

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневич



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

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.

### **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:**

Противопоказаний нет.

### **Перечень необходимого оборудования, реактивов, препаратов, вспомогательных устройств:**

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 ATCC 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-х каплях этанола, затем добавляют 1 мл физиологического раствора;

Спирт этиловый 96%;

Раствор красителя по Романовскому-Гимзе;

Иммерсионное масло для микроскопии.

### **Описание технологии использования метода с указанием этапов**

Материалом для исследования является периферическая кровь.

Кровь 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%-ного 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%-ого раствора хлорида натрия и инактивируют нагреванием на водяной бане до 100°C в течение 20 минут, дважды отмывают физиологическим NaCl при центрифугировании 2000об/мин (500g) в течение 5 минут. Для опсонизации *S. aureus* к 1 мл взвеси микробных частиц добавляют равный объем свежей сыворотки не менее пяти здоровых лиц и инкубируют 30 минут 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<sup>8</sup> 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 поглотительной 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 минут при 37°C, центрифугируют в течение 5 минут 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 иммерсионно-

го увеличения (объектив 90, окуляр 7). Подсчет производят в щеточной камерке.

### *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 минут 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 2-3х часов 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-х часов 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 проводимых 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 ТНПА.



## 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

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

## **Обоснование целесообразности практического использования**

Нейтрофильные гранулоциты (Нф) обладают широким набором функциональных свойств, направленных на уничтожение микроорганизмов, наиболее изученными из которых и наиболее широко используемыми являются оценка способности к поглощению тест-частиц (фагоцитоз) и образованию активных форм кислорода (тест восстановления нитросинего тетразолия – НСТ-тест) [1]. Определение фагоцитоза является тестом первого уровня при оценке иммунного статуса, однако тест характеризуется низкой чувствительностью [2; 3]. Поэтому иммунологическое обследование дополняют НСТ-тестом, который, напротив, отличается высокой чувствительностью и позволяет судить о способности нейтрофилов к завершённому фагоцитозу [4; 5]. Оба теста в совокупности являются достаточно информативными для характеристики потенциальной внутриклеточной бактерицидности Нф.

В настоящее время показана способность Нф к высвобождению во внеклеточное пространство сетеподобных структур («внеклеточных нейтрофильных ловушек», *neutrophil extracellular traps, NET*) [6], которые обладают противомикробной активностью по отношению к широкому ряду микроорганизмов (*Haemophilus influenzae*, *E. coli*, *Lactobacterium spp.*, *Bifidobacterium spp.* и др.), а также по отношению к объектам слишком крупным для фагоцитоза [7]. В какой степени, и на каких этапах иммунного ответа вышеописанные проявления реактивности нейтрофила взаимодействуют друг с другом пока не совсем ясно, однако всеми исследовате-

лями признается необходимость комплексной оценки различных функций Нф у пациентов с иммунопатологией.

Серьезным препятствием к применению показателя NET в клинко-диагностических лабораториях является многообразие методических подходов, общими недостатками которых является длительная инкубация клеточных культур (от 1,5 ч и более), использование в качестве стимуляторов живых культур микроорганизмов, невозможность сопоставления с другими проявлениями функциональной активности (в частности, фагоцитозом и НСТ-тестом). В клинко-диагностических лабораториях нашей республики данный метод пока не используется

Предлагаемый подход позволяет оценить разнообразные проявления реактивности Нф (поглотительную активность, NET-образующие свойства и кислород-продуцирующую активность) без дополнительных затрат реактивов и значительного увеличения трудоемкости, несложен в выполнении, доступен для использования. Его внедрение в клинко-диагностических лабораториях учреждений здравоохранения, выполняющих исследование иммунограммы, позволит повысить результативность оценки функциональных свойств Нф.

#### **ЛИТЕРАТУРА:**

1. Нестерова, И. В. Нейтрофильные гранулоциты – ключевые клетки иммунной системы / И. В. Нестерова, И. Н. Швыдченко, В. А. Роменская // Аллергология и иммунология. – 2008. – Т. 9, № 4. – С.432-435.

2. Алешина, Р. М. Синдром вторичной иммунной недостаточности: клинко-лабораторная характеристика / Р. М. Алешина // Клиническая иммунология. Аллергология. Инфектология [Электронный ресурс]. – 2007. – № 2. – Режим доступа: <http://immuno.health-ua.com/article/78.html>. – Дата доступа: 03.06.2014.

3. Лусс, Л.В. Вторичная иммунная недостаточность и иммунокомпromетированный пациент. В чем проблемы? / Л.В. Лусс // Аллергология и иммунология в педиатрии [Электронный ресурс]. – 2007. – № 2 (11). – Режим доступа: <http://www.adair.ru/images/upload/1342/ru/vtorichnaya%20immunnaya%20nedostatochnost.pdf>. – Дата доступа: 03.06.2014.
4. Маянский, А. Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге / А. Н. Маянский, Д. Н. Маянский. – Новосибирск: Наука, 1989. – 342 с.
5. Лебедев, К. А. Иммунная недостаточность (выявление и лечение) / К. А. Лебедев, И. Д. Понякина. – М.: Медицинская книга, 2003. – 443 с.
6. Brinkmann V., Rechard U., Goosmann C., et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria // *Science*. – 2004. – Vol. 303. – P. 1532–1535.
7. Zychlinsky, A. / NETs: a new strategy for using old weapons / A. Zychlinsky // *Trends in Immunology*. – 2009. – Vol.30, №11. – P. 513-521.

#### **АВТОРЫ:**

Д.м.н., профессор, зав. кафедрой  
клинической лабораторной диагностики,  
аллергологии и иммунологии  
УО «Гомельский государственный  
медицинский университет»

И.А. Новикова

Аспирант очной формы обучения  
кафедры клинической лабораторной  
диагностики, аллергологии и иммунологии  
УО «Гомельский государственный  
медицинский университет»

В.В. Железко