

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра
Е. Л. Богдан
« » 2025 г.



Регистрационный № 007-0225

**МЕТОД ДИАГНОСТИКИ КАЧЕСТВЕННЫХ ДЕФЕКТОВ
ТРОМБОЦИТОВ (D69.1)**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: государственное научное учреждение «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси», государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

АВТОРЫ: Кохан А.Ю., к.б.н. Шамова Е.В., д.м.н., профессор Дмитриев В.В.

Минск, 2025

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДФ – аденозиндифосфат

БТ – буфер Тироде

APC – аллофикоцианин

CD – кластер дифференциации

FITC – изотиоцианат флуоресцеина

FSC – прямое светорассеяние

GP – гликопротеин

SSC – боковое светорассеяние

HEPES – (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота)

MFI – средняя интенсивность флуоресценции

PerCP – перидин-хлорофилл протеин

PAR – протеиназо-активируемый рецептор

TRAP-6 – пептид-активатор рецептора тромбина 6

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод диагностики качественных дефектов тромбоцитов. Метод основан на оценке функционального состояния тромбоцитов с использованием проточной цитометрии.

Метод предназначен для врачей клинической лабораторной диагностики, врачей-гематологов, иных врачей-специалистов, оказывающих специализированную помощь (V технологический уклад) в амбулаторных и (или) стационарных условиях, и (или) отделениях дневного пребывания пациентам с различными клиническими проявлениями геморрагического синдрома.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Диагностика качественных дефектов тромбоцитов (D 69.1)

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Отсутствуют.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, РЕАКТИВОВ И РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ

проточный цитометр, оснащенный не менее чем 2 лазерами (синий – 488 нм, красный – 638 нм, или аналогичные), и позволяющий проводить регистрацию флуоресценции для красителей PerCP, изотиоцианат флуоресцеина (FITC) и аллофикоцианин (APC);

автоматические дозаторы переменного объема на 0,5–10 мкл, 20–200 мкл, 100–1000 мкл;

весы лабораторные;

pH-метр;

шейкер-центрифуга лабораторная;

штативы для пробирок;

мерные колбы для приготовления растворов;

контейнеры для хранения и транспортировки пробирок с кровью;

емкости для хранения и дезинфекции отработанного биологического материала.

наконечники пластиковые на объем 0,5–10,0 мкл, 20–200 мкл, 100–1000 мкл;

пробирки полистироловые объемом 0,2 мл, 0,5 мл, 1,5 мл и 2,0 мл;

планшеты 96-луночные или пробирки для цитофлуориметра;

моноклональное антитело к антигену CD42b (anti-CD42b, клон АК2), конъюгированное с флуорохромом PerCP, моноклональное антитело к антигену CD41 (anti-CD41, HIP8), конъюгированное с флуорохромом PerCP/Cy5.5, моноклональное антитело к антигену PAC-1 (anti-PAC-1, клон PAC-1), конъюгированное с флуорохромом FITC, моноклональное антитело к антигену CD63 (anti-CD63, клон MEM-259), конъюгированное с флуорохромом FITC, моноклональное антитело к антигену CD62P (anti-CD62P, клон АК4), моноклональное антитело к антигену CD45 (anti-CD45, клон HI30), конъюгированное с флуорохромом APC, Annexin V, конъюгированный с флуорохромом APC;

неорганические соли (хлорид натрия, хлорид калия, гидрокарбонат натрия, дигидрофосфат натрия, хлорид магния, хлорид кальция, гидроксид натрия);

соляная кислота;

HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота);

D-глюкоза;

бычий сывороточный альбумин;

вода аналитического качества;

аденозиндифосфат (АДФ);

агонист рецептора PAR-1 тромбоцитов TRAP-6 (последовательность SFFLRN);

агонист рецептора PAR-4 тромбоцитов PAR4-AP (последовательность AYPGKF).

растворы для промывки/очистки проточного цитометра (согласно рекомендациям производителя прибора); калибровочные микросферы для настройки и мониторинга стабильности проточного цитометра (согласно рекомендациям производителя прибора).

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Метод, изложенный в настоящей инструкции, состоит из нескольких последовательных этапов.

1 Взятие образца крови

После подписания пациентом (или его законным представителем) информированного согласия на проведение исследования венозную кровь получают путем пункции периферической вены без наложения жгута, в

пластиковые пробирки типа «вакутайнер» с 3,2%-ным раствором цитрата натрия в соотношении 9:1. Закрытый вакутайнер с кровью несколько раз переворачивают для смешивания крови с антикоагулянтом.

Стабилизированную кровь хранят при комнатной температуре (18 – 22 °С) до выполнения исследования не более 3 часов. Не допускается резкое изменение условий хранения (повышение или понижение температуры), а также значительные механические воздействия (частое и сильное перемешивание, центрифугирование).

2 Подготовка образцов крови для анализа на проточном цитометре

Подготовить смесь антител:

- смесь антител I (CAI): 41 мкл БТ, 2 мкл anti-CD42b, 1 мкл anti-PAC-1, 2 мкл Annexin V и 1,8 мкл хлорида кальция;

- смесь антител II (CAII): 41 мкл БТ, 0,5 мкл anti-CD41, 4 мкл anti-CD63, 1 мкл anti-CD62P и 1,8 мкл хлорида кальция;

- смесь антител III (CAIII): 44 мкл БТ, 0,5 мкл anti-CD41; 2 мкл anti-CD45 и 1,8 мкл хлорида кальция.

Провести окрашивание образцов периферической крови, согласно инструкции, прилагаемой к антителам.

3 Учет проб на проточном цитометре

Учет проб проводить согласно инструкциям и рекомендациям производителя проточного цитометра.

Усиления (напряжения) на каналах флуоресценции PerCP и светорассеяния SSC (бокового) и FSC (прямого) установить таким образом, чтобы популяция CD42b⁺ и CD41⁺ тромбоцитов отображалась полностью, при этом популяция эритроцитов и CD45⁺ лейкоцитов (гранулоцитов, лимфоцитов и моноцитов) также попадали в область наблюдения. Установить значение параметра отсечки событий по размерам таким образом, чтобы регистрируемые события (тромбоциты) не были утрачены в процессе записи.

Усиления для каналов FITC и APC следует установить таким образом, чтобы наблюдалось увеличение интенсивности флуоресценции в 5 и более раз после активации образца смесью агонистов по маркерам PAC-1, CD63 и CD62P.

Образцы в пробирках регистрировать на скорости потока, не превышающей 15 мкл/мин. Для выставления границ популяций записать

контроль (образцы клеток без антител) с тем же итоговым разбавлением крови.

4 Определение нарушений тромбоцитарного звена гемостаза

Оценку полученных результатов можно проводить в любом программном пакете для анализа данных проточной цитометрии, позволяющим строить диаграммы светорассеяния, границы популяций, и считать статистические параметры популяции, такие как медиана, геометрическое среднее, процент положительных событий.

На точечной цитограмме в координатах FSC-A и SSC-A, выделить регион, содержащий все события за исключением лейкоцитов и эритроцитов. Данный регион отобразить в координатах PerCP-A и FSC-A, и выделить регион, содержащий тромбоциты – события CD42b⁺ и/или CD41⁺. Регион CD42b⁺ и/или CD41⁺ отобразить на точечной диаграмме по координатам FITC-A и FSC-A, выбрать регион популяции PAC-1⁺ и/или CD63⁺ тромбоцитов согласно неокрашенному образцу.

При построении цитограмм на всех этапах гейтирования использовать логарифмическую шкалу.

Изменения параметров, свидетельствующих о нарушениях тромбоцитарного звена гемостаза, перечислены в таблице 1. Для каждого параметра рассчитаны относительные изменения медианы и границ диапазона (10-й и 90-й перцентили) по отношению к медиане референсных значений, выраженные в процентах.

5 Принятие управленческого решения

При изменениях параметров, перечисленных в таблице 1 принимается решение о наличии у пациента качественных дефектов тромбоцитов (D69.1).

Таблица 1 – Перечень значимых изменений измеряемых параметров при качественных дефектах тромбоцитов (D69.1)

Тип патологии	Основные изменяемые параметры
Тромбастения Глансмана	- Отсутствие или значительное снижение количества GPIIb/IIIa (CD41) до и после активации (<10%); - Отсутствие или значительное снижение количества, активированного GPIIb/IIIa (PAC1) после активации (<10%).
Тромбоцитопатия при гемсиндроме не уточненной этиологии	- Увеличение размеров тромбоцитов (FSC) до активации (110 (90 – 120) %); - Снижение количества тромбоцитов с активированным GPIIb/IIIa (процент PAC1⁺ событий) после активации (95 (88 – 100) %); - Снижение количества активированного GPIIb/IIIa (PAC1) после активации (54 (30 – 98) %); - Снижение количества активированного GPIIb/IIIa, нормированного на размер (PAC1/FSC; 48 (27 – 83)%) и на количество данного рецептора (PAC1/CD41; 56 (30 – 98) %) после активации; - Снижение количества GPIb, нормированного на размер (CD42b/FSC; 92 (77 – 97)%) до активации; - Увеличение количества прокоагулянтных тромбоцитов (процент Annexin V⁺⁺ событий) после активации (160 (69 – 523) %)
Тромбоцитопатия при аномалии Мея-Хеттлина	<i>Из-за редкой распространенности заболевания приведены качественные изменения:</i> - Увеличение размеров (FSC) до и после активации; - Увеличение количества GPIIb/IIIa до и после активации; - Увеличение количества тромбоцитов с активированным GPIIb/IIIa до активации (процент PAC-1⁺ событий) - Увеличение количества GPIb (CD42b) до активации; - Увеличение количества, активированного GPIIb/IIIa (PAC1) до и после активации; - Увеличение деградации α-гранул (CD62P) до активации.

Примечание: представлены относительные изменения медианы и границ диапазона (10 й и 90 й перцентили) по отношению к медиане контрольной группы, %.

ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ ВЫПОЛНЕНИЯ МЕТОДА И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

В таблице 2 представлены проблемы и методические ошибки, которые могут возникнуть при выполнении метода с описанием причин возникновения и путей их устранения.

Таблица 2 – Возможные ошибки или осложнения при выполнении метода и пути их устранения

Проблема	Возможные причина	Пути устранения
Праймированное функциональное состояние тромбоцитов в контрольном образце	Превышение времени хранения образца до анализа (3 часа)	Повторить анализ образца соблюдая временные условия хранения
	Излишнее механическое или термическое воздействие на образец в процессе хранения	Повторить анализ с соблюдением условий транспортировки и хранения образца
	Излишнее механическое воздействие в процессе пробоподготовки	Избегать появления пузырей и слишком активного пипетирования в процессе пробоподготовки
Отсутствие положительных событий или слишком слабая интенсивность флуоресценции	Некачественные антитела	Проверить антитела на образце здорового донора, использовать другие антитела
	«Выгорание» флуорохромов	Инкубация клеток в темноте, использовать другие антитела
	Отсутствие рецептора или маркера на поверхности тромбоцитов в образце	Проверить пациента на наличие врожденных нарушений тромбоцитов (тромбастения Гланцмана и др.)
Наличие слишком большого количества AnnexinV ⁺ событий	Лизис эритроцитов	Переделать буферные растворы
Наличие большого количества клеточного детрита и событий малого размера	Неправильная настройка параметра threshold	Поднять уровень отсечки по размерам (threshold)
	Контаминация буферных растворов	Разморозить новые буферные растворы, переделать буферные растворы