

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневич

«16» декабря 2016 г.

Регистрационный № 088-1116

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТАДИИ ИММУНОДЕПРЕССИИ
У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

Учреждение образования

«Гродненский государственный медицинский университет»,

Государственное учреждение

«Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и
микробиологии»

АВТОРЫ:

д.м.н., доцент Н. В. Матиевская, д.м.н., профессор В. М. Цыркунов,
к.м.н. А. Е. Гончаров, И. О. Токунова.

Гродно 2016

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод определения стадии иммунодепрессии у ВИЧ-инфицированных пациентов, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение ВИЧ-инфекции.

Инструкция предназначена для врачей-инфекционистов, врачей-лаборантов и иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь ВИЧ-инфицированным пациентам.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Установленный диагноз ВИЧ-инфекции.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАГЕНТОВ И РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Оборудование:

- проточный цитофлуориметр (минимум 4 канала флуоресценции);
- центрифуга низкоскоростная (1000–3000 об/мин);
- шейкер орбитальный;
- весы лабораторные;
- автоматические дозаторы на разные объёмы;
- контейнеры для хранения и транспортировки пробирок с кровью;
- штативы для пробирок;
- мерные колбы для приготовления растворов;
- ёмкости для хранения и дезинфекции отработанного биологического материала.

Расходные материалы:

- наконечники пластиковые с аэрозольным барьером объемом 1–5 мл, 0,01–0,1 мл, 0,1–1,0 мл и 0,5–10 мл;
- пробирки для цитофлуориметра;
- вакутайнеры с ЭДТА.

Реагенты:

- моноклональные антитела к антигенам человека: CD4, CD45, CD184, CD195;
- неорганические соли (натрия фосфат двузамещенный двенадцативодный, натрия хлорид, калия фосфат однозамещенный безводный, калия хлорид, калия гидрокарбонат, аммония хлорид);
- тетранатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты;
- параформальдегид;
- вода аналитического качества.

Панели антител подбирают таким образом, чтобы антитела к CD184 и CD195 были конъюгированы с наиболее яркими из доступных флуорохромов: Brilliant Violet 421, фикоэритрином (PE), аллофикоцианином (APC), тандемом

фикоэритрина и Cy7 (PE-Cy7). Антитела к молекулам CD4 и CD45 могут быть конъюгированы с любым другим флуорохромом, который позволяет четко идентифицировать позитивную/негативную популяции клеток, и требует минимальной спектральной компенсации. Для уточнения списка флуорохромов, пригодных для использования, см. инструкцию по эксплуатации проточного цитофлуориметра.

К примеру, может быть предложена следующая панель антител:
CD4 FITC, CD184 PE, CD45 PerCP-Cy5.5, CD195 APC.

Приготовление растворов

Растворы готовят согласно приведенным ниже прописям и хранят до использования при температуре от +2 до +8°C в течение не более 1 месяца.

Лизирующий раствор (10× раствор, 100 мл):

- аммония хлорид – 8,29 г.;
- калия гидрокарбонат – 1,0 г.;
- тетранатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты – 0,37 г.;
- воды аналитического качества до 100 мл.

Фиксирующий раствор (1× раствор, 100 мл):

- параформальдегид – 4,0 г.;
- калия фосфат однозамещенный безводный – 0,2 г.;
- хлорид калия – 0,2 г.;
- натрия фосфат двузамещенный двенадцативодный – 2,9 г.;
- натрия хлорид – 8,0 г.;
- воды аналитического качества до 100 мл.

Средства индивидуальной защиты и дезинфектанты:

- лабораторный халат;
- латексные или нитриловые перчатки;
- дезинфицирующий раствор, предназначенный для обработки рук персонала;
- дезинфицирующий раствор для инактивации биологического материала.

ОПИСАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Забор, транспортировка и хранение материала, анализ данных осуществляется общепринятыми методами.

Интерпретация данных

Определяется показатель соотношения экспрессии хемокиновых рецепторов CXCR4 (CD184)⁺ / CCR5 (CD195)⁺ на лимфоцитах крови.

В случае, если показатель равен 0,4 или ниже, у ВИЧ-инфицированного пациента определяется стадия выраженной иммунодепрессии, независимо от клинических проявлений заболевания и содержания CD4⁺ лимфоцитов.

Если у пациента определяется стадия выраженной иммунодепрессии, принимается управленческое решение:

- назначается антиретровирусная терапия независимо от уровня CD4⁺ лимфоцитов и клинических проявлений заболевания;
- проводится профилактика оппортунистических инфекций.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ПРОБЛЕМ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ МЕТОДА И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Проблема	Возможная причина	Пути устранения
Анализ иммунофенотипа: слабая интенсивность свечения, плохое разделение популяций	Недостаточное количество антител	Добавить достаточное количество антител
	«Выгорание» флуорохромов	Инкубация клеток в темноте, сведение времени манипуляций с клетками к минимуму
	«Тусклые» флуорохромы	Использовать наиболее яркие флуорохромы (BV421, PE, APC, PE-Cy7)
	Недостаточное смешивание антител с пробой	Тщательно смешивать антитела с клетками
	Некорректно выполненная настройка цитометра	Настраивать цитофлуориметр согласно инструкции по эксплуатации
Высокая фоновая флуоресценция	Клетки не отмыты от антител	Тщательно отмывать клетки в буфере для окрашивания
	Некачественные антитела	Использовать другие антитела
	Некорректно выполненная настройка цитометра	Настраивать цитофлуориметр согласно инструкции по эксплуатации
Чрезмерные потери клеток	Недостаточное время центрифугирования	Соблюдать время центрифугирования
	Некорректное удаление супернатанта	Правильно удалять супернатант
	Непригодные растворы, длительное время инкубации	Следовать пунктам инструкции
Недостаточный лизис эритроцитов	Неправильно приготовленный раствор	Строгое соблюдение правил подготовки раствора
	Некорректный температурный режим	Лизис при комнатной температуре
	Недостаточное перемешивание	Двукратное перемешивание на шейкере

название	УТВЕРЖДАЮ	
учреждения	Главный врач	
Здравоохранения	_____201_____ МП	_____ И.О.Фамилия

А К Т

учёта практического использования инструкции по применению

1. Инструкция по применению: «Метод диагностики стадии иммунодепрессии у ВИЧ-инфицированных пациентов».

2. Утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь _____ № _____

3. Кем предложена разработка: сотрудниками кафедры инфекционных болезней УО «Гродненский государственный медицинский университет» доцентом Н. В. Матиевской, профессором В. М. Цыркуновым, заведующим лабораторией иммунологии и клеточной биотехнологии ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» А. Е. Гончаровым, И. О. Токуновой.

4. Материалы инструкции использованы для _____

5. Где внедрено: _____

подразделение и название учреждения здравоохранения

6. Результаты применения метода за период с _____
по _____

общее кол-во наблюдений «_____»

положительные «_____»

отрицательные «_____»

7. Эффективность внедрения (восстановление трудоспособности, снижение заболеваемости, рациональное использование коечного фонда, врачебных кадров и медицинской техники) _____

8. Замечания, предложения: _____

_____201____ Ответственные за внедрение

Должность	подпись	И.О.Фамилия
-----------	---------	-------------

Примечание: акт о внедрении направлять по адресу:
кафедра инфекционных болезней
УО «Гродненский государственный медицинский университет»
ул. Горького, 80, 230009, г. Гродно

Репозиторий ГрГМУ

название	УТВЕРЖДАЮ	
учреждения	Главный врач	
Здравоохранения	_____201_____ МП	_____ И.О.Фамилия

А К Т

учёта практического использования инструкции по применению

1. Инструкция по применению: «Метод диагностики стадии иммунодепрессии у ВИЧ-инфицированных пациентов».

2. Утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь _____ № _____

3. Кем предложена разработка: сотрудниками кафедры инфекционных болезней УО «Гродненский государственный медицинский университет» доцентом Н. В. Матиевской, профессором В. М. Цыркуновым, заведующим лабораторией иммунологии и клеточной биотехнологии ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» А. Е. Гончаровым, И. О. Токуновой.

4. Материалы инструкции использованы для _____

5. Где внедрено: _____

подразделение и название учреждения здравоохранения

6. Результаты применения метода за период с _____
по _____

общее кол-во наблюдений «_____»

положительные «_____»

отрицательные «_____»

7. Эффективность внедрения (восстановление трудоспособности, снижение заболеваемости, рациональное использование коечного фонда, врачебных кадров и медицинской техники) _____

8. Замечания, предложения: _____

_____201____ Ответственные за внедрение

Должность

подпись

И.О.Фамилия

Примечание:

акт о внедрении направлять по адресу:

кафедра инфекционных болезней

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

ул. Горького, 80, 230009, г. Гродно

Научное издание

Матиевская Наталья Васильевна
Цыркунов Владимир Максимович
Гончаров Алексей Евгеньевич и др.

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТАДИИ ИММУНОДЕПРЕССИИ
У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ**

инструкция по применению

Компьютерная верстка И. И. Прецкайло

Подписано в печать 10.01.2017.
Формат 60х84/16. Бумага офсетная.
Гарнитура Таймс. Ризография.
Усл. печ. л. **0,47**. Уч.-изд. л. **0,28**. Тираж **40** экз. Заказ **21**.

Издатель и полиграфическое исполнение
учреждение образования
«Гродненский государственный медицинский университет».

ЛП № 02330/445 от 18.12.2013. Ул. Горького, 80, 230009, Гродно.