

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра
_____ Е.Н.Кроткова
_____ 2021 г.
Регистрационный № 169 – 1221



**МЕТОД ОЦЕНКИ ВЕРОЯТНОСТИ РАЗВИТИЯ ПЕРИТОНИТА У
ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ ПОЧЕК, НАХОДЯЩИХСЯ
НА ПЕРИТОНЕАЛЬНОМ ДИАЛИЗЕ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Гомельский государственный
медицинский университет»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. И. А. Новикова, д-р мед. наук, проф.
А. Н. Лызиков, канд. мед. наук, доц. В. В. Берещенко, канд. биол. наук, доц.
Н. И. Шевченко

Минск 2021

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Е. Н. Кроткова

24.12.2021

Регистрационный № 169-1221

**МЕТОД ОЦЕНКИ ВЕРОЯТНОСТИ РАЗВИТИЯ ПЕРИТОНИТА
У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ ПОЧЕК,
НАХОДЯЩИХСЯ НА ПЕРИТОНЕАЛЬНОМ ДИАЛИЗЕ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Гомельский государственный
медицинский университет»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. И. А. Новикова, д-р мед. наук, проф.
А. Н. Лызиков, канд. мед. наук, доц. В. В. Берещенко, канд. биол. наук, доц.
Н. И. Шевченко

Минск 2021

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод оценки вероятности развития перитонита (К65) у пациентов с хронической болезнью почек (далее — ХБП), находящихся на перитонеальном диализе (N18.5).

Метод основан на определении *in vitro* способности плазмы крови и перитонеального диализата пациентов подавлять интенсивность вспышки (I_{max}) люминолзависимой хемилюминесценции (далее — ЛЗХЛ) реакционной радикалообразующей смеси.

Применение метода позволит улучшить результаты лечения пациентов с ХБП, находящихся на перитонеальном диализе. Он позволяет выявить пациентов, находящихся на перитонеальном диализе с высоким прогностическим риском по развитию перитонита, тем самым начать ранее лечение данного осложнения и увеличить продолжительность ультрафильтрующих свойств брюшины.

Метод включает регистрацию интенсивности вспышки (I_{max}) люминолзависимой хемилюминесценции радикалообразующей смеси в присутствии перитонеального диализата и плазмы крови пациентов с последующим расчетом степени угнетения значений данного показателя.

Инструкция предназначена для врачей клинической лабораторной диагностики, врачей-хирургов, врачей-нефрологов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь в стационарных условиях пациентам, находящимся на перитонеальном диализе при ХБП.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Спектрофотометр/флуориметр Cary Eclipse FL 1002M003 (Variant, USA).
2. Кварцевые кюветы к прибору (длина оптического пути 10 мм).
3. Пробирки для взятия материала.
4. Автоматические дозаторы (0,1–1 мл) с одноразовыми наконечниками.
5. Бидистиллированная вода.
6. Люминол (5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиидион;
3-Аминофталгидрозид).
7. ДМСО — диметилсульфоксид (димексид).
8. Трис-буфер (pH = 8,8).
9. Сернокислое железо (FeSO₄·7H₂O) (квалификация не менее ч.д.а.).
10. Раствор хлорида натрия 0,9 %-й.
11. Перекись водорода (3 %-й раствор).
12. Диализирующий раствор (pH = 5,5–7,0).

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Оценка вероятности развития перитонита у пациентов с ХБП, находящихся на перитонеальном диализе.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Материалом для исследования является периферическая кровь, которую получают путем венепункции с соблюдением стандартных правил преаналитического этапа в пластиковые пробирки, используя в качестве антикоагулянта гепарин (из расчета 10 ЕД гепарина на 1 мл крови), и перитонеальный диализат, который собирают после перитонеального диализа в пробирку с гепарином (из расчета 15–20 ЕД гепарина на 1 мл исследуемого материала).

Этап 1. Подготовка исследуемого материала и расходных материалов

1.1. Полученную кровь центрифугируют в течение 10 мин при 1500 об/мин (500 g). Плазму используют для анализа.

1.2. Перитонеальный диализат перемешивают и используют для анализа.

Для выполнения методики достаточно 0,1 мл исследуемого образца.

Подготовка расходных материалов

1.1. 0,01 %-й раствор люминола: 5 мг люминола растворяют в 5 мл димексида. Исходный раствор можно хранить в темном месте при комнатной температуре (18–25 °С) в течение 1 мес.

1.2. Трис-буфер (pH = 8,8): в мерную колбу вместимостью 500 мл вносят 12,1 г трис-(гидроксиметил)-аминометана и 7,35 г кальция хлористого двухводного, растворяют в 500 мл бидистиллированной воды, доводят значение pH 1M раствором соляной кислоты. Хранят при комнатной температуре (18–25 °С).

1.3. Раствор сернокислого железа 25 ммоль/л: 28 мг $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 4 мл бидистиллированной воды, готовят ex tempore. Раствор хранению не подлежит.

1.4. 3 %-й раствор перекиси водорода.

Этап 2. Ход определения

2.1. Включают прибор (Спектрофотометр/флюориметр Cary Eclipse FL 1002M003 (Variant, USA) за 15–20 мин до исследования. Настраивают длину волны возбуждения — 400 нм, длину волны эмиссии — 450 нм.

2.2. Устанавливают ширину щели эмиссионного монохроматора 5 нм, эмиссионный фильтр в положение Open (открыт). Настраивают PMT Detector Voltage (напряжение на фотоэлектромножителе) на Medium (600 мВ).

2.3. Открывают крышку прибора и устанавливают кюветы в кюветодержатель. В кюветы вносят:

Контрольный раствор: 1 мл трис-буфера (pH = 8,8), 0,1 мл сернокислого железа (25 ммоль/л), 0,1 мл 0,01 %-го раствора люминола и 0,1 мл 0,9 %-го раствора хлорида натрия для плазмы крови (0,1 мл диализного раствора для перитонеального диализата, перемешивают).

Опытный образец: 1 мл трис-буфера (pH = 8,8), 0,1 мл сернокислого железа (25 ммоль/л), 0,1 мл 0,01 %-го раствора люминола и 0,1 мл исследуемого образца (плазма/перитонеальный диализат), перемешивают.

Непосредственно перед измерением в обе кюветы (опыт и контроль) вносят по 0,1 мл свежеприготовленного 3 %-го раствора перекиси водорода.

2.4. Закрывают крышку прибора и производят автоматическую регистрацию хемилюминесценции в течение 5 мин.

Основные этапы выполнения исследования представлены в таблице 1.

Таблица 1. — Основные этапы выполнения анализа

Ингредиенты	Опытная проба, мл	Контрольная проба, мл
Трис-буфер (pH = 8,8)	1	1
25 ммоль/л раствор сернокислого железа	0,1	0,1
0,01 %-й раствор люминола	0,1	0,1
Исследуемый материал (плазма/перитонеальный диализат)	0,1	—
0,9 %-й раствор натрия хлорида / раствор для диализа	—	0,1
3 %-й раствор перекиси водорода	0,1	0,1
Регистрация результатов		

Этап 3. Интерпретация результатов

3.1. Весь процесс регистрации ЛЗХЛ и обработки результатов проводится автоматически, что повышает точность и объективность полученной информации. Полученные данные обрабатывают предлагающейся к прибору программой и фиксируют в цифрах и графически.

3.2. Результаты исследования представляются как степень подавления значений интенсивности вспышки хемилюминесценции (I_{max}) при добавлении биологического материала (плазма или диализат) относительно положительного контроля (I_{max} радикалообразующей смеси). Расчет производят по формуле:

$$((I_{max_k} - I_{max_o}) / I_{max_k}) \times 100 \%,$$

где I_{max_k} — интенсивность вспышки контрольной (радикалообразующей) смеси;
 I_{max_o} — интенсивность вспышки опытной пробы.

Результат вычисления выражают в процентах относительно контроля.

При значении интенсивности вспышки (I_{max}) в пробе, содержащей плазму крови равном 43 % или более, и в пробе, содержащей перитонеальный диализат равном 36 % или более, констатируется минимальная вероятность развития перитонита. Такие пациенты подлежат динамическому наблюдению.

При значении I_{max} в пробе, содержащей плазму крови менее 43 %, и в пробе, содержащей перитонеальный диализат менее 36%, констатируется высокая вероятность развития диализного перитонита, что является показанием для начала терапии диализного перитонита.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Осложнения отсутствуют.

Ошибки (искаженные результаты исследования) могут быть связаны с нарушением технологии выполнения анализа.

Пути устранения ошибок, контроль качества метода, техника безопасности:

1. Соблюдение требований преаналитического этапа, последовательности операций и аккуратное выполнение анализа является обязательным.

2. Использование реагентов с истекшим сроком годности запрещено.

3. Образцы биологического материала для оценки ЛЗХЛ необходимо исследовать в течение не более 2 ч от момента взятия. При этом образцы плазмы крови должны быть без следов гемолиза.

4. Контроль качества проводимых лабораторных исследований осуществляется методом исследования параллельных проб, повторных проб согласно приказу Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 10.09.2009 № 873 «Об утверждении инструкций по контролю качества клинических лабораторных исследований». Коэффициент вариации результатов при повторных исследованиях хемилюминесцентного анализа не должен превышать 5–7 %. Если процент вариации превышает указанные значения, необходимо провести повторный ХЛ-анализ исследуемого биологического материала. Если при повторном анализе коэффициент вариации превышает 5–7 %, то результаты анализа выдавать нельзя.

5. При выполнении исследований необходимо соблюдать меры безопасности согласно действующим приказам Министерства здравоохранения Республики Беларусь, инструкциям по охране труда для КДЛ и инструкциям по эксплуатации медицинских измерительных приборов, разработанных и утвержденных в учреждениях здравоохранения. Соблюдать санитарно-противоэпидемический режим при работе с биологическим и химическим материалами.

Таблица 2. — Хронометраж хемилуминесцентного метода оценки про/антиоксидантного баланса в биологическом материале

Содержание работ	Время, мин	
	единично е	каждое последующее
Подготовка реактивов к проведению анализа	15	5
Внесение реактивов в кюветы спектрофотометра/флюориметра Cary Eclipse FL1002M003 (кроме перекиси водорода)	2,5	2,0
Внесение физиологического раствора / раствор для диализа (контрольная проба) и исследуемых образцов (опытная проба) в кюветы спектрофотометра/флюориметра Cary Eclipse FL1002M003	1	1
Добавление 3 %-го раствора перекиси водорода во все кюветы непосредственно перед регистрацией ЛЗХЛ	0,1	0,1
Перемешивание ручное	0,1	0,1
Регистрация ЛЗХЛ: а) плазма/перитонеальный диализат	5	5
	10	10
Автоматическое проведение расчетов по результатам исследования	3	3
Всего	26,7 (31,7)	16,7 (21,7)

Обоснование целесообразности практического использования метода оценки вероятности развития перитонита у пациентов с хронической болезнью почек, находящихся на перитонеальном диализе

За последние десятилетия во всем мире отмечается тенденция к росту числа пациентов, страдающих хронической болезнью почек. Данное заболевание сопровождается низким качеством жизни, высокой смертностью, а в терминальной стадии приводит к необходимости применения дорогостоящих методов заместительной почечной терапии — различных видов диализа и трансплантации почки. Ежегодный прирост числа таких пациентов в среднем составляет 10,5 %.

Диализный перитонит в первый год нахождения на перитонеальном диализе развивается у 60 % пациентов. После перенесенного перитонита у отдельных лиц наблюдается выраженная спаечная болезнь брюшной полости, которая препятствует дальнейшему проведению перитонеального диализа. Диализный перитонит нередко вызывает значительные трудности при дифференциальной диагностике с перитонитом от острой хирургической патологии, на что указывают мировые публикации. Несмотря на заметное снижение частоты диализного перитонита в настоящее время, для каждого отдельного пациента оно является серьезной проблемой. Смертность после первого эпизода перитонита составляет 5 % и является кофактором летальности еще у 16 % пациентов, находящихся на перитонеальном диализе. Профилактика и ранняя диагностика диализного перитонита позволит увеличить продолжительность ультрафильтрующих свойств брюшины.

Известно, что в развитии и прогрессировании воспалительных процессов любой этиологии важную роль играет избыточное образование окислительных компонентов (оксидантов) и недостаточность механизмов антиоксидантной защиты, в результате чего в организме развивается окислительный стресс. Среди оксидантов наиболее важная роль принадлежит активным формам кислорода, которые индуцируют свободнорадикальное окисление различных веществ, включая белки, липиды, углеводы, и запускают патогенетическую цепочку повреждения клеточных мембран различных тканей и органов. Предотвращение повреждений клеточных структур свободными радикалами осуществляется за счет системы антиоксидантной защиты (токоферол, ионол, супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, хелаторы металлов переменной валентности и др.). Как известно, антиоксидантной активностью обладает широкий класс химических соединений, поэтому определение отдельных антиоксидантов в биологическом материале дает лишь ограниченные представления о состоянии антиоксидантной защиты, так как не позволяет оценить реальный вклад каждого компонента и их комбинаций в процессы свободнорадикального окисления, наличие в исследуемом материале различных активаторов, ингибиторов и других факторов. Для интегральной характеристики состояния про-/антиоксидантной системы может использоваться оценка ее способности противостоять действию свободных радикалов. В качестве источника свободных радикалов используют различные модельные системы, генерирующие активные формы кислорода. Торможение свободнорадикального окисления в модельной системе после

добавления биологического материала оценивается хемилюминесценцией. Нами использована технология люминолзависимой хемилюминесценции, а именно один из подходов основанный на сравнении ее параметров радикалообразующей системы в отсутствие и присутствии биологического материала. Степень угнетения свечения в присутствии биологического материала зависит как от исходного уровня свободнорадикального окисления, так и от содержания и активности антиоксидантных компонентов. При этом показатель интенсивности вспышки хемилюминесценции (I_{max}) характеризует преимущественно активность антиоксидантов, и его значения широко варьируют при различных заболеваниях.

Поэтому показатель интенсивности вспышки хемилюминесценции (I_{max}) может потенциально служить индикатором наличия и тяжести различных патологических процессов. Ранняя диагностика диализного перитонита путем определения параметров люминолзависимой хемилюминесценции плазмы крови и перитонеального диализата позволит начать раннюю терапию этого осложнения, что тем самым уменьшит альтерацию брюшины, предотвратит адгезивные процессы в брюшной полости и позволит увеличить продолжительность ультрафильтрующих свойств брюшины.