

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра
Л. Богдан
« 20 » 2020 г.
Регистрационный № 054-0620



**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСМОТИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ
ЭРИТРОЦИТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОТОЧНОЙ
ЦИТОМЕТРИИ**

(инструкция по применению)

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека», государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

АВТОРЫ: Мицура Е.Ф., д.м.н., доцент Рожко А.В., к.м.н., доцент Волкова Л.И., Пугачева Ж.Н., к.м.н., доцент Ярец Ю.И., к.м.н. Ромашевская И.П.

Гомель, 2020

Список сокращений

УЗИ – ультразвуковое исследование

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

FSC – прямое рассеивание света (Forward Scatter)

SSC – боковое рассеивание света (Side Scatter)

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод определения осмотической резистентности эритроцитов с использованием метода проточной цитометрии, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику наследственного сфероцитоза.

Метод, изложенный в настоящей инструкции, предназначен для врачей-гематологов, врачей лабораторной диагностики и других врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих помощь пациентам с различными формами гемолитических анемий в стационарных и (или) амбулаторных условиях, и (или) в условиях дневного пребывания.

1. Перечень необходимых изделий медицинской техники и изделий медицинского назначения

проточный цитофлуориметр;

термостат, позволяющий поддерживать температуру $+37\pm 2^{\circ}\text{C}$;

пробирки для забора крови с антикоагулянтом К2/К3 ЭДТА;

пластиковые пробирки для отмывки эритроцитов объемом 10 мл;

одноразовые полистирольные пробирки 12*75 мм;

автоматические пипетки и одноразовые наконечники вместимостью 20, 500, 1000 мкл;

автоматический встряхиватель (типа Vortex);

центрифуга с режимом 1000-1100 об/мин;

буфер (фосфатно-солевой буфер (ФСБ), 0,01 М фосфат натрия, 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2);

дистиллированная вода;

перчатки.

2. Показания к применению:

Наследственный сфероцитоз (D58.0).

3. Противопоказания к применению:

нет.

4. Описание технологии используемого метода

4.1. Получение биологического материала.

Биологическим материалом служит периферическая венозная кровь, получение которой проводят общепринятыми методами (приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь №1123 от 10.11.2015), взятая по 0,5–1,5 мл в 2 пробирки с антикоагулянтом (К2/К3 ЭДТА).

4.2. Пробоподготовка

Пробирка 1 - исследования проводят в день доставки материала. В пробирку для отмывки эритроцитов добавляют 2 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ), затем вносят 0,5 мл крови. Центрифугируют при 1000-1100 оборотов/мин. в течении 5 мин. Супернатант удаляют аспирацией, клеточный осадок ресуспендируют и добавляют по 2 мкл в каждую тест-пробирку с заданной концентрацией буфера. Разведения ФСБ помещают в отдельные пробирки, где путем добавления дистиллированной воды получают концентрации конечного раствора 80%, 70%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%.

Каждую тест-пробирку со взвесью эритроцитов в растворах ФСБ с заданной концентрацией встряхивают на «вортексе» 2-3 секунды и инкубируют в течении 30 минут при комнатной температуре (от +18 С до +25 С), после чего для снижения агрегации эритроцитов еще раз встряхивают на «вортексе» 2-3 секунды.

Пробирку 2 помещают в термостат при +37°C для инкубирования на 24 часа, после чего выполняют пробоподготовку аналогично порядку действий с пробиркой 1 и переходят к этапу 3.3.

4.3. Определение осмотической резистентности эритроцитов с использованием проточной цитометрии

Каждую тест-пробирку со взвесью эритроцитов в растворах ФСБ с заданной концентрацией анализируют на проточном цитометре с помощью

соответствующего программного обеспечения с использованием стандартных настроек.

Устанавливают границы целевой популяции эритроцитов внутри электронного окна, задаваемого на «dot-plot» цитограмме, которая соотносит рассеивание света под прямым углом (боковое рассеивание – Side Scatter или SSC) с рассеиванием света под малым углом (прямое рассеивание – Forward Scatter или FSC).

Анализируют около 10 000 клеток на dot-plot цитограмме бокового рассеивания (SSC) по сравнению с прямым рассеиванием (FSC) в логарифмической шкале. Оценивают сохранное число эритроцитов, подвергнутое воздействию гипотонического раствора.

Результаты выражают в виде доли сохраненных клеток в % от общего числа зарегистрированных событий. Интактные эритроциты находятся в правом верхнем квадрате на dot-plot цитограмме SSC по сравнению с FSC (рис., А). Когда эритроциты достигают точки гемолиза, внутриклеточное содержимое выходит из клетки, что сопровождается уменьшением параметров SSC и FSC на dot-plot цитограмме. В результате гемолизованные эритроциты перемещаются в левый нижний квадрат на dot-plot цитограмме, а неповрежденные эритроциты остаются в верхнем правом квадрате (рис., Б). Последовательно анализируют данные каждой тест-пробирки.

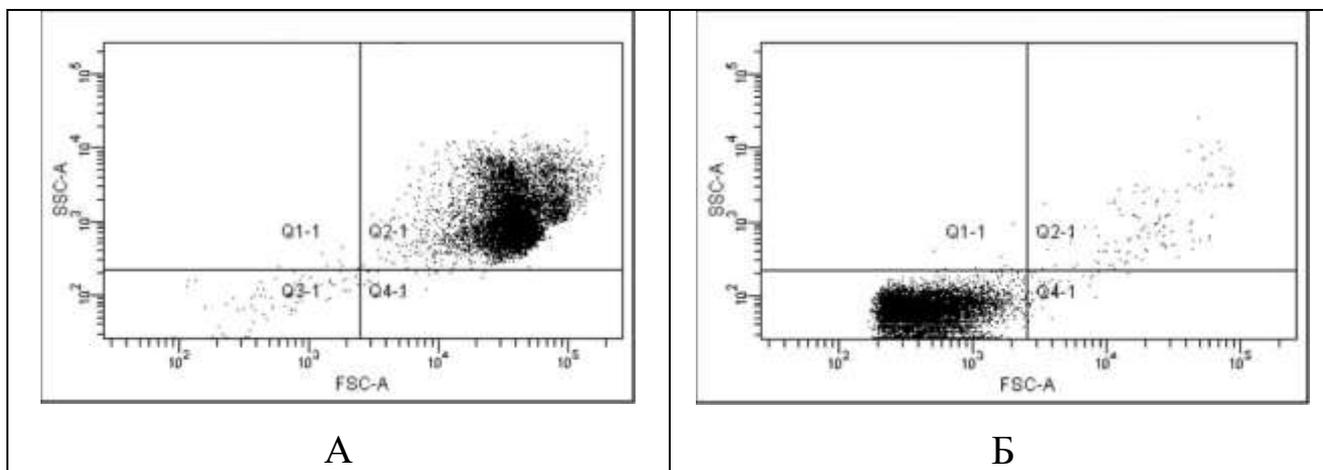


Рисунок. Dot-plot цитограммы бокового рассеивания (SSC) по сравнению с прямым рассеиванием (FSC) в 80% ФСБ (А) и в 30% ФСБ (Б)

4.4. Интерпретация результатов и выдача заключения

Результаты, полученные в ходе реализации этапа 4.3 настоящей инструкции (% сохранных эритроцитов в растворах ФСБ различной концентрации до и после инкубации), сравнивают с референтными значениями здоровых лиц (таблица).

Таблица. Нормальные величины гемолиза в свежей крови и после инкубации

Концентрация раствора ФСБ	% сохранных эритроцитов	
	пробирка 1	пробирка 2
80%	96,7-99,7	93,1-99,3
70%	97,0-99,7	93,1-99,4
60%	94,8-99,7	90,7-99,0
55%	94,8-99,6	73,6-97,8
50%	88,4-99,4	53,8-93,6
45%	45,1-96,0	30,0-79,0
40%	12,0-95,1	8,0-65,6
35%	5,0-65,1	4,6-41,4
30%	3,0-33,9	3,8-30,1

Если доля сохранных эритроцитов меньше референтных значений в двух или более тест-пробирках, либо в свежей крови (пробирка 1), либо после инкубации (пробирка 2), результат считают положительным, что является критерием установления диагноза «наследственный сфероцитоз» (D58.0).

Результат определения осмотической резистентности эритроцитов с использованием проточной цитометрии выдают в виде таблицы с указанием полученных значений пациента (% сохранных эритроцитов в растворах ФСБ различной концентрации до и после инкубации) и референтных значений здоровых лиц.

Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении и пути их устранения

Использование метода, изложенного в настоящей инструкции, подразумевает следование всем правилам по работе с биологическим материалом и техники безопасности.