку адаптированной нами методике выброса ионов калия из лимфоцитов после инкубации с пыльцевыми аллергенами *in vitro*: выброс ионов калия меньше, чем на 15% по сравнению с контролями, свидетельствует об отсутствии сенсibilизации; при превышении концентрации калия в опыте более, чем на 20% – реакция указывает на сенсibilизацию к пыльцевым аллергенам.

Метод не имеет противопоказаний, информативен для диагностики поллинозов, обладает высокой специфичностью – 95%, позволяет проводить диагностику в период обострения (*in vitro*) в отличие от традиционного метода (*in vivo*), который проводят вне обострения заболевания. Предложенный метод дает возможность экономить стандартные аллергены в связи с использованием разведения аллергена 1:10, отличается безопасностью применения, доступностью для выполнения в любом ЛПО.

Своевременная диагностика поллинозов позволяет назначить адекватное лечение и принять профилактические меры, что способствует улучшению качеству жизни населения, приносит социальный эффект.

Литература

1. Адо В.А., Зяблова Н.М., Ирошникова Е.С. Экология и аллергия. – Воронеж: Изд-во Воронежского университета. – 1992. – 110 с.
2. Доценко Э.А., Гурина Н.С., Новиков Д.К., Колосова Т.С. Поллиноз // Здоровоохранение. – 2001, № 2. – С.35-39.
3. Зубарева И.В. Применение теста выброса ионов калия для диагностики сенсibilизации к инфекционным антигенам // Фундаментальные науки и достижения клинической медицины в фармации. Тез.докл. 58 –ой научн. сессии ВМГУ 26-27 февраля 2003г. – С.22-23.
4. Новиков Д.К. Клиническая аллергология: Справ. пособие. – Мн.: Высшая школа, 1991.–510 с.

5. Новиков Д.К., Новикова В.И. Оценка иммунного статуса. – М.–Витебск: Медицина, ПО «Витязь», 1996. – 282 с.
6. Скепьян Н.А. Аллергические болезни: дифференциальный диагноз, лечение. – Мн.: Беларусь, 2000. – 286 с.
7. Янченко В.В., Новиков Д.К. Применение теста выброса ионов калия для диагностики и профилактики аллергических осложнений лекарственной терапии // Иммунология, аллергология и инфектология. – 1996, № 1. – С.67-70.

Авторы:

Заведующий клиническим отделом профпатологии ГУ «РНПЦ гигиены», д.м.н., профессор	С.В. Федорович
Ст.н.с. клинического отдела профпатологии ГУ «РНПЦ гигиены», к.м.н.	О.А.Цыганкова
Ст.н.с. клинического отдела профпатологии ГУ «РНПЦ гигиены», к.м.н.	Л.Ф. Яковлева
Научный сотрудник клинического отдела профпатологии ГУ «РНПЦ гигиены»	А.Г.Маркова
Врач пульмонологического отделения ЛПУ «6-я ГКБ» г. Минска	И.Л. Арсентьева
Заместитель начальника – начальник медицинской части ГУ "432 ордена Красной Звезды Главный военный клинический госпиталь Вооруженных Сил Республики Беларусь"	В.А. Жарин
Аспирант кафедры фармакогнозии и ботаники УО «Витебский государственный университет»	О.В. Усовик