МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра
_____ Д.Л. Пиневич
18 июня 2015 г.

Регистрационный № 029-0515

МОДИФИЦИРОВАННЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК ДЛЯ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА

Инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

АВТОРЫ: Дядичкина О.В., Коротина О.Л., д.м.н., профессор Радецкая Л.Е., д.м.н., профессор Генералов И.И.

Витебск, 2015

Настоящая инструкция по применению (далее – инструкция) разработана с целью диагностики нарушений и отклонений в системе врожденного иммунитета у беременных с угрожающими преждевременными родами и воспалительными заболеваниями различной локализации (О47.0, В95-97 по МКБ 10). Методика базируется на обнаружении нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) как с помощью люминесцентной микроскопии, так и при помощи традиционной микроскопии светлого поля в микроскопе проходящего света. Инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-иммунологов, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, осуществляющих оценку иммунного статуса пациента. Разработанный метод может быть внедрен в лаборатории областного и республиканского уровня.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Оборудование

1. Люминесцентный микроскоп или световой бинокулярный микроскоп с люминесцентной насадкой, с иммерсионным объективом 100/1,25; окуляром 10/22.

2. Световой микроскоп с иммерсионным объективом 100/1,25; окуляром 10/22.

3. Центрифуга настольная лабораторная с бакетным ротором.

4. Термостат (37°С).

5. Денситометр.

5. Пипетки дозирующие, автоматические со сменными наконечниками на 0,01 – 1,0 мл.

6. Ареометр общего назначения стеклянный для измерения плотности жидкостей в пределах от 1,060 до 1,120 г/см^3 ГОСТ 1300-74.

Лабораторная посуда и принадлежности

1. Стекла предметные ГОСТ 9284-75.

2. Стандартные центрифужные пробирки емкостью по 10 мл П1-10 ГОСТ 1770—74.

3. Пробирки пластиковые типа «Эппендорф» по 1,5 мл.

4. Колбы стеклянные лабораторные по ГОСТ 10394-72.

Материалы и реактивы

1. Фиколл 400.

2. Верографин, 76% стерильный раствор.

3. Гепарин, стерильный раствор для инъекций, 5 тыс. ЕД в 1 мл.

4. Взвесь бактерий *Staphylococcus aureus*.

5. Краситель Hoechst 33342.

6. Краситель метиловый зеленый.

7. Физиологический раствор хлорида натрия.

8. Вода дистиллированная по ГОСТ 7609-72.

9. Уксусная кислота (ледяная).

10. Этанол 96%.

11. Иммерсионное нелюминесцентное масло (с вязкостью при 200°С около 437 mPs) для микроскопии.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Диагностика нарушений в системе врожденного иммунитета у беременных с угрожающими преждевременными родами и воспалительными заболеваниями различной локализации (О47.0, В95-96 по МКБ 10).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПОСОБА С УКАЗАНИЕМ ЭТАПОВ

Приготовление исходных растворов реагентов

1. Раствор фиколла-верографина плотностью 1,075-1,077 г/см^3 готовят на стерильной дистиллированной воде, смешивая 24 части 9% раствора фиколла и 10 частей 34% раствора верографина. Плотность смеси измеряют ареометром.

2. Раствор фиколла-верографина плотностью 1,093-1,095 г/см^3 готовят на дистиллированной воде, смешивая 24 части 14,6% раствора фиколла и 10 частей 34% раствора верографина. Плотность смеси измеряют ареометром.

3. Взвесь бактерии *Staphylococcus aureus* готовят на стерильном физиологическом растворе хлорида натрия в концентрации 1×10^8 бактериальных клеток в 1 мл. Суспензию микробов предварительно инактивируют нагреванием при 90^{0}С в течение 60 мин. Концентрацию микроорганизмов определяют на денситометре McFarland.

4. Раствор красителя Hoechst 33342 готовится ex tempore в день анализа на физиологическом растворе в концентрации 5 мкг/мл.

5. Раствор красителя метилового зеленого готовится в концентрации 50 мг/мл на 1% растворе уксусной кислоты, содержащий 5% этанола.

Методика выполнения

Предметом анализа являются нейтрофильные полиморфноядерные гранулоциты из фракционированной венозной крови. Для выделения нейтрофилов 5-6 мл венозной крови забирают натощак в пластиковые пробирки с гепарином в количестве 10-15 Ед на 1 мл крови, отстаивают при 37^{0}С в течение 30 минут под углом 45^0, затем в вертикальном положении 15 минут при комнатной температуре. Плазму с клеточными элементами наслаивают на двойной градиент плотности стерильных растворов фиколла-верографина. Плот-

ность верхнего слоя градиента составляет 1,075-1,077 г/см^3, нижнего – 1,093-1,095 г/см^3. Объем градиента для каждого образца равняется 1,5 мл. Через 35 минут центрифугирования при 1500 оборотах в минуту на границе между градиентами появляется кольцо гранулоцитов с чистотой 98-100%. Кольцо нейтрофилов собирают, переносят в стерильные центрифужные пробирки, трижды отмывают от градиента стерильным физиологическим раствором хлорида натрия центрифугированием при 1000 оборотах в минуту в течение 5 минут и доводят до концентрации 5×10^6 клеток/мл. При невозможности создания градиента для выделения нейтрофилов после отстаивания крови отбирают плазму, обогащенную мононуклеарами. Оставшиеся клетки центрифугируют 10-15 мин при 1000 об/мин и собирают образовавшуюся пленку, обогащенную нейтрофильными лейкоцитами. Лейкоциты разводят физиологическим растворам до концентрации 5×10^6 клеток/мл. Реакцию проводят в пластиковых пробирках типа «Эппендорф». К 0,1 мл суспензии клеток в концентрации 5×10^6 клеток/мл добавляют 10 мкл микробной взвеси бактерии *Staphylococcus aureus* в концентрации 1×10^8 бактериальных клеток в 1 мл. Проводят инкубацию смеси в течение 180 мин при температуре 37^0С. Контрольные пробы инкубируют в тех же условиях, но без микроорганизмов. Через 180 мин инкубации из реакционной смеси забирают 20 мкл содержимого и готовят мазки на обезжиренном предметном стекле. После высушивания мазки фиксируют стандартным фиксатором (96% этанолом, 4% параформальдегидом или коммерческими фиксаторами).

Определение НВЛ при помощи люминесцентной микроскопии

Окрашивание фиксированных мазков проводят ДНК-селективным красителем Hoechst 33342 в концентрации 5 мкг/мл в течение 5 мин в темноте. Краситель отмывают дистиллированной водой, мазки высушивают. Учет результатов проводят с помощью люминесцентного микроскопа, используя

фильтры, обеспечивающие возбуждающий свет с длиной волны 460 нм, и эмиссию с длиной волны 490 нм (люминесцентный объектив 100/1,25; окуляр 10/22 или аналогичные). Ядра нейтрофилов окрашиваются в голубой цвет, цитоплазма гранулоцитов не окрашивается, нейтрофильные ловушки представлены тонкими голубыми нитями, занимающими пространство, в 2-3 раза превосходящее диаметр неизмененного нейтрофила. Проводят подсчет 100 морфологических единиц и определяют процентное содержание каждой из них.

Определение НВЛ при помощи иммерсионной микроскопии в проходящем свете

Обрабатывают фиксированные препараты лейкоцитов 5% раствором метилового зеленого, приготовленного на 1% растворе уксусной кислоты, в течение 5 минут. Краситель отмывают дистиллированной водой, мазки высушивают. Микроскопию проводят при помощи светового микроскопа с использованием иммерсионного объектива 100/1,25; окуляра 10/22. Ядра нейтрофилов окрашиваются в зеленый цвет, цитоплазма гранулоцитов не окрашивается, нейтрофильные ловушки представлены тонкими зелеными нитями, занимающими пространство, в 2-3 раза превосходящее диаметр неизмененного нейтрофила. Проводят подсчет 100 структур разных групп и определяют процентное содержание каждой морфологической единицы.

Интерпретация полученных результатов

Для оценки врожденного звена иммунитета следует руководствоваться следующими референтными данными. Количество НВЛ в спонтанном варианте теста при физиологически протекающей беременности составляет 7-17%, в стимулированном *Staphylococcus aureus* варианте теста – 14-26%.

ВОЗМОЖНЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ И ОШИБКИ

При окрашивании НВЛ метиловым зеленым необходимо убедиться в достаточной чистоте красителя. В реагенте от ряда производителей может обнаруживаться примесь красителя метилового фиолетового в различной концентрации. Метиловый фиолетовый не является специфическим красителем на ДНК, и при проведении теста дополнительно окрашивает цитоплазму гранулоцитов, что препятствует точной оценке ловушкообразования. Отсюда разные партии красителя необходимо проверять, добавляя к 1 мл рабочего раствора метилового зеленого 5-10 мл хлороформа. После разделения компонентов фаза, содержащая хлороформ, должна быть бесцветной или иметь слабый фиолетовый оттенок. При интенсивном фиолетовом окрашивании следует либо провести предварительную экстракцию метилового фиолетового из красителя хлороформом (метиловый зеленый остается в водной фазе), либо сменить партию реагента.