

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра



Ю.Л. Горбич
2024 г.

Регистрационный № 105-1124

**МЕТОД ИММУНОЦИТОМОРФОЛОГИЧЕСКОГО
ИССЛЕДОВАНИЯ ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТИ**
инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: государственное учреждение
«Республиканский клинический медицинский центр» Управления
делами Президента Республики Беларусь

АВТОРЫ: д.м.н., проф. И.С. Абельская, к.м.н., доцент О.А. Юдина,
П.М. Мотолянец, к.м.н. С.С. Галицкая.

Минск, 2024

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод иммуноцитоморфологического исследования гранулезных клеток фолликулярной жидкости, основанный на применении жидкостной цитологии и клеточных блоков, который может быть использован для прогнозирования имплантации эмбриона в комплексе медицинских услуг, направленных на профилактику осложнений, связанных с экстракорпоральным оплодотворением.

Инструкция предназначена для врачей-патологоанатомов, врачей-цитологов, врачей лабораторной диагностики, врачей акушеров-гинекологов, иных врачей-специалистов, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающим бесплодием, в стационарных и/или амбулаторных условиях, и/или в условиях отделений дневного пребывания.

1. ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Женское бесплодие (N97).

2. ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Отсутствуют.

3. ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, РЕАГЕНТОВ И РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ

1. Микротом гистологический.
2. Термостоллик.
3. Охлаждающий столик.
4. Микроскоп световой.
5. Водяная баня.
6. Термостат, поддерживающий температуру +35...+70 °С.
7. Холодильник, поддерживающий температуру +2...+8 °С.
8. Морозильная камера, поддерживающая температуру минус 18 °С.

9. Вытяжной шкаф.
10. Барокамера лабораторная.
11. Центрифуга лабораторная.
12. Таймер электронный.
13. Процессор жидкостной цитологии Biodine CellPrep AUTO или аналог.
14. Автоматизированный аппарат окраски Leica ST5010 или аналог.
15. Емкости Коплина стеклянные.
16. Устройство для демаскировки.
17. Планшет для иммуногистохимического окрашивания.
18. Дозаторы пипеточные одноканальные (1-1000 мкл).
19. Стерильные пластиковые контейнеры с закручивающейся крышкой объемом 100 мл.
20. Вials с консервирующим раствором CellPrep LBC Solution или аналог.
21. Цифровой слайд-сканер Motic EasyScan или аналог.
22. Программа AperioImageScope (адрес доступа к программе: <https://www.leicabiosystems.com/digital-pathology/manage/aperioimagescope>).
23. Лезвия для микротомов одноразовые.
24. Предметные стекла с адгезивным электростатическим покрытием.
25. Покровные стекла.
26. Наконечники полимерные одноразовые объемом 1 мл к дозаторам пипеточным одноканальным.
27. 3% раствор перекиси водорода.
28. Гематоксилин Майера.
29. Эозин водно-спиртовой.

30. Среда для монтирования покровного стекла.
31. Деионизированная вода.
32. Ксилол.
33. Этанол 96%.
34. Агар-агар (П-900).
35. Гистологические кассеты.
36. Парафин гистологический.
37. Маркер гидрофобный для ограничения зоны нанесения реагентов.
38. Марлевые салфетки.
39. Фильтровальная бумага.
40. Одноразовые латексные перчатки.
41. Формалин 10% нейтральный забуференный.
42. Буферный раствор для демаскировки антигенов Tris-EDTA HIER Solution (10x) pH 9.0 или аналог.
43. Промывочный буфер Tris-BufferedSaline (TBS) WashBuffer (25x) pH 7.4 или аналог.
44. Реагент для устранения неспецифического фонового окрашивания (протеиновый блок).
45. Антитела анти-PR Rabbit pAb (FNab09774), анти - FSHR Rabbit pAb (FNab10096), Анти-ER β (ERb455) или аналоги.
46. Дилуэнт для разведения антител.
47. Универсальная система детекции (визуализации) к мышинным и кроличьим антителам Universal HRP PolymerDetectionKit или аналог.
48. Диаминобензидин DAB Chromogen Concentrate с дилуэнт DAB Substrate buffer или аналоги.
49. Полимерные пробирки с защелкивающейся крышкой (1,0-1,5 мл).

4. ТЕХНОЛОГИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Метод, изложенный в настоящей инструкции, реализуется поэтапно.

1. Получение фолликулярной жидкости

1.1. Образцы фолликулярной жидкости получают при аспирации ооцит-кумулюсных комплексов в соответствии клиническим протоколом «Лечение бесплодия методом экстракорпорального оплодотворения» утвержденным постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 24.12.2020 №115.

1.2. Собрать жидкость в стерильный пластиковый контейнер с закручивающейся крышкой объемом 100 мл и поместить в холодильник при температуре +8 °C на 24 часа для отстаивания.

2. Получение гранулезных клеток

2.1. Удалить после отстаивания проб надосадочную жидкость с помощью дозатора пипеточного одноканального с наконечниками полимерными одноразовыми объемом 1мл.

2.2. Клеточный материал поместить в виалу с консервирующим раствором на 1 час при комнатной температуре (+18...+25 °C).

3. Изготовление препаратов методом жидкостной цитологии

3.1. Поместить виалы с клеточным материалом в процессор жидкостной цитологии. Пробы готовить в автоматическом режиме: процессор жидкостной цитологии определяет клеточность образцов и выбирает режим нанесения клеток на предметное стекло (разведения, концентрации или стандартный); клетки проходят под давлением через мембранный фильтр и наносятся на предметное стекло с адгезивным электростатическим покрытием в виде монослоя; манипулятор помещает готовые препараты в корзину с этанолом 96%.

3.2. Фиксировать клетки в этаноле 96% от 30 до 60 минут.

4. Изготовление препаратов методом клеточных блоков

4.1. Удалить из вials надосадочную жидкость с помощью дозатора пипеточного одноканального с наконечниками полимерными одноразовыми объемом 1 мл.

4.2. Прибавить к осадку формалин 10% нейтральный забуференный на 24 часа.

4.3. Центрифугировать полученную смесь в центрифуге лабораторной (режим 1500 g) в течение 10 минут.

4.4. Приготовить раствор агар-агара путем смешивания 10 г порошка агар-агара (П-900) и 1 л воды с последующим нагреванием в термостате до +70 °C в течение 5 минут.

4.5. Добавить к осадку охлажденный до комнатной температуры (+18...+25 °C) раствор агар-агара из расчета 0,5-1 мл на один образец и поместить смесь в морозильную камеру при температуре минус 18 °C на 7 минут.

4.6. Рассечь охлажденный блок на диски толщиной 2-3 мм и поместить их в гистологические кассеты.

4.7. Гистологическая проводка клеточных блоков осуществляется общепринятыми методами.

4.8. Заливка в парафин гистологический осуществляется общепринятыми методами.

4.9. Приготовление срезов толщиной 3 мкм с помощью микротомы гистологического.

5. Окраска цитологических препаратов гематоксилином Майера и эозином водно-спиртовым в автоматизированном аппарате окраски

5.1. Провести регидратацию в трех сменах этанола 96% продолжительностью 2 минуты в каждой смене.

- 5.2. Промыть водопроводной водой в течение 1 минуты.
- 5.3. Экспонировать в гематоксилине Мейера в течение 2-5 минут.
- 5.4. Промыть водопроводной водой в течение 1 минуты.
- 5.5. Провести регидратацию в этаноле 96% в течение 1 минуты.
- 5.6. Экспонировать в эозине водно-спиртовом в течение 1-2 минут.
- 5.7. Промыть водопроводной водой в течение 2 минут.
- 5.8. Провести регидратацию в двух сменах этанола 96% продолжительностью 1 минута в каждой смене.
- 5.9. Экспонировать в ксилоле в течение 10 секунд.
- 5.10. Поместить цитологический препарат под покровное стекло в среде для монтирования.

6. Иммуноцитоморфологическое исследование

- 6.1. Поместить срезы на предметные стекла с адгезивным электростатическим покрытием.
- 6.2. Подсушить срезы при температуре +40...+45 °С на термостолике, затем поместить на 12-24 часа в термостат при температуре +37 °С.
- 6.3. Развести буферный раствор для демаскировки антигенов, промывочный буфер и диаминобензидин в соответствии с рекомендациями производителя.
- 6.4. Поместить срезы в ксилол на 5 минут.
- 6.5. Три емкости объемом 250 мл заполнить этанолом 96%. Промыть срезы в ёмкости I, а затем поместить срезы последовательно в емкость II и емкость III (на 5 минут в каждую).
- 6.6. Промыть срезы последовательно не менее чем в трех порциях деионизированной воды (по 2 минуты в каждой).

6.7. Демаскировать антигены в лабораторной барокамере 30 с или в водяной бане в течение 30 минут в буферном растворе для демаскировки антигенов.

6.8. Блокировать эндогенную пероксидазу 3% раствором перекиси водорода в течение 20 минут.

6.9. Промыть препараты в промывочном буфере (2 раза по 5 минут).

6.10. Нанести на срезы реагент для устранения неспецифического фонового окрашивания (протеиновый блок) и проинкубировать в условиях, определенных производителем реагента.

6.11. Инкубировать с первичным антителом (разведение рекомендованное производителем) в течение 30 минут при комнатной температуре (+18...+25 °C).

6.12. Промыть препараты в промывочном буфере (2 раза по 5 минут).

6.13. Визуализация результата реакции посредством универсальной системы детекции (в соответствии с рекомендациями производителя).

6.14. Промыть препарат под водопроводной водой.

6.15. Окрасить срезы гематоксилином Майера.

6.16. Промыть препарат под водопроводной водой.

6.17. Просушить срезы фильтровальной бумагой и поместить в емкости Коплина стеклянные с этанолом 96% на 5 минут.

6.18. Просушить срезы фильтровальной бумагой и поместить в емкости Коплина стеклянные с ксилолом 96% на 5 минут.

6.19. Поместить срез под покровное стекло в среде для монтирования.

7. Морфометрическая оценка рецепторного статуса фолликулярной жидкости

7.1. Оцифровать препараты с использованием цифрового слайд-сканера с расширением «.svs».

7.2. Микрофотографии (7-10 репрезентативных полей зрения) импортировать в среду компьютерной программы AperioImageScope для количественной оценки результатов иммуноцитоморфологического исследования.

7.3. Оценить ряд показателей в максимально возможном количестве полей зрения по стандартному алгоритму подсчёта позитивных пикселей «PositivePixelCount v9».

7.4. Рассчитать среднюю интенсивность всех пикселей.

7.5. Зафиксировать полученный результат для каждого из антител.

8. Прогнозирование эффективности имплантации эмбрионов

8.1. Подставить полученные данные в регрессионное уравнение:

$$Y = \frac{\exp(-200,97 + 0,050X_1 + 0,106X_2 + 24,65X_3)}{1 + \exp(-200,97 + 0,050X_1 + 0,106X_2 + 24,65X_3)} \quad (1)$$

где Y – регрессионная функция, отражающая вероятность имплантации эмбриона;

$\exp$ – основание натурального логарифма ($\approx 2,718$);

X_1, X_2, X_3 – предикторы:

X_1 – интенсивность экспрессии $ER\beta$;

X_2 – интенсивность экспрессии FSHR;

X_3 – средний размер клеток, мкм.

8.2. Рассчитать значение Y в компьютерной программе Microsoft Excel или иных программах, позволяющих осуществить расчет данного уравнения.

8.3. Оценить полученный результат. При значении $Y \geq 0,873$ имеет место высокая вероятность имплантации эмбриона.

Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении метода и пути их устранения

Возможные ошибки и осложнения	Пути устранения
Нарушение техники получения биологического материала, несоблюдение условий его хранения	Соблюдение технологии получения и хранения образцов биологического материала
Избыточная толщина среза, препятствующая оценке морфологии клеток.	Изготовить дополнительный срез, уменьшив его толщину путем регулировки винтов микротом
Низкое качество пробоподготовки ткани, заключенной в парафиновый блок.	Перед началом каждого цикла пробоподготовки проверить (при необходимости скорректировать) используемые в лаборатории условия и продолжительность фиксации, вырезки, проводки, заливки в парафин, нарезки и окраски материала.
Неудовлетворительное качество иммуногистохимического окрашивания	Повторить окрашивание дополнительного среза на одном стекле с положительным контролем. При необходимости провести корректировку условий демаскировки антигена, времени экспозиции первичного антитела, его разведения (если применимо), экспозиции компонентов системы детекции, температурного режима лаборатории.
Неправильная интерпретация специфичного иммуногистохимического окрашивания с антителами	Тщательное сопоставление качественных препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, с иммуногистохимически окрашенными срезами.