



«УТВЕРЖДАЮ»

Первый заместитель Министра
Д.Л. Пиневиц

«*06*» *сентября* 2019 г.

Регистрационный номер № 007-0219

МЕТОД ДИАГНОСТИКИ КАНДИДОЗА

(инструкция по применению)

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

Авторы: к.м.н. Карпук Н.А., д.м.н., профессор Рубникович С.П., д.м.н., доцент Карпук И.Ю., Пожарицкая А.А.

Витебск-Минск, 2019

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику кандидоза (В37), путем определения в крови содержания $CD4^+CD25^+CD45^+$ Т-лимфоцитов и при наличии их прироста более чем на 23% после постановки лабораторного теста с *Candida albicans* по сравнению с контрольной пробой.

Метод, изложенный в настоящей инструкции, предназначен для врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с кандидозом.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, РЕАГЕНТОВ И Т.Д.

1. Термостат.
2. Стерильные пробирки 10-20 мл (20-30 шт.).
3. Микро пробирки 1,5 мл с крышкой (10-20 шт.).
4. Холодильник.
5. Автоматические дозаторы 20-200 мкл.
6. Проточный цитофлюориметр (чувствительность и разрешение – определение частиц диаметром от 0,5 мкм до 40 мкм. Скорость анализа – от 3300 событий в секунду до 10000 событий в секунду. Скорость потока пробы - 4,17-100 мкл/мин.).
7. Вортекс для перемешивания.
8. Моноклональные антитела CD4, CD25, CD45.
9. Гепарин.
10. Раствор, лизирующий эритроциты.
11. Физиологический раствор хлорида натрия на фосфатном буфере (ФРФ) pH 7,2.
12. Физиологический раствор хлорида натрия 0,9%.
13. Суспензия с концентрацией *Candida albicans* 5×10^7 клеток в 1 мл.

14. Скошенный агар с глюкозой.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Кандидоз (В37).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Абсолютные противопоказаний нет.

Ограничения к применению:

1. Отсутствие возможности забора 3 мл крови.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА С УКАЗАНИЕМ ЭТАПОВ

1. Подготовка *Candida albicans* к постановке теста.

Candida albicans культивируют в течение 24 ч на скошенном агаре с глюкозой. Затем клетки *Candida albicans* смывают физиологическим раствором хлорида натрия, дважды отмывают и готовят суспензию с концентрацией *Candida albicans* 5×10^7 клеток в 1 мл.

2. Проводят лабораторный тест с *Candida albicans* для обнаружения CD4⁺CD25⁺CD45⁺ Т-лимфоцитов.

Для этого забирают 2 мл крови из локтевой вены натощак в утреннее время в стерильную пробирку с гепарином (20 ед/мл). Далее в 2 пробирки с питательной средой вносят по 100 мкл крови. В одну пробирку добавляют 2,5 мкл *Candida albicans* (опытная проба), в другую – 2,5 мкл забуференного физиологического раствора (ЗФР) (контрольная проба).

Полученные образцы культивируют в течение 24 часов при 37°C в термостате. Затем добавляют в каждую пробирку по 2,5 мкл раствора анти-CD4CD25CD45 моноклональных антител. Содержимое пробирок перемешивают на вортексе и инкубируют 15 минут при комнатной температуре. Затем в каждую пробирку добавляют по 500 мкл раствора, лизирующего эритроциты и инкубируют при температуре 37°C еще 10 мин, далее в каждую пробирку добавляют по 500 мкл буферного раствора и

помещают пробирки в проточный цитофлуориметр и производят учет результатов.

5. Учет результатов.

При учете результатов используют проточный цитофлуориметр с аргоновым лазером (исходная длина волны 488 нм) и гелий-неоновым лазером (исходная длина волны 633 нм) в качестве источников света. Результаты анализа образцов регистрируют при длинах волн от 488 нм до 725 нм. Результаты обрабатывают с помощью компьютерной программы.

Реакция считается положительной (диагностируют наличие кандидоза), если выявляется в опытной пробе прирост $CD4^+CD25^+CD45^+$ Т-лимфоцитов более чем на 23% по сравнению контрольной пробой.

Положительный эффект предполагаемого изобретения заключается в том, что способ обладает высокой диагностической чувствительностью и специфичностью.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Осложнений нет.

Ошибки могут быть связаны с нарушением технологии выполнения анализа:

- 1) использование крови, хранившейся более 2–3 ч с момента получения материала, приводит к искажению результатов исследований;
- 2) использование стеклянных пробирок вместо пластиковых приводит к активации клеток вследствие контакта со стеклом;
- 3) несоблюдение условий приготовления и хранения аллергенов.

Пути устранения:

1. Исследование венозной крови не позднее 2 ч с момента получения.
2. Использование пробирок из пластика.

3. Человеческий сывороточный альбумин в концентрации 2 г/л добавлять к 0,01% раствору солей металлов непосредственно перед использованием. Рабочую суспензию хранить в холодильнике.

Контроль качества лабораторных исследований осуществляется методом исследования параллельных и повторных проб согласно приказу Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 10.09.2009 № 873 «Об утверждении инструкций по контролю качества клинических лабораторных исследований». При выполнении исследований необходимо соблюдать меры безопасности согласно действующим приказам ТНПА.