

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. Пиневиц  
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  $5 \times 10^6$  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 поглощательной 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<sub>сп.</sub> — 2–3; NET<sub>ст.</sub> (*S. aureus*) — 4–6.

##### **4.3. Учет НСТ-теста**

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

Референтные значения для здоровых взрослых лиц среднего возраста: НСТ<sub>сп.</sub> — 2–15%; НСТ<sub>ст.</sub> (*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