

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д. Л. Пиневич

«22» _____ 2018.

Регистрационный №

229-1218



**МЕТОД ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ
СЕНСИБИЛИЗАЦИИ НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ПРИ
ПСОРИАЗЕ**

Инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ: к.м.н., доцент, Д.А.Черношей, Л.А.Хватова, О.Ю.Сыманович.

Минск, 2018

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ФБР – фосфатно-буферный раствор

ФГА – фитогемагглютинин

ИЛ – интерлейкин

ИФА – иммуноферментный анализ

ИФН – интерферон

СЛА – кожный лимфоцитарно-ассоциированный антиген

DMEM – среда Игла в модификации Дульбекко

IgG – иммуноглобулин класса G

МТТ – бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия

В настоящей инструкции по применению (далее - инструкция) изложен метод диагностики сенсibilизации иммунной системы пациентов с псориазом к компонентам бактериальной микрофлоры, основанный на оценке экспрессии генов цитокинов: IL-22 и IFN- γ и TCR (Т-клеточного рецептора), продукции IFN- γ культурой клеток *in vitro*.

Инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-аллергологов, врачей-иммунологов, врачей-дерматологов, врачей-специалистов, оказывающих медицинскую помощь пациентам с данным заболеванием.

1 Показания к применению

Псориаз в стадии ремиссии или обострения.

2 Противопоказания к применению

Противопоказаний к применению нет. В случае применения антибактериальных препаратов рекомендуется прервать антибиотикотерапию не менее чем за 3 дня.

3 Перечень необходимых медицинских изделий, реагентов и др.

1. CO₂ инкубатор для клеточных культур, поддерживающий температурный режим +37 °С, и содержание CO₂ 5%;
2. автоматический бактериологический анализатор;
3. агароза высокоочищенная, для электрофореза;
4. весы электронные;
5. восьмиканальные микропипетки для работы в объёмах 50-200 мкл;
6. гидрофосфат натрия;
7. дезинфицирующий раствор для инактивации биологического материала.
8. дезинфицирующий раствор, предназначенный для обработки рук медицинских работников;
9. дигидроортофосфат калия;
10. диметилсульфоксид (ДМСО);
11. дистиллятор, обеспечивающий качество воды ГОСТ 6709-72;
12. камера Горяева;

13. лабораторный халат;
14. латексные или нитриловые перчатки;
15. микроскоп биологический;
16. микроскоп инвертированный;
17. морозильная камера, поддерживающая температуру -20°C ;
18. МТТ (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия);
19. набор для выделения ДНК;
20. набор для выделения РНК;
21. набор для обратной транскрипции;
22. набор праймеров к генам ИФН- γ и к ИЛ-22 (изготавливаются под заказ в соответствии с требуемыми последовательностями олигонуклеотидов);
23. наборы для иммуноферментного определения концентрации интерферона γ (ИФН- γ) в сыворотках крови и биологических жидкостях;
24. облучатель бактерицидный;
25. одноканальная микропипетка 5-50 мкл;
26. одноканальная микропипетка объемом 1-5 мл;
27. питательная среда DMEM, RPMI 1640;
28. пластмассовые одноразовые наконечники к микропипеткам;
29. плоскодонные 12-, 48- и 96-луночные культуральные планшеты, стерильные, в индивидуальной упаковке;
30. поликлональные анти-CLA+ кроличьи (IgG) антитела;
31. раствор градиента плотности 1,077г/см³;
32. реагенты для ПЦР (ПЦР буфер, активированные ДНТП, ДНК-полимераза);
33. рН-метр – диапазон рН от 1 до 14, точность 0,01 рН;
34. спектрофотометр (для планшет), длина волны 450нм, 610-630нм;
35. стерилизатор паровой;
36. стерильные фильтры в индивидуальной упаковке для стерилизации растворов (диаметр пор фильтра 0.22 μm);
37. стерильный зонд-тампон в пробирке;
38. трипановый синий;

39. триптон-соевый бульон;
40. ФГА (фитогемагглютинин);
41. хлорид калия;
42. хлорид натрия;
43. холодильник с температурой в камере от +4°C до +8°C;
44. центрифуга с бакет-ротором (для планшет), 300g;
45. центрифуга с бакет-ротором для пробирок, 300-400g;
46. центрифужные пробирки объемом 10-15 мл;
47. чашки Петри;
48. человеческий альбумин, высокоочищенный;
49. шкаф ламинарный (II-класс биологической защиты);
50. шкаф сушильный.

4. Технология использования метода

4.1. Забор материала, хранение и транспортировка

Материалом для исследования является венозная кровь пациента, которую забирают в количестве 5-7 мл в стерильную пробирку, содержащую гепарин в качестве антикоагулянта, а также бактериальные культуры, выделенные из смывов с пораженных участков кожи у пациентов с псориазом.

Образцы крови до исследования хранят при температуре от +18°C до +26°C, не более 4 часов. Бактериологический материал – не более 4-х часов, при температуре не выше +4°C.

4.2 Приготовление супернатанта из бактериальных культур, выделенных от пациентов с псориазом

Забор материала осуществляют с помощью стерильных зондов-тампонов. В последствии с их помощью делают посев на кровяной агар для выделения чистых культур микроорганизмов.

Идентификацию полученных культур осуществляют с помощью фенотипических методов, например, с помощью автоматического бактериологического анализатора, генотипических – например, методом ПЦР.

Полученные культуры культивируют не менее 24 часов в триптон-соевом бульоне, затем отбирают в пробирки и центрифугируют при 4000g 10 минут. Надосадок снимают и стерилизуют фильтрованием через стерильные шприцевые фильтры (с диаметром пор $\leq 0.22\mu\text{m}$). Полученные образцы супернатантов рекомендуется применять непосредственно после приготовления или поместить на хранение в морозильную камеру на -20°C до использования.

4.3 Выявление и нейтрализация цитолитической активности бактериальных супернатантов

Так как сенсibilизацию иммунокомпетентных клеток возможно оценить после стимуляции клеточной культуры полученными супернатантами бактериальных культур в условиях *in vitro*, необходимым этапом является выявление и, соответственно, нейтрализация цитолитической активности образцов.

Цитолитическую активность полученных образцов супернатантов определяют с помощью теста на определение гемолитической активности. Гемолитическую активность, определяют с использованием кровяного агара, содержащего 3% крови кролика. Кровь забирают, соблюдая правила асептики, в стерильные пробирки, содержащие раствор ЭДТА. В качестве антикоагулянта может быть также использован раствор гепарина в соответствующей концентрации. Допустимо использование коммерческих смесей, предназначенных для дефибрирования и консервирования крови.

Далее в остуженный (до $+45^{\circ}\text{C}$) 1% агарозный гель вносят кровь кролика (до конечной концентрации 3%), и заливают полученную смесь в стерильные чашки Петри (10cm^2) по 5мл. После застывания геля аккуратно вырезают лунки (по 2мм).

Растворы супернатантов вносят в лунки до их заполнения и инкубируют 4 часа при +37°C во влажной камере. По истечению срока инкубации оценивают наличие гемолитической активности (рисунок 1).



Рисунок 1. – Гемолитическая активность бактериальных супернатантов в исследуемых образцах

Образцы, в которых отсутствует гемолитическая активность, могут быть применены далее для оценки митогенной активности.

При обнаружении гемолиза, далее проводят инактивацию гемолизинов: смешивают кровь кролика с супернатантом из бактериальных компонентов и инкубируют при +37°C в течение 1 часа. Затем смесь центрифугируют для удаления эритроцитов и снова определяют цитолитическую активность бактериальных супернатантов с помощью инкубирования в кровяном агаре. При отсутствии гемолиза препарат супернатанта используют далее для оценки митогенной активности. При необходимости повторяют шаг с инактивацией гемолизинов и повторным определением гемолитической активности соответственно.

Готовый бактериальный супернатант стерилизуют фильтрованием (0.22 μm) и хранят при -20°C до использования.

4.4 Определение митогенной активности супернатантов бактериальных культур

Оценку митогенной активности полученных образцов бактериальных супернатантов проводят с помощью МТТ-теста с мононуклеарами периферической крови. Кровь практически здорового человека забирают

стерильным шприцем из локтевой вены в стерильные пробирки с антикоагулянтом (гепарин или ЭДТА). Мононуклеары (лимфоцитарно-моноцитарная смесь) периферической крови выделяют методом градиентного центрифугирования согласно общепринятой методике. Количество клеток считают в камере Горяева и доводят до рабочей концентрации (1×10^6 кл/мл) полной питательной средой RPMI 1640.

Рекомендуется вносить образцы и контроли в дублях, для большей достоверности полученных результатов.

Определение митогенной активности образцов бактериальных супернатантов.

В лунки 48-луночного культурального планшета добавить: по 1 мл суспензии мононуклеаров, различные разведения супернатанта, 2 мкг/мл ФГА использовать в качестве положительного контроля, ФБР – в качестве отрицательного, и культивировать в течение 4 суток при $+37^\circ\text{C}$ (рисунок 2).

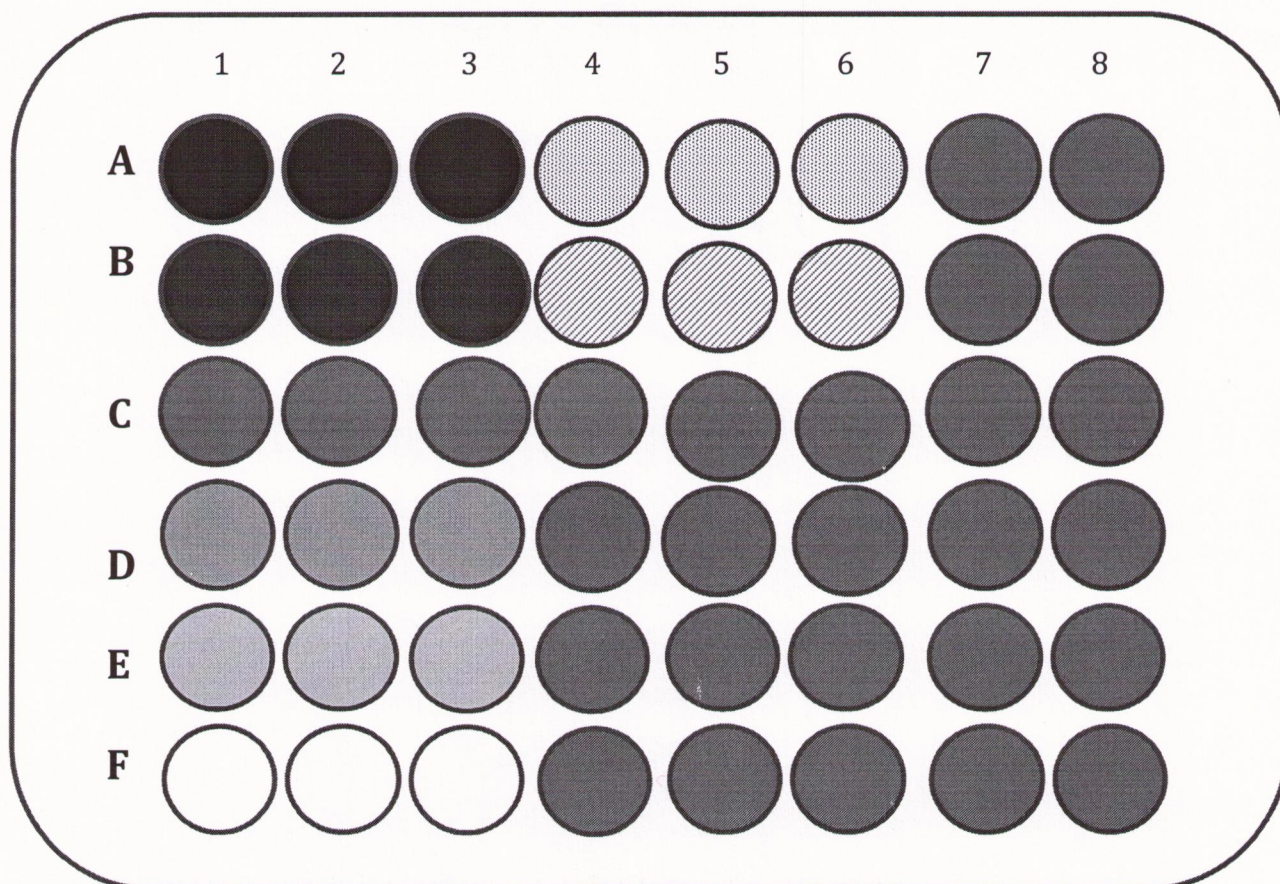


Рисунок 2. – Схема внесения образцов в планшет: 1А-Ф, 2А-Ф, 3А-Ф - суспензия клеток и различные разведения образцов бактериальных супернатантов, 4А, 5А, 6А – положительный контроль: суспензия клеток с ФГА 2 мкг/мл, 4В, 5В, 6В – отрицательный контроль: суспензия клеток с фосфатно-солевым буфером.

По окончании инкубации во все лунки планшета вносят по 50 мкл рабочего раствора МТТ (5 мг/мл), тщательно перемешивают пипетированием.

Важно! Рабочий раствор МТТ не может храниться и готовится непосредственно перед использованием. Раствор МТТ готовят на фосфатно-солевом буфере (ФБР) в концентрации 5 мг/мл.

Затем планшет инкубируют 4 часа при +37°C. По окончании инкубации центрифугируют 15 минут при 1000 об/мин.

Супернатант удаляют и вносят в каждую лунку по 500мкл диметилсульфоксида (ДМСО). Ресуспенсируют и измеряют оптическую плотность на спектрофотометре (540 нм).

Митогенную активность (индекс стимуляции) рассчитывают по формуле: $ИС=(A2/A1)*100\%$, где А2 – значение оптической плотности образца со стимуляцией, в том числе и положительный контроль, а А1 – значение оптической плотности без стимуляции, отрицательный контроль.

4.5 Приготовление рабочего раствора бактериального супернатанта

Приготовление рабочего разведения бактериального супернатанта является последним шагом данного этапа исследований, который позволяет подобрать рабочее разведение используемых образцов. Исходя из результатов исследований митогенной активности бактериальных супернатантов, выбирают рабочее разведение. Рекомендуется разведение, обеспечивающее 50% от максимального пролиферативного индекса.

Разведенный бактериальный супернатант аликвотируют и хранят при -20°C до использования.

4.6 Получение популяции CLA+Т-лимфоцитов из периферической крови

На данном этапе осуществляют забор периферической крови пациентов с псориазом.

Получение нужной популяции клеток осуществляют методом пэннинга с применением поликлональных антител (анти-CLA+ кроличьи (IgG)), сорбированных на дно 12-ти луночного культурального планшета.

4.6.1 Подготовка культурального планшета для выделения CLA+Т-лимфоцитов

Подготовку культурального планшета осуществляют в несколько шагов, включающих в себя сорбцию антител (поликлональных анти-CLA+ кроличьих IgG), отмывку с последующей блокировкой альбумином:

1. поликлональные антитела разводят до концентрации 10 мкг/мл в стерильном ФБР и вносят в лунки стерильного культурального планшета (не менее 300мкл) и оставляют на ночь при +4°C, не допуская высыхания.

Оставшийся раствор антител, в соответствии с рекомендациями производителя, помещают для длительного хранения на -20°C и для последующих постановок – на +4°C -+8°C.

2. Культуральный планшет дважды отмывают от неприкрепившихся антител с помощью охлажденного ФБР.

3. Свободные участки связывания на планшете блокируют с помощью 0,2% раствора альбумина человека на фосфатно-солевом буфере (ФБР). Для этого вносят раствор альбумина по 300 мкл в каждую лунку культурального планшета и инкубируют не менее 30 минут при комнатной температуре.

По окончании инкубации планшет отмывают однократно охлажденным ФБР. Культуральный планшет готов для использования, допускается хранение планшета не более 7 дней при температуре от +4°C до +8°C, избегая высыхания.

4.6.2 Получение CLA+T-лимфоцитов из мононуклеаров периферической крови

Получение CLA+T-лимфоцитов также осуществляют в несколько шагов:

1. выделяют мононуклеары периферической крови, методом градиентного центрифугирования, согласно общепринятой методике.

2. С помощью камеры Горяева определяют количество клеток и их жизнеспособность (в 1% растворе трипанового синего, согласно общепринятой методике). Концентрацию клеток доводят до рабочей (1×10^6 кл/мл) 0,2% раствором альбумина в ФБР.

3. В лунки 12-луночного культурального планшета (с сорбированными на дне лунок антителами) вносят по 1 мл суспензии клеток в рабочем разведении.

4. Планшет с клетками инкубируют 40 минут при $+37^\circ\text{C}$, 5% CO_2 .

5. Несвязавшиеся клетки удаляют с помощью однократной отмывки 0,2% раствором альбумина в ФБР. Вносят полную питательную среду RPMI-1640, содержащую 10% эмбриональную бычью сыворотку, глютамин и смесь антибиотиков для клеточных культур.

4.7 Стимуляция CLA+T-клеток бактериальным супернатантом

К полученной культуре CLA+T-лимфоцитов, находящейся в питательной среде RPMI-1640 (10% бычьей эмбриональной сыворотки) в 12-луночных культуральных планшетах, добавляют по 300 мкл супернатанта на лунку (в концентрации, подобранной в результате оценки митогенной активности супернатантов в МТТ-тесте), тщательно пипетируют и инкубируют 24 часа, при $+37^\circ\text{C}$ и 5% CO_2 .

Реакция сопровождается постановкой контролей:

1. положительный контроль – в лунку с лимфоцитами добавить ФГА в конечной концентрации 5 мкг/мл;
2. отрицательный контроль – лимфоциты без стимуляторов. Желательно все пробы ставить в дублях.

По истечении срока инкубации отбирают питательную среду и исследуют содержание ИФН- γ методом ИФА согласно инструкции

производителя набора. Рекомендуется использовать наборы для количественного определения методом ИФА с чувствительностью не менее 5 пг/мл.

Из сорбированных на дне планшета CLA+T-клеток выделяют РНК и осуществляют ее обратную транскрипцию с применением коммерческих наборов согласно протоколу фирмы-производителя. Количественную ПЦР проводят с помощью соответствующих праймеров к генам цитокинов ИФН- γ и ИЛ-22.

Эффективность амплификации рассчитывают по углу наклона стандартной кривой (α), $E = 10e(1/\alpha)$ или $E(\%) = (E - 1) * 100 \%$.

Расчет относительной экспрессии цитокинов проводят по методу дельта-дельта Ct ($\Delta\Delta Ct$), используя бета-актин в качестве нормировочного гена. Относительный уровень экспрессии генов рассчитывают по формуле $= 2e^{(\Delta\Delta Ct)}$.

5 Учёт и интерпретация результатов оценки экспрессии генов цитокинов и T-клеточного рецептора

После проведения исследования и получения значений показателей проводят их сравнение с пороговыми значениями. Ниже в таблице представлены в порядке их значимости пороговые значения показателей, позволяющих определить наличие сенсibilизации иммунной системы пациента к бактериальным компонентам нормальной микрофлоры.

Выявлены чувствительность и специфичность показателей, которые определены методом ROC-анализа:

Чувствительность – вероятность положительного результата теста при наличии осложнений.

Специфичность – вероятность отрицательного результата теста при отсутствии осложнений.

Таблица 1 – Функциональные показатели CLA+T-лимфоцитов, позволяющие выявить наличие сенсibilизации к бактериальным компонентам

Показатель	Пороговое значение	Площадь ROC	Стандартная ошибка	Уровень значимости p
Относительная количественная экспрессия ИЛ-22	$\Delta\Delta Ct$ выше 3,0	0,875	0,114	0,055
Относительная количественная экспрессия ИФН- γ	$\Delta\Delta Ct$ выше 2,0	0,917	0,095	0,033
Относительная количественная экспрессия генов β цепи Т-клеточного рецептора	$\Delta\Delta Ct$ выше 2,0	0,917	0,095	0,033
Стимулированная продукция ИФН- γ in vitro (пг/мл)	Выше 7000,0	0,94	0,087	0,031

Исходя из пороговых значений, указанных в таблице для четырех критических прогностических показателей, оценивают наличие сенсibilизации иммунной системы к бактериальным компонентам.

Тесты, свидетельствующие о наличии сенсibilизации:

1. Превышение стимулированной экспрессии гена ИЛ-22 ($\Delta\Delta Ct$) свыше 2,0 по сравнению с отрицательным контролем.
2. Превышение стимулированной экспрессии гена ИФН- γ ($\Delta\Delta Ct$) свыше 3,0 по сравнению с отрицательным контролем.
3. Превышение стимулированной продукции ИФН- γ в 2 и более раз по сравнению с отрицательным контролем.
4. Отклонение экспрессии β -цепи Т-клеточного рецептора ($\Delta\Delta Ct$) свыше 2,0

6 Перечень возможных ошибок при выполнении исследования и пути их устранения

1. Несоблюдение температурного режима при выделении клеток приводит к их агрегации и невозможности проведения исследования;
2. Нарушение технологии выполнения анализа, которая не соответствует технологии работы, принятой в клинико-диагностических лабораториях при проведении иммунологических исследований;
3. Нарушение правил забора и хранения образцов.