



ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ  
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ  
ПРИ ГКНТ СССР

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(21) 4458984/14

(22) 12.07.88

(46) 23.02.91. Бюл. № 7

(71) Киевский медицинский институт  
им. акад. А.А.Богомольца

(72) Н.И.Якуба, А.А. Андрушук,  
Л.И.Скрипка и Е.Ф.Чернушенко

(53) 615.375 (088.8)

(56) Чернушенко Е.Ф. и Колосова Л.С.  
Иммунологические исследования в кли-  
нике. - Киев: Здоровье, 1978,  
с.47 - 48.

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИММУНОЛОГИ-  
ЧЕСКОЙ РЕАКТИВНОСТИ ОРГАНИЗМА

(57) Изобретение относится к медицине  
и может найти применение в диагнос-  
тике специфического клеточного имму-  
нитета при острых и хронических за-  
болеваниях инфекционно-аллергического  
или аутоиммунного генеза. Цель изобре-

Изобретение относится к медицине  
и может найти применение в диагнос-  
тике специфического клеточного имму-  
нитета, а также установления его ти-  
па при острых и хронических заболе-  
ваниях инфекционного, аллергического,  
аутоиммунного, профессионального и  
др. генеза.

Цель изобретения - повышение  
точности способа за счет определе-  
ния рецепторного аппарата лимфоцитов  
и клеток.

Способ осуществляется следующим  
образом в два этапа.

1-й этап включает наложение анти-  
гена на латекс. К 1 мл суспензии из

2  
тения - повышение точности за счет  
определения рецепторного аппарата  
лимфоцитов и фагоцитов. Производят  
измерение люминисценции хемолюми-  
несценции нестимулированных сенсби-  
лизированных лейкоцитов, лейкоцитов,  
стимулированных латексом без антиге-  
на и лейкоцитов, стимулированных ла-  
тексом, нагруженным бактериальным  
или тканевым антигеном, сопоставля-  
ют полученные данные и при повыше-  
нии хемолюминисценции в пробе, содер-  
жащей специфический стимулятор, и от-  
сутствии разницы между показателями  
реакции на неспецифический стимулятор  
и без него определяют гиперинтенси-  
тип иммунной реакции, а при наличии  
разницы между ними определяют гипер-  
гический тип иммунной реакции. Точ-  
ность способа составляет 62%, по  
прототипу - 32%.

частиц латекса в концентрации  $10^9$  до-  
бавляют 1 мл антигенов (используются  
стандартные бактериальные, грибковые,  
пыльцевые, пищевые или производст-  
венные антигены, а также тканевые  
антигены, полученные общепринятым  
методом.

Смесь латекса и антигена помеща-  
ют в морозильное отделение холодиль-  
ника на 18 ч, после чего ее центри-  
фугируют, надосадочную жидкость вы-  
ливают, добавляют 1 мл физиологичес-  
кого раствора.

На 2-м этапе проводят исследова-  
ние люминисценции хемолюминисцен-  
ции сенсбилизированных лейкоцитов,

Кровь из пальца или вены набирают в 4 гепаринизированные капилляры. Герметически закрытые капилляры центрифугируют 5 мин при 1500 об/мин. Лейковзвесь из четырех капилляров, образованную на границе плазма - эритроцит, растворяют в 8 мл раствора Хенкса, образуя 16 проб (2 контрольных и 14 опытных). При необходимости исследовать одновременно большее или меньшее количество антигенов описанным способом готовят нужное количество проб из расчета: 1 капилляр периферической крови, растворенный в 1,5 мл раствора Хенкса на каждые 3 пробы.

Смесь лейкозвеси и раствора Хенкса разливают по 0,5 мл во флаконы для хемилюминесцентного исследования, после чего добавляют: в 1-й контрольный флакон 0,1 мл физиологического раствора, во 2-й контрольный флакон 0,1 мл раствора частиц латекса в дистиллированной воде в концентрации  $10^9$ , в 3 - 14-й опытные флаконы по 0,1 мл частиц латекса, нагруженного бактериальными, грибковыми или тканевыми антигенами в конечной концентрации  $10^9$ .

В каждую пробу добавляют 0,1 мл 2,8 ММ раствора люминола, пробы инкубируют в термостате 30 мин и проводят замер хемилюминесценции в режиме счета фотонов с помощью ФЭУ-39а.

Сопоставляют результаты хемилюминесценции, полученные во 2-й контрольной пробе с опытными, выявляя пробу, хемилюминесцентное свечение которой существенно выше по сравнению со 2-й контрольной, на основании чего диагностируют наличие специфической иммунной реакции по отношению к данному антигену.

Для уточнения напряженности иммунитета, т.е. типа иммунологической реакции сопоставляют показатели 1-й и 2-й контрольных проб, диагностируя гипергический тип клеточного иммунитета при отсутствии разницы между показателями спонтанной хемилюминесценции и стимулированной инертным латексом (неспецифическим стимулятором), тогда как гиперерический тип иммунной реакции определяют при наличии разницы между этими показателями.

**Пример 1.** Больной К., 7 лет, поступил в детское отделение с диагнозом: левосторонняя очаговосплавная

бронхопневмония ДН<sub>2</sub>, левосторонний экссудативный плеврит.

Иммунологическое исследование выполнено согласно методике, описанной в предыдущем разделе. У больного из пальца произведен забор крови в 3 гепаринизированные капилляра. Лейковзвесь из капилляров получали описанным способом, растворяли в 6 мл раствора Хенкса, смесь распределяли по 0,5 мл на 12 проб.

Ко всем пробам добавляли 0,1 мл 2,8 ММ люминола, пробы инкубировали в термостате в течение 30 мин и проводили измерение хемилюминесценции каждой пробы в течение 10 с. Получают хемилюминесцентное свечение в 1-й контрольной пробе в течение 12500 имп/с, а во 2-й контрольной пробе - 11950 имп/с.

Значения хемилюминесценции 1-й опытной пробы (стимулированной частицами латекса, нагруженными антигеном гемолитического стафилококка составили 19200 имп/с, что существенно выше по сравнению со второй контрольной пробой. Данные хемилюминесценции других опытных проб достоверно не отличались от 2-й контрольной пробы. На основании полученных данных диагностировано наличие специфической иммунной реакции по отношению к гемолитическому стафилококку. Отсутствие существенной разницы в показателях хемилюминесцентного свечения 1-й и 2-й контрольных проб позволяет определить гипергическую иммунную реакцию к выявленному антигену гемолитического стафилококка. Низкая напряженность иммунитета указывает на активный инфекционно-воспалительный процесс, вызванный стафилококковой инфекцией, что было подтверждено выявлением в плевральной жидкости гемолитического стафилококка в высоких титрах -  $10^6$ .

Полученные данные подтверждены также нарастанием титров антистафилококковых антител в динамике заболевания (через 2 недели от начала болезни титр антистафилококковых антител вырос в 6 раз по сравнению с исходным уровнем).

При исследовании известным способом существенной разницы в показателях спонтанной, стимулированной ФГА и стимулированной гемолитическим стафилококком РБТЦ не выявлено (процент бластных клеток соответственно

составил: 17%, 17,2% и 18,1%), в связи с чем определение реактивности специфического клеточного иммунитета было невозможным. Это свидетельствует о преимуществе предлагаемого способа по сравнению с известным, диагностика с помощью которого невозможна при гипергических реакциях иммунитета.

**Пример 2.** Больная К., 13 лет, поступила в стационар с диагнозом: хроническая пневмония в стадии ремиссии, деформирующий бронхит.

Проведено иммунологическое обследование по предлагаемому способу. Из двух капилляров крови, взятых у больной из пальца приготовлено 6 проб: 1-я контрольная с физиологическим раствором, 2-я контрольная с латексом без антигена, 1-я опытная с латексом, нагруженным легочным антигеном, 2-я опытная с латексом, нагруженным стафилококковым антигеном, 3-я опытная с латексом, нагруженным стрептококковым антигеном, 4-я опытная с латексом, нагруженным комплексным пневмококковым антигеном, 5-я опытная с латексом, нагруженным антигеном нейссерии катарралис, 6-я опытная с латексом, нагруженным синегнойной палочкой, 7-я опытная с латексом, нагруженным туберкулином.

В результате измерения хемилюминесценции подготовленных проб получены следующие результаты: 1-я контрольная проба 11200 имп/с, 2-я контрольная проба 17020 имп/с. Среди опытных проб повышение хемилюминесценции отмечалось в пробах 1-й, 5-й и 7-й, на основании чего диагностирована специфическая реакция иммунитета по отношению к легочному антигену, антигену нейссерии катарралис и туберкулину. Сопоставление результатов исследования 1-й и 2-й контрольной проб позволило установить существенное повышение хемилюминесцентного свечения в 1-й пробе по сравнению со 2-й, что свидетельствует о повышенной (гиперергической) реакции иммунитета к данным антигенам, что может быть связано с хроническим инфекционным процессом.

Проведенное обследование позволило уточнить окончательный диагноз: хроническая пневмония, гиперчувствительность замедленного типа в отношении легочного антигена, антигена нейссерии катарралис и туберкулина.

Установленный диагноз подтвержден путем проведения комплекса иммунологических исследований. Аутоиммунную реакцию на легочной антиген выявлено путем проведения реакции поглощения комплемента (по Кондрашовой Н.И.), которая была положительная (+++).

Специфичность антигена нейссерии катарралис и туберкулина подтверждена путем постановки кожных проб. Кожная проба с аллергеном нейссерии катарралис была положительная (+++) через 48 ч (отмечался волдырь в диаметре более 12 мм). Проба Манту - папула 19 мм (через 32 ч).

При исследовании известным способом РБТЛ спонтанная составляет 12%, РБТЛ с ФГА - 23%, РБТЛ с аллергеном нейссерии катарралис - 22,6%, РБТЛ с легочным антигеном - 23,6%, РБТЛ с туберкулином - 41,4%, что свидетельствует об отсутствии положительных реакций со специфическими антигенами легких (нейссерии катарралис): положительная реакция отмечена только в отношении туберкулина.

В приведенном примере высокая точность предлагаемого способа подтверждена комплексом иммунологических исследований, выявляющих наличие специфической сенсибилизации к антигенам различного вида.

В то же время обследование предлагаемым способом не дало положительных реакций к двум из трех специфических антигенов. Это указывает на большую точность предлагаемого способа по сравнению с известным.

**Пример 3.** Больной В., 36 лет, поступил в клинику ВНИИГИТОКСА с диагнозом: бронхиальная астма, профессионального генеза.

Из проф. анамнеза выяснено, что в течение 11 лет работает аппаратчиком в цеху антибиотиков по производству биомидина на Немешаевском биохимзаводе.

Для подтверждения диагноза необходимо установить наличие сенсибилизации к производственному антигену (биомидину) и выявить напряженность иммунитета по отношению к выявленному специфическому антигену.

Для решения поставленной задачи согласно методике предлагаемого способа создано три пробы: 1-я контрольная нестимулированная, 2-я контрольная, стимулированная инертным латексом, 3-я опытная, стимулированная

латексом, нагруженным раствором биомидина в разведении 1:10.

Получены следующие результаты:  
хемиллюминесцентное свечение 1-й контрольной пробы составляет 12950 имп/с, 2-й контрольной пробы - 28732 имп/с, 3-й опытной пробы - 44260 имп/с.

На основании полученных данных, свидетельствующих о существенном повышении хемиллюминесценции в пробе, содержащей производственный антиген (биомидин) по сравнению с контролем, а также повышение свечения во 2-й контрольной пробе по сравнению с 1-й контрольной диагностировано наличие сенсибилизации к биомидину и гиперэргическую реакцию иммунитета по отношению к этому антигену. Это подтверждает возможность возникновения хронического заболевания (бронхиальной астмы), вызванного производственным антигеном.

Диагноз гиперчувствительности замедленного типа, вызванный производственным антигеном (биомидином), подтвержден постановкой реакции торможения миграции лейкоцитов (миграция лейкоцитов в агарозе, содержащей биомидин в разведении 1:100, была на 20% меньше по сравнению с контролем).

При постановке РБТЛ (по известному способу) существенной разницы между показателями спонтанной, стимулированной ФГА и стимулированной специфическим антигеном (биомидином) не выявлено, что свидетельствует о большой точности предлагаемого способа по сравнению с известным.

Предлагаемым способом обследовано 110 детей с различной соматической и инфекционной патологией, а также более 280 взрослых лиц в отделениях клиник терапевтического профиля, профзаболеваний и туберкулеза. Точность способа при этом возрастала на 62% (по известному 32%).

Преимущества способа заключаются также в возможности не только выя-

вить специфический антиген, но и определить напряженность иммунитета в отношении данного антигена, в плане уточнения гиперэргической или гиперэргической реакции иммунитета, что позволяет также дифференцировать острый и хронический инфекционный, аллергический или аутоиммунный процесс.

Практическая значимость способа определяется широкой информативностью, позволяющей исследовать специфические реакции иммунитета в отношении самых различных антигенов (инфекционных, тканевых, атопических, производственных, медикаментозных и др.), быстрым получением результатов (через час после взятия крови для исследования), тогда как при исследовании известным способом - только на 5 - 7-е сутки, а также высокой объективностью, поскольку результаты исследований регистрируются печатным устройством установки по измерению хемиллюминесценции.

#### Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

Способ определения иммунологической реактивности организма путем добавления к лейкоцитам крови больного специфического и неспецифического стимулятора с последующим учетом показателей реакции на стимуляторы и без них, отличающийся тем, что, с целью повышения точности способа за счет определения состояния рецепторного аппарата лимфоцитов и фагоцитирующих клеток, в качестве стимулятора используют частицы латекса, нагруженные специфическим и неспецифическим антигеном, далее проводят реакцию хемиллюминесценции и при повышении специфической хемиллюминесценции и отсутствии разницы между показателями реакции на неспецифический стимулятор и без него определяют гипергический тип иммунной реакции, а при наличии разницы между ними определяют гипергический тип иммунной реакции.

Составитель Г.Крюкова

Редактор Н.Лазаренко Техред Л.Сердюкова

Корректор М.Лемчик

Заказ 436

Тираж 407

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР

113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

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