

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

« 06/07/2015 » 2015 г.

Регистрационный № 061-0615



**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ МАРКЕРОВ
ИНФЕКЦИОННОГО МОНОНУКЛЕОЗА**

Инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ - РАЗРАБОТЧИКИ:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»,

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,

Учреждение здравоохранения «Городская клиническая инфекционная больница» г. Минска

АВТОРЫ: к.м.н. Гончаров А.Е., Давидович Г.М.,
д.м.н., профессор Карпов И.А., Гуцалюк И.Я., Романова И.В.

Минск, 2015

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод определения маркеров инфекционного мононуклеоза путем определения ряда иммунологических показателей, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на установление диагноза инфекционного мононуклеоза.

Инструкция предназначена для врачей-лаборантов и врачей-инфекционистов учреждений здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающим инфекционным мононуклеозом.

1 Показания к применению

Установленный диагноз инфекционного мононуклеоза.

2 Перечень необходимого оборудования, реагентов и расходных материалов

2.1 Оборудование:

1. проточный цитофлуориметр (минимум 4 канала флуоресценции);
2. центрифуга низкоскоростная (1000–3000 об/мин);
3. шейкер орбитальный;
4. весы лабораторные;
5. автоматические дозаторы на разные объемы;
6. контейнеры для хранения и транспортировки пробирок с кровью;
7. штативы для пробирок;
8. мерные колбы для приготовления растворов;
9. емкости для хранения и дезинфекции отработанного биологического материала.

2.2 Расходные материалы:

1. наконечники пластиковые с аэрозольным барьером объемом 1–5 мл, 0,01–0,1 мл, 0,1–1,0 мл и 0,5–10 мл;
2. пробирки для цитофлуориметра;

3. вакутайнеры с ЭДТА.

2.3 Реагенты:

1. моноклональные антитела к антигенам человека: CD3, CD8, CD4, CD25, CD39, CD127 и CD28 (наличие обязательно), CD45 (на усмотрение исследователя);

2. неорганические соли (натрия фосфат двузамещенный двенадцативодный, натрия хлорид, калия фосфат однозамещенный безводный, калия хлорид, калия гидрокарбонат, аммония хлорид);

3. тетранатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты;

4. параформальдегид;

5. вода аналитического качества.

Панели антител подбирают таким образом, чтобы антитела к CD25, CD39 и CD127 были конъюгированы с наиболее яркими из доступных флуорохромов: Brilliant Violet 421, фикоэритрином (PE), аллофикоцианином (APC), тандемом фикоэритрина и Cy7 (PE-Cy7). Антитела к молекулам CD45, CD3, CD4, CD8, CD28 могут быть конъюгированы с любым другим флуорохромом, который позволяет четко идентифицировать позитивную\негативную популяции клеток, и требует минимальной спектральной компенсации. Для уточнения списка флуорохромов, пригодных для использования, см. инструкцию по эксплуатации проточного цитофлуориметра.

К примеру, для цитофлуориметра с 8–10 каналами флуоресценции, может быть предложена следующая панель антител: CD4 FITC, CD39 PE, CD45 PerCP-Cy5.5, CD127 PE-Cy7, CD25 APC, CD3 APC-Cy7 (APC-H7), CD28 BV421, CD8 V500 (AmCyan). Для цитофлуориметра с 4–5 каналами флуоресценции могут быть использованы следующие 2 панели: 1) CD4 FITC, CD39 PE, CD127 PE-Cy7, CD25 APC; 2) CD3 FITC, CD8 PE, CD45 PerCP (PerCP-Cy5.5), CD28 APC.

2.4 Приготовление растворов

Растворы готовят согласно приведенным ниже прописям и хранят до использования при температуре от +2 до +8°C в течение не более 1 месяца.

Лизирующий раствор (10× раствор, 100 мл):

- аммония хлорид – 8,29 г.;
- калия гидрокарбонат – 1,0 г.;
- тетранатриевая соль этилендиамина тетрауксусной кислоты – 0,37 г.;
- воды аналитического качества до 100 мл.

Фиксирующий раствор (1× раствор, 100 мл):

- параформальдегид – 4,0 г.;
- калия фосфат однозамещенный безводный – 0,2 г.;
- хлорид калия – 0,2 г.;
- натрия фосфат двузамещенный двенадцативодный – 2,9;
- натрия хлорид – 8,0 г.;
- воды аналитического качества до 100 мл.

2.5 Средства индивидуальной защиты и дезинфектанты:

1. лабораторный халат;
2. латексные или нитриловые перчатки;
3. дезинфицирующий раствор, предназначенный для обработки рук персонала;
4. дезинфицирующий раствор для инактивации биологического материала.

3 Описание использования метода

3.1 Забор материала

Забор крови проводят утром натощак из локтевой вены в вакутайнер с ЭДТА. Закрытый вакутайнер с кровью несколько раз переворачивают для смешивания крови с антикоагулянтом.

3.2. Правила транспортировки и хранения материала

Вакутайнеры с кровью доставляют в лабораторию непосредственно в день забора материала. Кровь хранят до использования не более 24 часов при температуре от +18 до +25°C.

3.3 Пробоподготовка

Для каждой пробы отбирают и маркируют необходимое количество пробирок для цитофлуориметра: 1) пробирки со смесью антител, 2) пробирки с каждым из антител по-отдельности (так называемые, «single-stain» контроли). В пробирки добавляют антитела в необходимом количестве (согласно инструкции по применению антител). Затем в пробирки вносят по 100 мкл крови, тщательно перемешивают содержимое пробирок и инкубируют в течение 15 минут при +2–8°C в темноте. Затем эритроциты лизируют в 3 мл 1× лизирующего раствора в течение 15 минут при комнатной температуре в темном месте. Клетки центрифугируют 5 минут при 200g; супернатант удаляют переворачиванием пробирки. Ресуспендируют клетки в 500 мкл фиксирующего раствора.

3.4 Анализ данных

Учет образцов на цитофлуориметре включает следующие обязательные этапы:

1. контроль работоспособности/калибровку прибора, выбор лазеров и необходимых каналов флуоресценции для работы с используемой панелью антител;
2. настройку параметров светорассеяния на цитограмме, построенной в координатах FSC\SSC;
3. настройку параметров «FSC area scaling» и «laser area scaling» на датчике прямого светорассеяния и используемых лазерах (если присутствуют в используемой модели цитофлуориметра);

4. настройку параметров порога учета (threshold) по каналу FSC, чтобы исключить из анализа клеточный детрит;

5. настройку напряжения на каналах флуоресценции с использованием неокрашенного контрольного образца так, чтобы клетки располагались в первой декаде на всех каналах флуоресценции;

6. автоматическую или ручную настройку спектральной компенсации с использованием «single-stain» контролей;

7. анализ исследуемых образцов с подсчетом минимум 100 000 клеток.

В процессе анализа CD39⁺ Т-регуляторных клеток выполняют последовательное гейтирование (CD45⁺) лимфоцитов, CD4⁺ Т-клеток, CD127⁻CD25^{hi} клеток, затем, на гистограмме выделяют CD39⁺ Т-регуляторные клетки. Гейтирование CD3⁺CD8⁺ клеток и CD3⁺CD28⁺ клеток выполняют стандартно.

3.5 Интерпретация данных

Маркерами инфекционного мононуклеоза, склонного к затяжному течению, являются: 1) содержание CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов ниже $1,9 \times 10^6$ /мл и/или 2) содержание CD39⁺ Т-регуляторных клеток ниже $0,008 \times 10^6$ /мл и/или 3) содержание CD28⁺ Т-лимфоцитов ниже $1,4 \times 10^6$ /мл. В случае, если выявлено снижение содержания в периферической крови минимум 2-х вышеперечисленных показателей, пациенту выставляют диагноз риска затяжного течения инфекционного мононуклеоза.

4 Перечень возможных ошибок при выполнении метода и пути их устранения

В таблице представлены проблемы и методические ошибки, которые могут возникнуть при выполнении метода с описанием причин возникновения и путей их устранения (таблица).

Таблица – Возможные ошибки или осложнения при выполнении метода и пути их устранения

Проблема	Возможная причина	Пути устранения
Анализ иммуно-фенотипа: слабая интенсивность свечения, плохое разделение популяций	Недостаточное количество антител	Добавлять достаточное количество антител
	«Выгорание» флуорохромов	Инкубация клеток в темноте, сведение времени манипуляций с клетками к минимуму
	«Тусклые» флуорохромы	Использовать наиболее яркие флуорохромы (BV421, PE, APC, PE-Cy7)
	Недостаточное смешивание антител с пробой	Тщательно смешивать антитела с клетками
Высокая фоновая флуоресценция	Некорректно выполненная настройка цитометра	Настраивать цитофлуориметр согласно инструкции по эксплуатации
	Клетки не отмыты от антител	Тщательно отмывать клетки в буфере для окрашивания
	Некачественные антитела	Использовать другие антитела
Чрезмерные потери клеток	Некорректно выполненная настройка цитометра	Настраивать цитофлуориметр согласно инструкции по эксплуатации
	Недостаточное время центрифугирования	Соблюдать время центрифугирования
	Непригодные растворы, длительное время инкубации	Следовать пунктам инструкции
Недостаточный лизис эритроцитов	Некорректное удаление супернатанта	Правильно удалять супернатант
	Неправильно приготовленный раствор	Следовать пунктам инструкции
	Недостаточное перемешивание	Двухкратное перемешивание на шейкере
	Некорректный температурный режим	Лизис при комнатной температуре

5 Противопоказания для применения

Отсутствуют.