

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра



Е.Л. Богдан

2021 г.

Регистрационный № 013-0321

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ
КРОВИ Т-КЛЕТОК, СПЕЦИФИЧНЫХ К АНТИГЕНАМ ВИРУСА
SARS-CoV-2**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: государственное научное
учреждение «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной
академии наук Беларуси»

АВТОРЫ: канд. биол. наук Антоневиц Н.Г., канд. мед. наук, доц.
Гончаров А.Е., Бобрукевич Д.В., Минич Я.С.

Минск, 2021

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод определения содержания в периферической крови Т-клеток, специфичных к антигенам вируса SARS-CoV-2, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на оценку состояния противовирусного клеточного иммунитета к SARS-CoV-2.

Инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-инфекционистов, иных врачей-специалистов, оказывающих медицинскую помощь пациентам в амбулаторных и (или) стационарных условиях, и (или) условиях дневного стационара.

1 Показания к применению

Необходимость определения содержания Т-клеток периферической крови, специфичных к антигенам вируса SARS-CoV-2.

2 Перечень необходимых медицинских изделий, лекарственных средств и др.

2.1 Медицинские изделия, необходимые для получения крови из периферической вены.

2.2 Медицинская техника:

1. ламинарный шкаф 2А-2В класса защиты;
2. инкубатор углекислотный;
3. проточный цитофлуориметр (минимум 3 канала флуоресценции);
4. микроскоп инвертированный;
5. центрифуга с ротором для пробирок емкостью 15 мл;
6. автоматические дозаторы переменного объема;
7. холодильник с морозильной (поддержание температуры от -24°C до -18°C) и холодильной (поддержание температуры от $+2^{\circ}\text{C}$ до $+10^{\circ}\text{C}$) камерами;
8. шейкер орбитальный.

1.3 Медицинские изделия, реагенты и расходные материалы:

1. вакутайнеры с ЭДТА или гепарином;
2. наконечники стерильные объемом 1–20 мкл, 20–200 мкл, 100–1000 мкл, 1–5 мл;
3. пробирки центрифужные стерильные объемом 15 мл;
4. градиент плотности фиколл-пак 1077 г/л;
5. фосфатно-солевой буфер Дульбекко без кальция и магния;
6. гемоцитометр с сеткой Горяева;
7. планшеты культуральные 24-луночные;
8. среда для культивирования мононуклеаров периферической крови (МПК), не содержащая сыворотки;
9. синтетические пептиды антигенов вируса SARS-CoV-2 – спайкового белка S и/или мембранного белка M и/или нуклеопротеина N;
10. фитогемагглютинин (ФГА);
11. пробирки для цитофлуориметра;
12. моноклональное антитело к CD3, конъюгированное с флуорохромом;
13. интеркалирующий краситель (зонд) для идентификации мёртвых клеток;
14. витальный краситель для прижизненного окрашивания клеток с целью оценки пролиферации;
15. емкости для хранения и дезинфекции отработанного биологического материала.

1.4 Средства индивидуальной защиты и дезинфектанты:

1. лабораторный халат;
2. латексные или нитриловые перчатки;
3. дезинфицирующие растворы для инактивации биологического материала.

3 Технология использования метода

3.1 Взятие биологического материала

Взятие крови общим объемом 10 мл проводят утром натощак из локтевой вены в вакутайнеры с ЭДТА или гепарином. Закрытые вакутайнеры с кровью несколько раз переворачивают для смешивания крови с антикоагулянтом.

3.2 Правила транспортировки и хранения материала

Кровь транспортируют и хранят до использования не более 6 часов при температуре от +4°C до +25°C.

3.3 Культивирование МПК для последующего выявления антигенспецифических Т клеток

1. МПК в асептических условиях выделяют путем центрифугирования образца крови на градиенте плотности фиколл-пака с плотностью 1077 г/л. Проводят подсчет МПК в гемоцитометре с сеткой Горяева стандартным методом. В качестве неокрашенного контроля используют 1 млн клеток. Для последующей оценки пролиферативного ответа Т-клеток после взаимодействия с антигенами проводят окрашивание витальным флуоресцентным красителем суспензии МПК из расчета по 1 млн клеток на отрицательный и положительный контроли пролиферации, анализируемый(е) антиген(ы). МПК окрашивают витальным красителем для прижизненного окрашивания клеток в соответствии с инструкцией по применению. Неокрашенные и окрашенные МПК рассеивают на лунки 24-луночного культурального планшета в концентрации 1 млн МПК/мл питательной среды, пептиды анализируемых антигенов и ФГА добавляют в соответствующие лунки: 1) отрицательный неокрашенный контроль, 2) окрашенные МПК без добавления стимуляторов – отрицательный окрашенный контроль, 3) окрашенные МПК с добавлением митогена ФГА в концентрации 10 мкг/мл

– положительный контроль пролиферации, 4) окрашенные МПК с добавлением анализируемого(ых) антигена (ов) в концентрации 1 мкг/мл. Культивируют в течение 6–7 суток в увлажненной атмосфере с 5 % CO₂ при 37°C.

4. Учет и анализ данных

4.1 Визуальный контроль пролиферативной активности МПК

После 6–7-и суток культивирования проводят визуальный контроль пролиферативной активности МПК с использованием инвертированного микроскопа с методом фазового контрастирования при увеличении $\times 40$ – $\times 200$. Визуально оценивают наличие микроколоний пролиферирующих клеток во всех анализируемых вариантах. Постановку анализа считают корректной в случае отсутствия микроколоний пролиферирующих клеток в образцах отрицательного контроля и их наличия в положительном контроле. При выполнении этих условий, анализируют наличие микроколоний в лунках МПК, культивированных в присутствии синтетических пептидов антигенов SARS-CoV-2. При выявлении микроколоний клеток в лунках с пептидами делают вывод о наличии антигенспецифических клеток в исследуемом образце крови пациента, содержание которых оценивают методом проточной цитометрии.

4.2 Учет и анализ данных на проточном цитофлуориметре

4.2.1 Пробоподготовка

Отбирают суспензию клеток из лунок планшета. Осаждают клетки центрифугированием, удаляют супернатант, клетки ресуспендируют в 100 мкл фосфатного буферного раствора. Во все пробирки кроме неокрашенного контроля добавляют моноклональное антитело CD3, а также зонд для идентификации мертвых клеток, инкубируют в течение 15 минут при температуре от +2°C до +8°C в темноте. Клетки отмывают от антител и зондов и ресуспендируют в 0,5 мл фосфатного буфера.

4.2.2 Учет и анализ данных на проточном цитометре

Выполняют настройку параметров прямого и бокового рассеивания, напряжения на каналах флуоресценции с использованием клеток образца неокрашенного контроля. В процессе учета и анализа событий окрашенных образцов выполняют последовательное гейтирование одиночных клеток, построение цитограммы в координатах CD3\зонд для оценки жизнеспособности, выделение региона жизнеспособных CD3⁺ Т-клеток, регион проецируют на гистограмму интенсивности флуоресценции витального красителя. Определяют количество пролиферирующих Т-клеток относительно принятого порогового значения, выставленного по образцу окрашенного отрицательно контроля.

Рассчитывали разницу содержания пролиферирующих клеток (ΔN) в анализируемом (N_o) и контрольном образцах (N_k) по формуле:

$$\Delta N = N_o - N_k$$

Постановку анализа считают корректной в случае наличия более 20% пролиферирующих клеток в образце положительного контроля.

4.3 Интерпретация результатов

При выявлении микроколоний клеток в образцах с антигенами вируса и наличии разницы в количестве пролиферирующих Т-клеток в анализируемых образцах при сравнении с контролем >1%, делают вывод о наличии антигенспецифических клеток в исследуемом образце крови пациента.

4 Противопоказания к применению

Отсутствуют.

5 Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении и пути их устранения

При соблюдении всех этапов инструкции, вероятность ошибок низкая.