

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра



_____ Д.Л. Пиневиц

_____ 2015 г.

Регистрационный № 106-1014

**МЕТОД ДИАГНОСТИКИ НАРУШЕНИЙ ФАГОЦИТАРНОГО
ЗВЕНА ИММУНИТЕТА ПО ОЦЕНКЕ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ
БАКТЕРИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ:

Д.м.н., профессор И.А. Новикова, В.В. Железко

Гомель, 2014

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневич

18.06.2015

Регистрационный № 106-1014

**МЕТОД ДИАГНОСТИКИ НАРУШЕНИЙ ФАГОЦИТАРНОГО ЗВЕНА
ИММУНИТЕТА ПО ОЦЕНКЕ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ БАКТЕРИЦИДНОЙ
АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Гомельский государственный
медицинский университет»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. И.А. Новикова, В.В. Железко

Гомель 2014

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод диагностики нарушений фагоцитарного звена иммунитета по оценке потенциальной бактерицидной активности нейтрофилов, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику иммунодефицитных состояний.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Пробирки из полипропилена для взятия материала одноразового применения.

Центрифуга лабораторная медицинская.

Холодильник бытовой.

Микроскоп.

Круглодонные планшеты для иммунологических реакций одноразового применения.

Автоматические дозаторы (0,05–0,1 и 0,1–1 мл) с одноразовыми наконечниками.

Термостат.

Предметные стекла.

Шлифованные стекла.

Камера Горяева.

Гепарин (гепарин натрия).

Физиологический раствор (0,9% раствор хлорида натрия, аптечный).

Суточная культура *S. aureus* (штамм АТСС 25923).

Бидистиллированная вода.

Нейтральный красный (нейтральрот) 1% раствор: 100 г красителя растворяют в 100 мл 96% этанола, тщательно перемешивают, а затем пропускают через фильтровальную бумагу. Перед использованием маточный раствор в количестве 1 мл смешивают с 99 мл 96% этанола, получая рабочий раствор.

Нитросиний тетразолий-п (хлорид) (НСТ) 0,1% раствор: 1 мг красителя растворяют в 2 каплях этанола, затем добавляют 1 мл физиологического раствора.

Спирт этиловый 96%.

Раствор красителя по Романовскому–Гимзе.

Иммерсионное масло для микроскопии.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Первичные иммунодефициты (D71); вторичные иммунодефициты, возникающие на фоне тяжелых рецидивирующих инфекций (фурункулез (L02), остеомиелит (M86), обширные ожоги (T20-T32) и др.); аутоиммунные заболевания (M30-M36).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Материалом для исследования является периферическая кровь, которую получают путем венепункции с соблюдением стандартных правил преаналитического этапа в пластиковые пробирки, используя в качестве антикоагулянта гепарин (из расчета 10 ЕД гепарина на 1мл крови).

1. Подготовка лейкоцитов

Лейкоциты получают путем отстаивания гепаринизированной крови в течение 45 минут при 37°C, отбирают нижний слой плазмы с лейкоцитарной пленкой. Количество гранулоцитов в суспензии доводят до концентрации 5×10^6 клеток/мл путем разведения необходимым количеством 0,9%-о раствора хлорида натрия (контроль в камере Горяева).

2. Подготовка *S.aureus*

Полную петлю суточной культуры *S. aureus* (штамм ATCC 25923) суспензируют в 5 мл 0,9%-го раствора хлорида натрия и инактивируют нагреванием на водяной бане до 100°C в течение 20 мин, дважды отмывают физиологическим NaCl при центрифугировании 2000об./мин (500g) в течение 5 мин. Для опсонизации *S. aureus* к 1 мл взвеси микробных частиц добавляют равный объем свежей сыворотки не менее пяти здоровых лиц и инкубируют 30 мин при 37°C, дважды отмывают физиологическим раствором при центрифугировании в течение 5 мин 2000 об./мин (500g), затем разводят в 0,9% растворе NaCl. Количество микроорганизмов в рабочей суспензии доводят до концентрации 10^8 КОЕ/мл (контроль по стандарту мутности шкалы McFarland). Готовую рабочую суспензию разливают по аликвотам и хранят до использования при температуре -18°C.

3. Ход определения

3.1. Оценка экстррузии NET и поглощительной активности нейтрофилов

3.1.1. В лунки полистироловой планшеты или в пластиковые пробирки вносят в равных объемах (по 0,05 мл) подготовленные лейкоциты и рабочую суспензию *S. aureus* (в опытных пробах). В контрольных пробах вместо *S. aureus* используют физиологический раствор.

3.1.2. Опытную и контрольную смеси инкубируют 30 мин при 37°C, центрифугируют в течение 5 мин при 1000 об./мин (250g), надосадочную жидкость удаляют, осадок суспендируют пипеткой, наносят на предметное стекло и делают тонкие мазки шлифованным стеклом.

3.1.3. Мазки сушат на воздухе, фиксируют этанолом, окрашивают по Романовскому-Гимзе и микроскопируют с использованием иммерсионного увеличения (объектив 90, окуляр 7). Подсчет производят в щеточной каемке.

3.2. Оценка кислородпродуцирующих свойств

3.2.1. В лунках полистироловой планшеты или в пластиковой пробирке смешивают для определения спонтанной активности по 0,05 мл суспензии лейкоцитов, физиологического раствора и 0,1% раствора нитросинего тетразолия, а для определения стимулированной активности по 0,05 мл суспензии лейкоцитов, рабочей суспензии *S. aureus* и 0,1% раствора нитросинего тетразолия.

3.2.2. Инкубируют 30 минут при 37°C, центрифугируют в течение 5 мин при 1000 об./мин (250g), надосадочную жидкость удаляют, из осадка делают мазки с помощью пипетки.

3.2.3. Мазки сушат, фиксируют этанолом, окрашивают 1% раствором нейтрального красного и микроскопируют с использованием иммерсионного увеличения, производя подсчет нейтрофилов по всей поверхности мазка.

4. Идентификация результатов

4.1. Учет реакции фагоцитоза

Результат фагоцитоза учитывают в мазке, приготовленном из смеси лейкоцитов с суспензией *S. aureus* (см. 3.1.1). Подсчитывают количество (в процентах) нейтрофилов, поглотивших 2 и более микробные частицы, — фагоцитарный индекс (ФИ) и среднее количество микробных частиц в одном нейтрофиле — фагоцитарное число (ФЧ), оценивая не менее 200 клеток в каждом препарате.

Референтные значения для здоровых взрослых лиц среднего возраста: ФИ — 60–80%; ФЧ — 5–10.

4.2. Учет нейтрофильных внеклеточных ловушек

Нейтрофильные внеклеточные ловушки (neutrophil extracellular traps, NET) представлены тонкими свободнолежащими внеклеточно расположенными нитями, занимающими пространство, в 2–3 раза превосходящее размер неизмененного нейтрофила. Учитывают количество четко идентифицируемых NET на 200 сосчитанных нейтрофилов в том же мазке, что и фагоцитоз (стимулированный NET). Дополнительно подсчитывали количество NET в контрольном мазке (спонтанный тест) (см. 3.1.1).

Референтные значения для здоровых взрослых лиц среднего возраста: NET_{сп.} — 2–3; NET_{ст. (*S. aureus*)} — 4–6.

4.3. Учет НСТ-теста

Учитывают количество формаза-положительных клеток (содержат черные или темно-синие включения) на 200 сосчитанных гранулоцитов.

Референтные значения для здоровых взрослых лиц среднего возраста: НСТ_{сп.} — 2–15%; НСТ_{ст. (*S. aureus*)} — 40–60%.

5. Интерпретация результатов

Трактовка результатов должна осуществляться с учетом клинических параметров, так как выраженность изменений зависит от тяжести, степени заболевания и его этиологии. Ориентировочные изменения параметров функциональной активности нейтрофилов в ответ на воспалительный процесс представлены в таблице.

Таблица — Изменения параметров функциональной активности нейтрофилов в ответ на воспалительный процесс

Изменение показателей	Интерпретация
Фагоцитоз N НСТсп. ↑ НСТст. ↓ NETсп. ↑↑ NETст. ↑	Нормальная реакция организма на воспалительный процесс, свидетельствует об отсутствии существенных нарушений фагоцитарного звена иммунитета
Фагоцитоз N/↓ НСТсп. ↓ НСТст. ↓ NETсп. ↑↑ NETст. ↑↑	Недостаточность фагоцитарного звена иммунитета
Фагоцитоз N/↓ НСТсп. ↑↑ НСТст. ↓↓ NETсп. ↑↑↑ NETст. ↑↑↑	Гиперактивация фагоцитарного звена иммунитета с истощением резервных возможностей лейкоцитов

Примечание — N — норма; ↓ — умеренное снижение; ↓↓ — выраженное снижение; ↑↑ — выраженное повышение; ↑↑↑ — резкое повышение.

Отсутствие изменений лабораторных показателей при наличии клинических проявлений само по себе может свидетельствовать о недостаточности фагоцитарного звена иммунитета.

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) подсчет нейтрофильных ловушек и фагоцитоза в толстой части мазка снижает возможность их четкой идентификации;
- 4) несоблюдение условий хранения рабочей суспензии *S. aureus* (возможна контаминация).

Пути устранения:

1. Исследование венозной крови не позднее 2 ч с момента получения.
2. Использование пробирок из пластика.
3. Подсчет нейтрофильных внеклеточных ловушек и учет фагоцитоза только в тонкой части мазка (щеточной каемке).
4. Четкое соблюдение условий хранения рабочей суспензии *S. aureus*.

Контроль качества лабораторных исследований осуществляется методом исследования параллельных проб и повторных проб согласно приказу Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 873 от 10.09.2009 «Об утверждении инструкций по контролю качества клинических лабораторных исследований».

При выполнении исследований необходимо соблюдать меры безопасности согласно действующим приказам ГНПА.

Хронометраж метода диагностики нарушений фагоцитарного звена иммунитета по оценке потенциальной бактерицидной активности нейтрофилов

№ пп	Содержание работ	Время, мин	
		единичное	каждое последующее
1	Подготовка реактивов к проведению анализа	10	8
2	Подготовка рабочей суспензии <i>S. aureus</i>	100	100
3	Отстаивание гепаринизированной крови	45	45
4	Отбор нижнего слоя плазмы с лейкоцитарной пленкой	2	1,5
5	Подсчет нейтрофилов в камере Горяева, приготовление рабочей суспензии лейкоцитов	6,5	5
6	Внесение суспензии лейкоцитов в лунки иммунологических планшет с помощью автоматических дозаторов	0,3	0,1
7	Внесение реактивов в лунки иммунологических планшет с помощью автоматических дозаторов	0,7	0,5

8	Инкубация проб	30	30
9	Центрифугирование иммунологических планшет	5	5
10	Отбор надосадочной жидкости	1	0,5
11	Приготовление мазков	0,3	0,1
12	Фиксация, окраска мазков	30	30
13	Учет НСТ-теста	12	8
14	Учет фагоцитоза	18	14
15	Учет образования нейтрофильных внеклеточных ловушек	9	7
Всего		278,5	254,7