

Федеральное государственное бюджетное учреждение
дополнительного профессионального образования
«Центральная государственная медицинская академия»
Управления делами Президента Российской Федерации

Утверждено и рекомендовано
в качестве учебно-методического
пособия, рекомендовано к печати
Ученым советом ФГБУ ДПО
«Центральная государственная
медицинская академия»
Управления делами Президента
Российской Федерации
04 апреля 2019 г.
протокол № 2

«УТВЕРЖДАЮ»
Ректор ФГБУ ДПО
«Центральная государственная
медицинская академия»
Управления делами Президента
Российской Федерации

 Е.В. Есин

«08» апреля 2019 год

Рекомендации

по преаналитическому этапу лабораторных исследований для диагностики аллергических заболеваний

Учебно-методическое пособие

Под ред. С.А. Чорбинской

Москва • 2019

УДК 616-056(075.8)
ББК 52.5я73
Р36

*Утверждено и рекомендовано к печати Учебно-методическим советом
ФГБУ ДПО «ЦГМА» Управления делами Президента Российской
Федерации (протокол № 2 от 04 апреля 2019 г.)*

Авторы: М.Г. Вершинина, С.П. Казаков, Т.Г. Федоскова, А.В. Шихалеева,
Н.А. Стериополо, М.О. Егорова

Под ред. С.А. Чорбинской

Рецензент:

В.В. Долгов — д-р мед. наук, проф., заведующий кафедрой
клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ДПО РМАНПО
Минздрава России.

Р36 Рекомендации по преаналитическому этапу лабораторных исследо-
ваний для диагностики аллергических заболеваний: учеб.-метод. по-
соб. / [М.Г. Вершинина и др.]; под ред. С.А. Чорбинской; М.: Практиче-
ская медицина, 2019. — 56 с.

ISBN 978-5-98811-579-3

Данное пособие содержит материал, отражающий современные представления об основных правилах, определениях по проведению преаналитического этапа для диагностики аллергических заболеваний. Соблюдение технологии преаналитической подготовки и получения пробы имеют существенное значение в обеспечении достоверности результата. В пособии приведены тестовые задания и ситуационные задачи. Предложенная структура пособия помогает выделить главные аспекты преаналитического этапа в лабораторной аллергодиагностике, организовать и конкретизировать учебный процесс.

Учебно-методическое пособие «Рекомендации по преаналитическому этапу лабораторных исследований для диагностики аллергических заболеваний» подготовлено по дисциплинам «Клиническая лабораторная диагностика» и «Аллергология и иммунология» в соответствии с федеральными государственными образовательными стандартами высшего профессионального образования для ординаторов, обучающихся по специальностям «Клиническая лабораторная диагностика (31.08.05)» и «Аллергология и иммунология» (31.08.26) и учебным программам дополнительного профессионального образования «Клиническая лабораторная диагностика» и «Лабораторная аллергодиагностика в работе врача общей практики».

УДК 616-056(075.8)
ББК 52.5я73

© Коллектив авторов, 2019
© Оформление. практическая медицина, 2019

ISBN 978-5-98811-579-3

Содержание

Список сокращений	5
Введение	6
1. Механизм регулирования иммунной системы при аллергических заболеваниях	8
2. Назначение лабораторных исследований в аллергодиагностике	15
3. Основные составляющие преаналитического этапа подготовки пробы к лабораторной аллергодиагностике	24
3.1. Составление заявки на лабораторное исследование и оформление бланка-направления	27
3.2. Подготовка пациента к исследованию	29

3.3.	Идентификация пациента	30
3.4.	Сбор и маркировка образца	30
3.5.	Хранение материала и его доставка в лабораторию	33
4.	Внутрилабораторный преаналитический этап	34
4.1.	Прием, регистрация и маркировка образцов биоматериала, доставленных в лабораторию	34
4.2.	Подготовка образцов к исследованию	35
4.3.	Оценка пригодности образца для исследования	36
	Заключение	38
	Тестовые задания	39
	Ситуационные задачи	45
	Ответы к тестовым заданиям	51
	Ответы к ситуационным задачам	52
	Список рекомендуемой литературы	53

Список сокращений

ECP	—	эозинофильный катионный белок
Ig	—	иммуноглобулин
ILC2	—	лимфоидные клетки врожденного иммунитета второго типа
sIgE	—	специфический иммуноглобулин E
Th2	—	Th2 лимфоциты
TNFα	—	фактор некроза опухоли
АСИТ	—	аллергенспецифическая иммунотерапия
ОРВИ	—	острые респираторные вирусные инфекции
ОФВ1	—	объем форсированного выдоха за первую секунду маневра форсированного выдоха
СПИД	—	синдром приобретенного иммунодефицита
СОЭ	—	скорость оседания эритроцитов
СРБ	—	С-реактивный белок, маркер острой фазы воспаления
ТТЕЭЛ	—	тест торможения естественной эмиграции лейкоцитов
ЭДТА	—	этилендиаминтетрауксусная кислота

Введение

Преаналитический этап — комплекс мероприятий (процессов и действий), выполняемых от момента назначения лабораторных исследований до начала проведения аналитического процесса (исследования проб с помощью ручного метода либо анализатора, микроскопического анализа и т. д.).

Основная цель преаналитического этапа — обеспечение стабильности компонентов биоматериала, взятого на исследование; сведение к минимуму воздействия различных факторов, искажающих результат.

Преаналитический этап имеет большое значение в обеспечении качества всех лабораторных исследований. Лабораторная диагностика аллергических заболеваний не является исключением.

Лабораторная аллергодиагностика востребована как в педиатрии, так и при обследовании взрослого населения. Так, например, в методических рекомендациях по лабораторной диагностике аллергических заболеваний представлены лабораторные методы исследования, используемые при подтверждении аллергической природы заболевания.

Подробное описание тестов и направленность диагностического поиска приведены далее в данных методических рекомендациях. Укажем лишь основные группы тестов и необходимые для исследования биологические жидкости:

- сыворотка крови, исследование sIgE, общего IgE, триптазы, ECP, биохимический анализ (опционально), активность компонентов комплемента, исследование концентрации иммуноглобулинов Ig M, G;
- гепарин-стабилизированная проба цельной крови, тест активации базофилов;
- гепаринизированная плазма крови, определение маркеров анафилаксии: триптаза, гистамин;
- ЭДТА стабилизированная цельная кровь, подсчет эозинофилов, развернутый клинический анализ крови, определение популяций В-лимфоцитов.

Принимая во внимание перечисленные лабораторные исследования биологических жидкостей, необходимо соблюдение технологии сбора и обработки проб крови для получения адекватных результатов исследования.

Исключение ошибок на преаналитическом этапе может быть обеспечено максимальной стандартизацией всех процедур получения, транспортировки и хранения биологического материала, используемого для анализа.

Настоящие рекомендации содержат требования к условиям и процедурам ведения преаналитического этапа исследований в медицинской организации для аллергодиагностики. Рекомендации составлены с целью исключения или ограничения влияния эндогенных, экзогенных, ятрогенных и иных факторов, мешающих получению достоверных результатов исследований.

Механизм регулирования иммунной системы при аллергических заболеваниях

В основе механизмов развития аллергических заболеваний лежит патологическая гиперактивация иммунной системы в ответ на определенные антигены (паттерны), которые не вызывают патологической реакции у здоровых индивидуумов. В наиболее экономически развитых странах среди всех аллергических заболеваний наиболее значимое место занимают атопические заболевания.

Согласно классификации Gell P. и Coombs R. (1963) все реакции гиперчувствительности можно разделить на четыре основных типа (табл. 1).

Ниже приведена схема патофизиологического процесса развития гиперчувствительности (рис. 1).

Приведенная схема отражает как возможные инициаторы развития IgE опосредованной аллергической гиперчувствительности, так и вероятность развития неаллергической гиперчувствительности без выработки IgE. Принимая во внимание приведенную схему, можно рассматривать конечные этапы лабораторной диагностики.

В данном разделе основное внимание будет уделено аллергическим и псевдоаллергическим реакциям, ассоциированным с патологической IgE-продукцией.

Таблица 1. Четыре типа реакций гиперчувствительности [Gell P., Coombs R. 1963]

Название	Антиген-распознающая структура	Эффекторный механизм	Участие Ig E опосредованного ответа
Тип I — гиперчувствительность немедленного типа	Иммуноглобулины класса E, IgE	Выброс активных субстанций тучными клетками	+++
Тип II — цитотоксическая реакция	Иммуноглобулины IgG1, IgG3, IgM	Комплемент-зависимый цитолиз	—
Тип III — иммунореакционная реакция	Иммуноглобулины IgG, IgM	Реакция на отложение иммунных комплексов	—
Тип IV — гиперчувствительность замедленного типа	T-клеточный рецептор	Клеточно-опосредованная реакция (эффекторы — макрофаги)	++

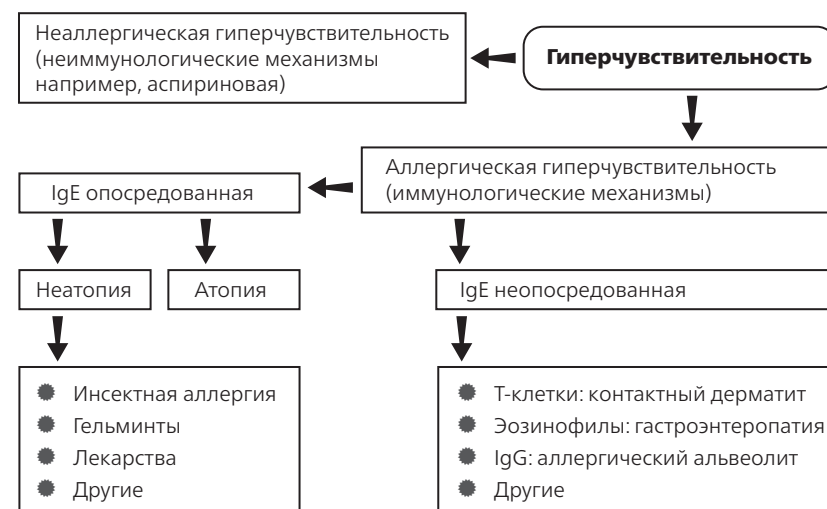


Рис. 1. Схема патофизиологического процесса развития гиперчувствительности

В механизме гиперчувствительности немедленного типа антигенраспознающей структурой для поступающего аллергена являются IgE, находящиеся на тучных клетках, с последующей дегрануляцией тучных клеток. В иммунных механизмах гиперчувствительности замедленного типа ответом является последовательная реализация реакции путем активации врожденной и адаптивной иммунной активности и формирования Th₂-механизма с продукцией В-лимфоцитами иммуноглобулинов класса Е. Последующая сенсibilизация иммуноглобулинами Е тучных клеток и базофилов и ответной продукцией активированными клетками специфических гуморальных факторов врожденного иммунитета.

Таким образом, для реализации IgE-ответа могут использоваться реакции гиперчувствительности немедленного (основной тип ответа) и замедленного типов.

С учетом сказанного выше иммунный ответ является комплексом последовательных звеньев в цепи реализации механизмов передачи сигналов от антигенов (аллергенов) через компоненты мукозальной иммунной системы с последующей активацией антигенпрезентирующих клеток (тип IV) или непосредственным взаимодействием аллергена с размещенными на мастоцитах IgE (тип I) и последующей дегрануляцией тучных клеток, развитием аллергических и псевдоаллергических реакций.

Антигены, способные вызывать развитие atopических заболеваний, представляют собой растительные, пищевые, бытовые и иные детерминанты, способные проникать через слизистые и реализовывать ответ путем адаптивного гуморального иммунного ответа с продукцией иммуноглобулинов G, в основном классов IgG1 и IgG4. В то же время патологический иммунный ответ при atopических заболеваниях приводит к Th₂-иммунному ответу с характерным синтезом определенных цитокинов. Основное значение среди цитокинов приобретают IL-4, IL-13, в функции которых входит переключение синтеза В-лимфоцитов на продукцию иммуноглобулина Е. И вторым важным условием развития данного типа реакции иммунной системы является ослабление супрессорного влияния со стороны регуляторных клеток (Treg) по неизвестным причинам. Данный тип ответа обеспечивает продукцию также и интерлейкина IL-5, что способству-

ет включению в этот процесс активации и последующего экзоцитоза эозинофилов. Гуморальные продукты эозинофилов, в свою очередь, усиливают аллергические проявления. Наличие в подслизистом слое лимфоидных клеток врожденного иммунитета второго типа (ILC₂) и их последующая активация, а также реализация путем усиления продукции цитокинов (IL-4, IL-5, IL-13) поддерживают гиперчувствительность немедленного типа. Возможно, врожденный иммунитет запускает и патологический иммунный ответ как по Th₂-типу, так и влияя на конечные клеточные линии, участвующие в аллергическом иммунном ответе — В-лимфоциты, эозинофилы, тучные клетки, базофилы.

Продуцируемые лимфоидными клетками врожденного иммунитета второго типа (ILC₂) цитокины (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13) обладают определенными функциями, которые способствуют поддержанию и развитию патологического atopического иммунного ответа как I, так IV типа.

Наиболее сложным представляется механизм развития аллергических реакций замедленного типа. Ключевым фактором реакций замедленного типа служит последовательная активация клеток врожденной иммунной системы (Innate и Innate-Like), среди которых выделяют антигенпрезентирующие клетки (макрофаги, дендритные клетки) и другие клетки — лимфоидные клетки врожденного иммунного ответа, натуральные киллерные клетки, эозинофилы, базофилы, мастоциты. Перечисленные выше клетки врожденной иммунной системы также участвуют в усилении проведения сигнала и преумножении полученного ответа. Механизм развития гиперчувствительности замедленного типа, его регуляция клеточным звеном адаптивной иммунной системы представлены на рис. 2.

В механизмах развития аллергических заболеваний значительная роль отводится гуморальным факторам врожденной иммунной системы — таким как система комплемента, а также секреторные продукты, которые продуцируют эозинофилы, базофилы, тучные клетки. Повышение концентрации гуморальных факторов свидетельствует о развитии аллергических и псевдоаллергических реакций. Эозинофилы содержат в цитоплазме первичные гранулы, богатые лизофосфатазой; вторичные «специфические» гранулы, состоящие из эозинофильного — основного белка, катионного белка,

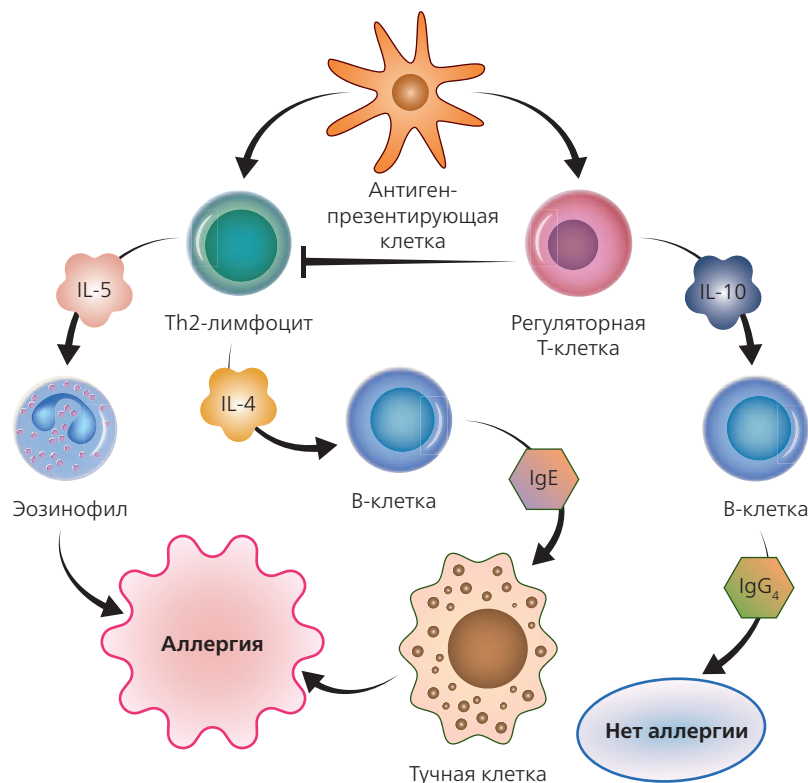


Рис. 2. Механизм развития гиперчувствительности замедленного типа (В.А. Черешнев, К.В. Шмагель, 2011)

белка X, пероксидазы, коллагеназы, β -глюкоронидазы; маленьких гранул, представленных арилсульфатазой B, кислой фосфатазой и липидными тельцами, насыщенными циклооксигеназой, 5-липоксигеназой, лейкотриенами (LTC4) и синтетазой арахидоновой кислоты. Такие компоненты, как эозинофильный катионный белок (ЕСР), лейкотриены и липоксины, а также цитокины, продуцируемые эозинофилами, активно участвуют в связывании аллергических антигенов (паттернов) и поддержании воспалительного ответа у пациентов.

Мастоциты и базофилы рассматриваются как ключевые эффекторы Ig E-ассоциированных реакций, так как на поверхности мастоцитов и базофилов экспрессируются высокоаффинные рецепторы для Ig E (Fc ϵ RI). На поверхности тучных клеток и базофилов в значительном количестве экспрессируются низкоаффинные рецепторы для Ig E (Fc ϵ RII, Fc ϵ RIII). Высокая скорость высвобождения медиаторов из мастоцитов (базофилов — при анафилактической реакции) после их минутного (иногда секундного) взаимодействия с аллергеном обуславливает патофизиологические реакции гиперчувствительности немедленного, а также и замедленного типа.

Продукция мастоцитами/базофилами гуморальных факторов, относящихся к врожденному иммунному ответу, приводит к развитию патофизиологических процессов при аллергических реакциях. Среди гуморальных факторов необходимо отметить G-протеины; ферменты — гидролазы — β глюкуронидаза, β -гексозаминидаза, β -D-галактозидаза; протеолитические ферменты — триптаза, карбоксипептидаза, химаз; протеогликаны — гепарин и хондроитинсульфат E (гистамин); простаиноиды — простагландины (ПГД2), тромбоксаны, (TXA2) и лейкотриены (LTC4); цитокины: базофилы — ИЛ-4, ИЛ-13; мастоциты — ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-13, ИЛ-25, GM-CSF, ФНО- α .

По функциональным свойствам все вышеперечисленные медиаторы являются вазоактивными. Воздействие медиаторов способно вызывать сокращение гладкой мускулатуры, стимулировать периферические нервные окончания; они обладают хемотаксическим действием, специфической ферментативной активностью, четко направленным иммунотропным действием и другими патофизиологическими эффектами в зависимости от анатомических особенностей места развития аллергии и содержания в них клеточных и гуморальных компонентов врожденной (мукозальной) иммунной системы.

В случаях развития реакций гиперчувствительности немедленного типа продукция медиаторов способствует развитию быстрого и сильного патофизиологического ответа с включением в реакции эпителиальных и эндотелиальных клеток. Результатом реакций служит отек и ускорение миграции клеток к месту проникновения аллергена.

Так, потенциальными причинами активации тучных клеток при крапивнице и ангионевротическом отеке с развитием IgE-опосредо-

ванной гиперчувствительности немедленного типа являются аллергены, модифицированные IgE, IgG4, аутоиммунные анти-Ig E, FcεRI, FcεRII (CD23) на тромбоцитах, лимфоцитах и эозинофилах.

В реакциях активации тучных клеток значительную роль играют не только группы факторов (медиаторов), представленные липидами, белками, цитокинами, физико-химическими факторами, такими как гиперосмолярность, но и содержание на поверхности тромбоцитов специфических рецепторов, участвующих в активации и дегрануляции самих тучных клеток при аллергическом ответе. Клеточные поверхностные рецепторы, экспрессирующиеся на тучных клетках, включают ко-стимулирующие рецепторы (CD28), молекулы адгезии (интегрины), молекулы первого и второго классов главного комплекса гистосовместимости — присутствующие в основном на популяциях лимфоидных клеток. Так, воздействие на рецептор лимфоидных клеток CD28 приводило к ранней активации тучных клеток и усилению секреции из них TNFα, аналогично продукции этого цитокина при стимуляции высокоаффинного IgE рецептора аллергенами. Такая реакция тучных клеток может быть предпосылкой для реализации многообразных специфических форм взаимодействия мастоцитов с основными типами клеток адаптивной иммунной системы, эндотелиальными клетками, эозинофилами, натуральными киллерными клетками, нейтрофилами и другими клетками, ассоциированными или прямо участвующими в конкретном иммунном ответе.

Таким образом, в реализации иммунных механизмов аллергических и псевдоаллергических реакций лежат нарушения, в основном ассоциированные с реакциями гиперчувствительности немедленного типа (тип I) и реакциями гиперчувствительности замедленного типа (тип IV). Кроме того, вышеуказанные реакции опосредованы Ig E-взаимодействием, при котором отмечаются патологический иммунный ответ с участием гуморальных факторов (тип I) и клеточно-опосредованный патологический ответ (тип IV).