

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ  
БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра  
Е.Н.Кроткова



« 11 » 2022 г.

Регистрационный № 059-0522

**МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ НЕЙТРОФИЛОВ ИЗ ВЕНОЗНОЙ  
КРОВИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ – РАЗРАБОТЧИК: учреждение образования  
«Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский  
университет»

АВТОРЫ: д.м.н., профессор Жильцов И.В., Мовсеян Н.А., к.м.н.,  
доцент Плотников Ф.В., д.м.н., доцент Кабанова А.А., к.м.н., доцент  
Торосян Т.А., Генералов С.И., Лептеева Т.Н.

Витебск, 2022

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) представлена методика выделения нейтрофилов из венозной крови с целью диагностики нарушений и отклонений в системе клеточного иммунитета при инфекционно-воспалительных заболеваниях различной локализации.

Методика, представленная в настоящей инструкции, предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-иммунологов, иных специалистов организаций здравоохранения, осуществляющих оценку иммунного статуса пациента.

### **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

- Методика позволяет выделить нейтрофилы крови с дальнейшим их использованием в иммунологических реакциях.
- Для оценки иммунного статуса и определения функции клеточного иммунитета при гнойно-септической, аутоиммунной, пульмонологической, онкологической и других патологиях.
- Выявление нарушений и отклонений в иммунной системе при первичном клинико-лабораторном исследовании.
- Динамическое наблюдение за состоянием системы иммунитета и организма в целом на протяжении лечебно-диагностического процесса.
- Некоторые инфекционные и паразитарные болезни (A00-B99)
- Новообразования (C00-D48)
- Болезни крови, кроветворных органов и отдельные нарушения, вовлекающие иммунный механизм (D50-D89)
- Болезни эндокринной системы, расстройства питания и нарушения обмена веществ (E00-E90)
- Болезни нервной системы (G00-G99)
- Болезни глаза и его придаточного аппарата (H00-H59)
- Болезни уха и сосцевидного отростка (H60-H95)
- Болезни системы кровообращения (I00-I99)



- Болезни органов дыхания (J00-J99)
- Болезни органов пищеварения (K00-K93)
- Болезни кожи и подкожной клетчатки (L00-L99)
- Болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани (M00-M99)
- Болезни мочеполовой системы (N00-N99)

### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ**

Отсутствуют.

### **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ РЕАКТИВОВ И Т. Д.**

Для реализации предлагаемого метода необходимо:

#### 1. Оборудование

- Световой микроскоп с иммерсионным объективом 100/1,25; окуляр 10/20;
- Центрифуга настольная лабораторная с бакетным ротором (мощность 500-700 g);
- Ареометр общего назначения стеклянный для измерения плотности жидкостей в пределах от 1,060 до 1,130 г/см<sup>3</sup> ГОСТ 1300-74.

- Камера Горяева.

#### 2. Лабораторная посуда

- Стекла предметные ГОСТ 9284-75.
- Стандартные центрифужные пробирки емкостью по 10 мл П1-10 ГОСТ 1770—74.
- Пробирки пластиковые типа «Эппендорф» по 1,5 мл.
- Колбы стеклянные лабораторные по ГОСТ 10394-72.

#### 3. Материалы и реактивы

- Фиколл 400.

- Верографин, 76% стерильный раствор.
- Гепарин, стерильный раствор для инъекций, 5 тыс. ЕД в 1 мл.
- Физиологический раствор хлорида натрия.
- Раствор Хэнкса.
- Вода дистиллированная по ГОСТ 7609-72.
- Трипановый синий.
- Иммерсионное нелюминесцентное масло (с вязкостью при 200°C около 437 mPs) для микроскопии.

## **ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА С УКАЗАНИЕМ ЭТА- ПОВ**

### **1. Изготовление растворов фикоλλα-верографина**

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

- Раствор фикоλλα-верографина плотностью 1,119-1,120 г/см<sup>3</sup> готовят на дистиллированной воде, смешивая 17 частей 6,1% раствора фикоλλα и 4 части 76% раствора верографина. Плотность смеси измеряют ареометром.

- 0,2-0,4% раствор трипанового синего приготовить в физиологическом растворе.

### **2. Выделение нейтрофилов**

- 1) Для выделения нейтрофилов 5-6 мл венозной крови забирают натощак в пластиковые пробирки с гепарином в количестве 10-15 ЕД на 1 мл крови
- 2) Отстаивают кровь при 37 °С в термостате в течение 30 минут под углом 45°, затем при комнатной температуре в вертикальном положении 15 минут.

- 3) Плазму с клеточными элементами наслаивают на двойной градиент плотности стерильных растворов фиколла-верографина. Плотность верхнего слоя градиента составляет 1,075-1,077 г/см, нижнего – 1,119-1,120 г/см. Объем градиента для каждого образца равняется 1 мл.
- 4) Центрифугируют градиент с плазмой при 600-700 g в течение 20 минут, на границе между градиентами появляется кольцо гранулоцитов с чистотой 98-100%.
- 5) Кольцо нейтрофилов собирают, переносят в стерильные центрифужные пробирки.
- 6) Клетки дважды отмывают от градиента раствором Хэнкса в объеме 2 мл в течение 7 минут при 200 g.
- 7) Клетки однократно отмывают стерильным физиологическим раствором хлорида натрия центрифугированием при 200 g в течение 5 минут.
- 8) Нейтрофилы доводят до концентрации  $5 \times 10^6$  клеток/мл с помощью стерильного физиологического раствора хлорида натрия.
- 9) Выделенные нейтрофилы используются для постановки различных иммунологических реакций и тестов, назначенных пациенту (фагоцитоз, НСТ-тест и пр.).

### **3. Определение жизнеспособности нейтрофилов**

Нейтрофилы разводят 0,2-0,4% раствором трипанового синего в соотношении 10:1 в пробирке типа Эппендорф, инкубируют в течение 10 минут при температуре  $37^{\circ}$  С, вносят в камеру Горяева, подсчитывают процент окрашенных нейтрофилов. При повреждении клеточной мембраны краситель поступает в клетку и окрашивает клеточное ядро в синий цвет. Окрашенные



клетки не жизнеспособны (мертвые). Для здоровых культур жизнеспособность нейтрофилов должна быть не менее 95%.

### **ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

При оценке жизнеспособности клеток необходимо убедиться в достаточной чистоте красителя. При недостаточной концентрации клеток в физиологическом растворе следует уменьшить объем раствора после центрифугирования и осаждения клеток.