

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**



УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель Министра  
\_\_\_\_\_ Д.Л. Пиневиц

«16» декабря 2016 г.

Регистрационный № 115-1216

**МЕТОД ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ РЕМИССИИ  
ГЕРПЕТИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ**  
инструкция по применению

**УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:**

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический  
центр радиационной медицины и экологии человека»

**АВТОРЫ:**

к.б.н. Саливончик А.П., д.м.н., доцент Рожко А.В., Гусакова Н.В., к.м.н.  
Гомоляко А.В., к.м.н., доцент Ярец Ю.И., к.б.н., доцент Шевченко Н.И.

Гомель, 2016

Настоящая инструкция по применению (далее – инструкция) разработана с целью оценки состояния ремиссии у пациентов с герпетической инфекцией тяжелого течения для проведения адекватной вакцинации, не сопровождающейся осложнениями в виде обострения основного заболевания.

Инструкция предназначена для врачей-иммунологов, врачей-инфекционистов, врачей-дерматовенерологов, врачей лабораторной диагностики организаций здравоохранения районного, областного и республиканского уровней.

### **Перечень необходимого оборудования, реактивов, расходных материалов, изделий медицинского назначения**

#### **Оборудование:**

– световой микроскоп объектив 100×/1,25 (масляная иммерсия), окуляр WF10×/18мм;

– люминесцентный микроскоп или световой микроскоп с люминесцентной насадкой, объектив 100×/1,25 (масляная иммерсия), окуляр WF10×/18мм;

– камера Горяева;

– денситометр;

– центрифуга лабораторная;

– термостат (+37°C);

– холодильник бытовой;

– морозильная камера (-20°C);

– мембранный фильтр ЭПМ.ПС 0,2 мкм;

– одноканальные дозаторы переменного объема (0,1–1,0 мл).

### **Материалы и реактивы:**

- фиксатор эозин-метиленовый синий по Май-Грюнвальду;
- краситель азур-эозин по Романовскому;
- краситель акридиновый оранжевый;
- краситель этидиум бромид;
- среда RPMI-1640;
- гепарин натрия (5000 ЕД/мл);
- вода дистиллированная ГОСТ 6709-20;
- физиологический раствор натрия (0,9% NaCl), стерильный;
- фосфатно-солевой буфер (pH 7,4);
- суточная культура *S. aureus* (штамм ATCC 25923);
- масло иммерсионное нефлуоресцирующее.

### **Лабораторная посуда, принадлежности:**

- пробирки полипропиленовые (10 мл);
- пробирки типа Эппендорф (1,5 мл);
- кюветы полистирольные одноразовые (1мл);
- предметные стекла ГОСТ 9284-75;
- покровные стекла ГОСТ 6672-75;
- наконечники для дозаторов.

### **Показания к применению**

Герпетический везикулярный дерматит (B00.1), герпетический гингивостоматит и фаринготонзиллит (B00.2), герпетические инфекции половых органов и мочеполового тракта (A60.0), герпетические инфекции перианальных кожных покровов и прямой кишки (A60.1).

### **Противопоказания для применения**

Противопоказаний нет.

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

Метод оценки состояния ремиссии у пациентов с рецидивирующей герпетической инфекцией (РГИ) основан на констатации отсутствия клинических проявлений герпетической инфекции в течение двух и более недель на момент обследования с последующим определением показателей нетоза и апоптоза нейтрофилов периферической крови в спонтанном и стимулированном вариантах. Сравнение полученных результатов нетоза и апоптоза с пороговыми значениями позволяет оценить состояние ремиссии с целью дальнейшего проведения противорецидивной терапии у пациентов с РГИ.

Материалом для исследования является гепаринизированная (20 ЕД/мл) периферическая кровь, полученная путем венепункции с соблюдением стандартных правил преаналитического этапа.

### 1. Подготовка секреторных продуктов *S. aureus*

Полную микробиологическую петлю (10 мкл) суточной культуры *S. aureus* (штамм АТСС 25923) суспензируют в 100 мл питательной среды RPMI-1640 до концентрации  $10^8$  частиц/мл (контроль по стандарту мутности McFarland). Микробную взвесь инкубируют 24 часа при  $37^{\circ}\text{C}$ , далее центрифугируют при  $960g$  в течение 30 минут для осаждения бактерий, надосадочную жидкость пропускают через стерилизующий фильтр с диаметром пор  $0,2 \mu\text{m}$  для удаления остаточных бактерий. Готовую рабочую суспензию разливают по аликвотам (1 мл) и хранят до использования при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2. Подготовка лейкоконцентрата

5 мл венозной крови забирают в пластиковые пробирки с гепарином (20 ЕД/мл), отстаивают при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 30 минут под углом  $45^{\circ}$ , затем в вертикальном положении 15 минут при комнатной температуре. Верхний слой плазмы удаляют, нижний слой плазмы и лейкоцитарную пленку

собирают в отдельную пробирку и доводят фосфатно-солевым буфером (рН 7,4) до концентрации  $5 \times 10^6$  нейтрофилов/мл. В подготовленном лейкоконцентрате далее производится одновременная оценка показателей нетоза и апоптоза нейтрофилов (НГ) в спонтанном и стимулированном вариантах.

### 3. Определение показателей нетоза (NET, neutrophil extracellular trap)

Для определения *спонтанного уровня* нетоза (NETсп) смешивают 0,1 мл лейкоконцентрата с 0,2 мл RPMI-1640 и инкубируют 150 минут при 37°C в полистирольных кюветах. Для определения *стимулированного уровня* нетоза (NETст) смешивают 0,1 мл лейкоконцентрата с 0,1 мл RPMI-1640 и 0,1 мл секреторных продуктов *S. aureus* и инкубируют 150 минут при 37°C в полистирольных кюветах. По окончании времени инкубации клеточную суспензию центрифугируют 5 минут при 250g. Надосадочную жидкость удаляют, осадок ресуспензируют и делают тонкие мазки. Затем предметные стекла высушивают, фиксируют и окрашивают красителем азур-эозин по Романовскому. Микроскопируют с использованием иммерсионного увеличения, подсчет производят в щеточной каемке. NETs представлены тонкими свободнолежащими внеклеточно расположенными нитями, занимающими пространство, в 2–3 раза превосходящее размер неизмененного НГ. Подсчитывают процентное содержание NETs при просмотре 200 НГ.

### 4. Определение показателей апоптоза нейтрофилов

Для определения *спонтанного уровня* апоптоза (Асп) смешивают 0,1 мл лейкоконцентрата с 0,2 мл RPMI-1640 и инкубируют 150 минут при 37°C в полистирольных кюветах. Для определения *стимулированного уровня* апоптоза (Аст) смешивают 0,1 мл лейкоконцентрата с 0,1 мл RPMI-1640 и 0,1 мл секреторных продуктов *S. aureus* и инкубируют 150 минут при 37°C в полистирольных кюветах. По окончании времени инкубации

клеточную суспензию центрифугируют 5 минут при 250g. Надосадочную жидкость удаляют, осадок ресуспензируют, наносят на предметное стекло и, не высушивая, окрашивают смесью акридинового оранжевого (100 мкг/мл) с этидиумом бромидом (100 мкг/мл) в соотношении 1:1. Затем закрывают мазки под покровные стекла и анализируют препараты посредством люминесцентной микроскопии ( $\lambda_{\text{возбуждения}} 490 \text{ нм}$ ;  $\lambda_{\text{эмиссии}} 520 \text{ нм}$ ). Определяют долю жизнеспособных и апоптотических клеток, подсчитывая не менее 200 НГ. Жизнеспособные НГ представляют собой клетки, ядро которых имеет рыхлую, неоднородную структуру и бледно-зеленую флуоресценцию за счет акридинового оранжевого. Ядра апоптотически измененных НГ характеризуются конденсацией хроматина в виде ярких, плотных, однородно окрашенных сфер или полумесяцев, которые также имеют зеленое свечение. Маргинация хроматина в виде глыбок красно-оранжевого цвета, вследствие накопления этидиума бромида, является специфическим признаком некроза НГ.

##### 5. Интерпретация полученных результатов (таблица 1)

Таблица 1. – Критерии оценки состояния ремиссии герпетической инфекции

Клинический критерий	Лабораторный критерий	Интерпретация
Отсутствие клинических проявлений РГИ $\geq 2$ недель	NETст < 19,5% Асп < 7,5%	Показание к вакцинотерапии (полная ремиссия)
	NETст $\geq 19,5\%$ Асп $\geq 7,5\%$	Противопоказание к вакцинотерапии (неполная ремиссия)

Диагностическая эффективность предложенного метода оценки состояния ремиссии герпетической инфекции составляет 81%; клиническая чувствительность – 79%, клиническая специфичность – 83%.

## **Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении и пути их устранения**

Осложнений при применении данного метода не зарегистрировано.

Ошибки могут быть связаны с нарушением технологии выполнения исследования и неточным установлением давности предшествующего обострения РГИ.

### Пути устранения ошибок:

1. Соблюдение требований преаналитического этапа, последовательности операций при выполнении исследований, соблюдение объемов реактивов.

2. Четкое соблюдение условий хранения материалов и реактивов, необходимых для выполнения исследований.

3. Для получения воспроизводимых результатов при использовании флуоресцирующих красителей необходимо выдерживать строгие условия прокраски биологических объектов (рН, концентрацию, беречь от солнечного света).

4. При выполнении исследований необходимо соблюдать меры безопасности согласно действующим приказам ТНПА.