



ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ГКНТ СССР

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

1

- (21) 4450822/14
(22) 30.06.88
(46) 23.10.91. Бюл. № 39
(71) Украинский научно-исследовательский ветеринарный институт
(72) В.Г.Квачев
(53) 615.375 (088.8)
(56) Авторское свидетельство СССР № 1174033, кл. А 61 К 39/00, 23.08.85.
(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА
(57) Изобретение относится к ветеринарии, медицине и биологии, точнее к разделу клеточной иммунологии, и может быть использо-

Изобретение относится к медицине, ветеринарии и биологии, разделу клеточной иммунологии и может быть использовано для определения клеточного иммунитета организма в клинических и научно-исследовательских медицинских и ветеринарных лабораториях.

Целью изобретения является повышение точности и сокращение времени определения. Способ осуществляют следующим образом.

Отбирают пробу крови объемом 1-2 мл с добавлением 8-10 ед. гепарина на 1 мл крови. Кровь отстаивают при комнатной температуре 0,5-1,0 ч, отбирают слой лейкоцитов с плазмой, переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют 10 мин при 800 об/мин. Плазму крови отсасывают, а из осадка лейкоцитов готовят суспензию, содержащую $1,5 \times 10^6$ - $2,0 \times 10^6$ клеток в 1 мл питательной среды.

Суспензию лейкоцитов наносят на обезжиренное стекло в виде капель и помещают во влажную камеру. Лейкоциты инкубируют

2

вано для характеристики состояния клеточного иммунитета организма в ветеринарных и медицинских лабораториях иммунологического профиля. Цель - повышение точности и сокращение времени исследования. Цель достигается введением в суспензию лейкоцитов за 30-40 мин до окончания культивирования взвеси инактивированных стафилококков из расчета 150-200 млн микробных тел на 1 мл суспензии лейкоцитов с дополнительной оценкой клеточного иммунитета по фагоцитарной активности лейкоцитов и количеству бластов в одном препарате. 2 табл.

при 4-8°C в течение 1-2 ч. За 30-40 мин до окончания инкубации в суспензию лейкоцитов вносят взвесь инактивированных стафилококков из расчета 150-200 млн микробных тел на 1 мл суспензии клеток. По окончании инкубации стекла вынимают из камеры, споласкивают дистиллированной водой, высушивают на воздухе, фиксируют и окрашивают по Паппенгейму. Клеточный иммунитет определяют путем микроскопирования 100-200 мононуклеарных лейкоцитов и подсчета среди них числа бластных клеток лимфоидной природы и нелимфоидной (по размерам, соотношению ядра и цитоплазмы, конденсации хроматина ядра) и определения в этих же клетках на тех же препаратах показателей фагоцитарной активности по поглощению ими инактивированных стафилококков.

Результаты реакции учитывают в следующих показателях.

Относительное содержание трансформированных лимфоцитов

$$A = \frac{B \times 100 \%}{B + C}$$



где А — показатель трансформированных лимфоцитов, %;

В — количество трансформированных лимфоцитов;

С — количество нетрансформированных лимфоцитов.

Относительное содержание трансформированных клеток нелимфоидной природы

$$Д = \frac{Е \times 100 \%}{Е + К},$$

где Д — показатель трансформированных нелимфоидных клеток, %;

Е — количество нелимфоидных трансформированных клеток;

К — количество нетрансформированных клеток.

Фагоцитарный показатель

$$Н = \frac{T \times 100 \%}{T + P},$$

где Н — фагоцитарный показатель, %;

Т — количество фагоцитирующих мононуклеарных лейкоцитов;

Р — количество нефагоцитирующих мононуклеарных лейкоцитов.

Фагоцитарное число

$$\Phi = \frac{Л}{М},$$

где Ф — фагоцитарное число;

Л — количество поглощенных кокков;

М — количество мононуклеарных лейкоцитов, в которых подсчитывали поглощенные кокки.

Число трансформированных лимфоцитов у здоровых людей 41%, трансформированных клеток нелимфоидной природы 22%, фагоцитарный показатель 63%, фагоцитарное число 8.

Учет реакции по бластной трансформации клеток и их фагоцитарной активности прост, удобен, доступен лабораторному работнику средней квалификации. Бластные клетки легко идентифицируются ввиду их крупных размеров (в 2-4 раза больше лимфоцитов), отчетливого увеличения площади цитоплазмы, преобладания в ядре нежного эухроматина ярко — розового окрашивания.

Полученные результаты обрабатывают статистически. Для этого удобен метод Монцевичуте — Эрингене.

Пример 1. Определение клеточного иммунитета больных хронической пневмонией.

На стационарном лечении находилось 12 больных в возрасте 29-52 лет с диагнозом: хроническая рецидивирующая пневмония, пневмосклероз. Диагноз установлен на основании анамнестических аускультативных, рентгенологических данных и результатах функциональной диагностики.

В результате проведенного лечения через 24-31 день состояние у всех больных улучшилось и они в удовлетворительном состоянии были выписаны из стационара. Субъективное улучшение сопровождалось улучшением аускультативной, рентгенологической симптоматики и функциональных проб.

При поступлении и перед выпиской у больных отбирали пробы крови и проводили определение клеточного иммунитета согласно предложенному способу.

Для этого у больных отбирали кровь из локтевой вены в объеме 2 мл в обработанные гепарином пробирки, отстаивали 40 мин, переносили взвесь лейкоцитов в центрифужную пробирку и центрифугировали 20 мин при 800 об./мин. Плазму отсасывали, а к лейкоцитам добавляли питательную среду до конечной концентрации $2,0 \times 10^6$ клеток в 1 мл суспензии.

Суспензию клеток наносили в виде капли на предметные стекла, помещали во влажную камеру и инкубировали при 4°C 2 ч. За 40 мин до окончания инкубации в тех же препаратах к каждой капле суспензии клеток добавляли равные по объему капли взвеси инактивированных стафилококков (150 млн. микробных тел в 1 мл). По завершении инкубации стекла вынимали из камер, споласкивали дистиллированной водой, подсушивали, фиксировали 10 мин в метаноле и окрашивали по Паппенгейму. После подсчета 100-200 клеток в каждом препарате определяли количество трансформированных лимфоцитов, трансформированных клеток нелимфоидной природы и в этих же клетках — показатели их фагоцитарной активности. Результаты исследований представлены в табл. 1.

Из приведенных в табл. 1 данных следует, что определенный по предлагаемому способу уровень клеточного иммунитета коррелирует с изменением клинического состояния больных. Повышение трансформационной и фагоцитарной активности при выписке свидетельствует о нормализации подавленной клеточной иммунологической реактивности больных хронической пневмонией и сопровождается улучшением их общего состояния, аускультативных и рентгенологических данных. Определение клеточного иммунитета согласно предлагаемому способу по трансформационным и фагоцитарным показателям в одном препарате позволяет более точно, статистически достоверно установить различия клеточного иммунитета, в то время как по известному способу выявленные различия статистически недостоверны. Кроме того, значительно сокращается продолжительность исследований, так как определение клеточного иммунитета по фагоцитарной активности согласно извест-

ному способу требует 4-5 ч, а по предлагаемому способу — 30-40 мин.

П р и м е р 2. Определение клеточного иммунитета, заболеваемости и сохранности поросят различных пород.

Определяли клеточный иммунитет у 20-дневных поросят пород "ландрас" и "крупная белая" в животноводческом хозяйстве промышленного типа. С этой целью животных каждой породы объединяли в группы (по 30 голов в каждой) и проводили определение клеточного иммунитета согласно предлагаемому способу, а также регистрировали их заболеваемость и сохранность в течение последующих 30 дней наблюдений.

Для определения клеточного иммунитета у всех животных отбирали из ушных вен по 5 мл крови с гепарином и готовили взвеси лейкоцитов содержащие $2,0 \times 10^6$ клеток в 1 мл. Взвести лейкоцитов наносили на отдельные предметные стекла в виде капель и помещали во влажную камеру. Лейкоциты инкубировали при 4°C в течение 2 ч. За 30 мин до окончания инкубации к каждой капле клеточной суспензии добавляли равные по объему капли взвеси инактивированных стафилококков, содержавшей 200 млн. микробных тел в 1 мл. По завершении инкубации стекла вынимали из камеры, споласкивали дистиллированной водой, подсушивали, фиксировали 5 мин. в метаноле и окрашивали по Паппенгейму. При микроскопическом исследовании 100 клеток в каждом препарате подсчитывали количество трансформированных лимфоцитов, трансформированных клеток нелимфоидной природы, а также в этих клетках определяли фагоцитарный показатель и фагоцитарное число (см. табл. 2). Заболеваемость и сохранность поросят определяли путем ежедневных клинических наблюдений.

Из представленных в табл. 2 данных следует, что уровень клеточного иммунитета, определенный согласно предлагаемому способу, статистически достоверно выше у поросят породы "ландрас". Дальнейшие наблюдения за животными показали, что у этих же поросят на 12% ниже заболеваемость и на 3,3% выше сохранность. Это указывает на высокую точность определения у них клеточного иммунитета и возможность прогнозирования по этим показателям ущерба от заболеваемости. Расчетный экономический эффект определения клеточного иммунитета по предлагаемому способу составил

$$A = B - C,$$

где A — расчетный экономический эффект;

B — стоимость прогнозируемого ущерба (4 головы \times 12,0 кг \times 2,5 руб.);

C — затраты на проведение исследований

$$A = 4 \text{ гол.} \times 12,0 \text{ кг} \times 2,5 \text{ руб.} - 10 \text{ руб.} = 410 \text{ руб. или } 36,6 \text{ тыс. руб. в год в хозяйстве на } 800 \text{ основных свиноматок.}$$

Следует отметить, что определение в данном примере клеточного иммунитета только по бластным клеткам (как это предлагает известное техническое решение) не обеспечивает получения статистически достоверных данных и не определяет клеточный иммунитет с необходимой для прогнозирования заболеваемости и ущерба точностью.

Таким образом, по сравнению с известным, предложенный способ позволяет в более короткие сроки (2 ч, а по известному способу только определение фагоцитарной активности требует 4-5 ч и с более высокой точностью определить состояние клеточного иммунитета. Его использование позволяет избежать ошибок в оценке клеточного иммунитета у больных с инфекционными и другими заболеваниями, при проведении у них лечебных мероприятий. Предлагаемый способ более точно устанавливает клеточный иммунитет у животных, что позволяет повысить экономический эффект и результативность исследований по отбору животных с высокой устойчивостью к заболеваниям.

Способ технологически не сложен, не требует дефицитных или импортных реактивов и оборудования и может быть использован в медицинских и ветеринарных лабораториях в качестве экспресс-метода диагностики и прогнозирования заболеваний человека и животных.

Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

Способ определения клеточного иммунитета, включающий выделение лейкоцитов из крови, культивирование их на предметных стеклах и подсчет бластных клеток, отличающийся тем, что, с целью повышения точности и сокращения времени определения, к суспензии лейкоцитов добавляют взвесь инактивированного стафилококка, при этом вносят его в количестве 150-200 млн микробных тел на 1 мл суспензии за 30-40 мин до окончания культивирования и дополнительно определяют фагоцитарную активность лейкоцитов в том же препарате.

Таблица 1

Показатели клеточного иммунитета больных хронической пневмонией

Наблю- дение	При поступлении				При выписке			
	Лимфоб- ласты, %	Транс- формиро- ванные не лимф. клетки, %	Фагоци- тарный показа- тель, %	Фагоци- тарное число	Лимфоб- ласты, %	Транс- формиро- ванные не лимф. клетки, %	Фагоци- тарный показа- тель, %	Фагоци- тарное число
1	28	24	54	6	40	32	62	6
2	37	26	48	6	39	26	59	9
3	39	26	61	8	44	29	74	8
4	33	23	60	5	40	27	66	8
5	34	26	46	7	39	25	71	7
6	38	25	55	6	41	26	70	9
7	37	28	58	5	40	28	66	9
8	35	21	49	5	42	21	69	10
9	38	24	61	7	39	24	65	8
10	29	24	57	7	45	23	71	11
11	37	21	54	5	37	26	64	9
12	34	26	60	6	44	24	76	9
	$34,9 \pm 3,38$	$24,5 \pm 2,0$	$55,2 \pm 5,0$	$6,1 \pm 0,95$	$40,8 \pm 2,34$	$25,9 \pm 2,8$	$67,8 \pm 4,8$	$8,6 \pm 1,4$

$p > 0,05$ $p > 0,1$ $p < 0,05$ $p < 0,1$

Таблица 2

Показатели клеточного иммунитета, заболеваемости и сохранности поросят различных пород

Порода животных	Показатели клеточного иммунитета				Заболева- емость, %	Падеж, гол.	Сохран- ность, %
	Лимфоб- ласты, %	Трансфор- мирован- ные нелимф. клетки	Фагоци- тарный показа- тель, %	Фагоци- тарное число			
Ландрас	$36,8 \pm 4,1$	$29,0 \pm 3,3$	$61,4 \pm 5,8$	$11,4 \pm 1,8$	14	2	93,3
Белая крупная	$32,4 \pm 3,8$ $p > 0,1$	$26,1 \pm 4,0$ $p > 0,1$	$49,9 \pm 4,0$ $p < 0,05$	$8,0 \pm 1,1$ $p < 0,005$	26	6	80

Редактор Л. Лашкова Составитель Г. Крюкова
Техред М. Моргентал Корректор М. Дечик

Заказ 3594 Тираж Подписное
ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г. Ужгород, ул. Гагарина, 101