

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Р.А. Часнойть
6 мая 2010 г.
Регистрационный № 133-1109

**МЕТОД ДИАГНОСТИКИ, ПРОФИЛАКТИКИ И ПРОГНОЗА
РЕСПИРАТОРНОГО ДИСТРЕСС-СИНДРОМА
У НЕДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Гродненский государственный
медицинский университет»

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доц. Н.С. Парамонова, канд. мед. наук, доц.
Н.И. Янковская, Л.Н. Гурина

Гродно 2010

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Средства измерений:

- аппаратура: спектрофотометр с длиной волны 347–410 нм, светофильтр — № 3, в таком случае инкубацию проводят в термостате при 37 °С;

- рН-метр;
- весы аналитические;
- дозатор с переменным объемом доз.

Вспомогательные устройства:

- аппарат для дистилляции воды;

- центрифуга лабораторная (ОПН-6, ОПН-8);

- баня водяная с контактным термометром с диапазоном измерения 0–100 °С;

- холодильник бытовой;

- термостат суховоздушный;

- лабораторная посуда (колбы, пробирки, микрокюветы, стеклянные палочки, воронки).

Реактивы:

- БАНЭ (нитрофениловый эфир N-бутилоксикарбонила-L-аргинина);
- Трипсин;
- СИТ (соевый ингибитор трипсина);
- Трис;
- CaCl₂ (хлорид кальция);
- Метанол;
- БАПНА (N-б-бензоил-D,L-аргинина паранитроанилид);
- Фиксаналы 0,1М HCl;
- NaCl;
- вода дистиллированная.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Диагностика, профилактика, прогноз респираторного дистресс-синдрома (РДС) у новорожденных на основании определения компонентов протеолитической системы в сыворотке крови.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Не выявлены.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПОСОБА

Контроль качества лабораторного исследования выполняется на всех этапах лабораторного анализа — от периода подготовки пациента до использования полученных результатов в клинике. Осуществляется ежедневно и включает в себя следующие этапы:

- а) преаналитический (подготовка пациента, взятие биологического

материала, его предварительная обработка, транспортировка и хранение);

б) аналитический (контроль процедуры дозирования, проведение реакции), расчет результатов;

в) постаналитический (доведение полученной информации до врача).

Оценка воспроизводимости и правильности полученных результатов лабораторных анализов осуществляется методами исследования параллельных проб, случайных проб, повторных проб, смешанных проб и специальных контрольных сывороток (Приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 154 от 24.06.97 «О дальнейшем совершенствовании системы контроля качества клинических лабораторных исследований»).

Контроль качества компьютерной базы данных осуществляется во время ее формирования на уровне ввода, просмотра и коррекции, контроля правильности математической и статической обработки.

Техника безопасности. Сотрудники лабораторий могут подвергаться заражению инфекционными заболеваниями, главным фактором распространения которых является инфицированный биологический материал. Поэтому безопасность лабораторных исследований должна быть основана на профилактике инфицирования медицинского персонала лабораторий и обследованных больных, что требует соблюдения санитарно-эпидемиологического режима. При организации противоэпидемических мероприятий в лабораториях необходимо руководствоваться правилами безопасной работы, которые регламентированы нормативными документами (Приказы Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 66 от 12.06.89, № 201 от 19.01.98, № 351 от 16.12.98, инструкция по охране труда для КДЛ, инструкции по эксплуатации медицинских измерительных приборов).

1. Приготовление реактивов

1) Na-фосфатный буфер:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ — 7,164 г/100 мл (1 реагент);

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ — 3,121 г/100 мл (2 реагент).

Каждый реагент растворяют в дистиллированной воде, доводя объем до 100 мл, фильтруют.

Берут 13,25 мл 1 реагента и смешивают с 36,75 мл 2 реагента, полученный раствор доводят до 400 мл дистиллированной водой (хранение при комнатной температуре в течение 14 дней).

2) 0,01 М раствора БАНЭ: 3,1 мг реактива БАНЭ растворить в 1,0 мл метанола (хранение при температуре 2–8 °С в течение 12 ч).

3) 0,2М ТРИС-НСІ буфер, рН 8,0 (хранение 2 недели при 4 °С);

4) 60 мг% раствор N-б-бензоил-D,L-аргинина паранитроанилида: 60 мг БАПНА растворяют в 60–70 мл дистиллированной воды при температуре 80–90 °С постоянно перемешивая (не доводя до кипения), после растворения охлаждают и доводят объем до 100 мл, хранение 1 мес. при 4 °С;

5) 50 мг% раствор ингибитора трипсина (ИТ) из бобов сои в 0,2 М ТРИС-НСІ буфере (готовится в день определения);

6) 4 мг% раствор трипсина в 0,001N HCl, хранение 1 неделя при температуре 4 °С;

7) 0,5 М раствор соляной кислоты;

8) 0,001 N раствор соляной кислоты;

9) 0,89% раствор хлорида натрия.

2. Подготовка сыворотки крови для исследования

Кровь в объеме 1–3 мл, забранную из материнского конца пуповины, после ее пересечения или из периферической вены ребенка, перед исследованием центрифугируют при 1500 об./мин в течение 10 мин при температуре 23 °С. Сыворотка крови может храниться в течение 1 сут при -4 °С. При -20 °С сыворотка крови стабильна в течение 3-х мес. При двукратном и более замораживании и размораживании показатели протеолиза в различных образцах очень варьируют, поэтому такое исследование недопустимо.

Для определения α_1 -антипротеиназного ингибитора (АПИ) сыворотку крови разводят раствором 0,89% NaCl в 30–60 раз для определения общей протеолитической активности (ОПА) сыворотка не разводится.

3. Ход определения активности ингибитора (АПИ) приведен в табл. 1, общей протеолитической активности (ОПА) — в табл. 2.

Таблица 1

Определение активности ингибитора в сыворотке крови
АПИ (при использовании микрокувет на 400 мкл)

Реактивы	АПИ		А макс.
	контроль	опыт	
сыворотка	40	40	
0,89% NaCl			40
0,2 М Трис-HCl	80	80	80
4 мг% трипсин		80	80
Перемешать, инкубировать 15 мин при комнатной температуре			
50 мг% ИТ			
60 мг% БАПНА	160	160	160
Перемешать, инкубировать 30 мин при 37 °С			
0,5 МНС1	40	40	40
60 мг% БАПНА	80		
Перемешать и измерять			

Определение общей протеолитической активности в сыворотке крови
(при использовании микрокувет на 300 мкл)

Реактивы	опыт
0,05М Na-фосфатного буфера (рН 6,5)	2,85 мл
Сыворотка крови	0,05 мл
0,01М раствора БАНЭ	0,1 мл
Перемешать, инкубировать 60 с при комнатной температуре	
Измерять в течение 120 с	

Измерение всех проб проводят при длине волны 347–410 нм против дистиллированной воды.

4. Расчет активности:

а) расчет активности АПИ проводят по следующей формуле и выражают в мг/мл:

$$\text{АПИ} = \frac{(E_{\text{макс}} - E^*) \times 2,29 \times K \times P}{C},$$

где $E_{\text{макс}}$ — оптическая плотность пробы, в которой отсутствует сыворотка;

E^* — разница оптической плотности опытной (содержащей сыворотку и трипсин) и контрольной (не содержащей трипсина — контроль на степень окраски сыворотки);

2,29 — соотношение молекулярной массы АПИ и трипсина, реагирующих 1:1 (55000:24000 = 2,29);

K — коэффициент пересчета количества трипсина в мг на единицу оптической плотности (рассчитывается по формуле: количество внесенного трипсина в пробу (в мг) / $E_{\text{макс}}$);

P — разведение сыворотки (раз);

C — объем разведенной сыворотки, взятой в исследование.

б) расчет ОПА проводят по следующей формуле и выражают в нмоль/мл/мин:

$$\text{ОПА} = \frac{\text{дельта } A \times 3,0 \text{ мл}}{5,5 \times 10^3 \times 0,05 \text{ мл}},$$

где дельта A — прирост p -нитрофенола за 2 мин;

К — коэффициент молярной экстинкции БАНЭ $5,5 \times 10^3$ Мх мг;

3,0 мл — объем кюветы;

0,05 мл — объем исследуемой жидкости.

А — активность эластазоподобных протеаз, выражается в нмоль/мл/мин.

Для простоты подсчета нмоль/мл/мин переводят в мЕ/мкл. Формула перевода нмоль/мл/мин в мЕ/мкл, $1 \text{ мЕ} = 1 \text{ мкмоль/мин}$.

$$\frac{\text{мкмоль}}{\text{мин/мл}} = \frac{\text{мЕ}}{\text{мкл}}$$

нмоль = 0,001 мкмоль;

$$\frac{\text{нмоль}}{\text{мин/мл}} = \frac{0,001 \text{ мЕ}}{\text{мл}} = \frac{\text{мЕ}}{\text{мкл}} = \frac{\text{мкмоль}}{\text{мин/мкл}} = \frac{1000 \text{ нмоль}}{\text{мин/мкл}} = \frac{\text{мЕ}}{\text{мкл}}$$

5. Примеры расчета:

а) расчет АПИ:

разведение сыворотки — 30 раз;

Еопыт. = 0,25;

Еконтр. = 0,040;

Тогда $E^* = 0,25 - 0,040 = 0,21$.

$$\text{АПИ} = \frac{(0,390 - 0,210) \times 2,29 \times 0,0082 \times 30}{0,04} = 2,54 \text{ г/л,}$$

б) расчет ОПА:

дельта А = $A_2 - A_1 = 0,076$

A_2 — показатель на 120 с = 0,090

A_1 — показатель в начале исследования = 0,014

ОПА = $0,076 \times 0,0109 = 0,00082 \times 1000 = 0,82 \text{ мЕ/мкл}$

Таблица 3

Основные диагностические показатели инфекционно-воспалительных реакций при РДС

Наименование показателя	Показатель	Специфичность, %	Чувствительность, %	Прогностическая ценность положительного результата, %	Прогностическая ценность отрицательного результата, %
ОПА мЕ/мкл	>0,88	90	85	85	45
АПИ г/л	<1,78	78	74	83	57

Основные диагностические показатели при РДС, требующие назначения профилактических курсов ингибиторов протеолиза (гордокса или овомина)

Таблица 4

Показатели ОПА, при которых показано назначение ингибиторов протеолиза

Наименование показателя	Показатель	Специфичность, %	Чувствительность, %	Прогностическая ценность положительного результата, %	Прогностическая ценность отрицательного результата, %
ОПА МЕ/мкл	>0,48	71	69	75	43

Основные диагностические показатели прогноза развития бронхолегочной дисплазии (БЛД) при сохраняющемся РДС (>28 дн.) у недоношенных новорожденных

Таблица 5

Лабораторные критерии высокого риска развития БЛД у новорожденных с РДС

Наименование показателя	Показатель	Специфичность, %	Чувствительность, %	Прогностическая ценность положительного результата, %	Прогностическая ценность отрицательного результата, %
ОПА МЕ/мкл	>0,68	87	85	75	48
АПИ г/л	<1,82	68	67	74	56

Экономический эффект. Рекомендуемый метод не требует дорогостоящих, дефицитных реактивов, используемый субстрат имеет высокую стабильность в растворе, расширяется возможный объем исследования биоматериала, методика исследования проста и доступна.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Результаты исследования могут искажаться после перорального приема или парентерального введения ферментных препаратов или ингибиторов

протеиназ, при выраженном кишечном дисбактериозе. Ошибочные результаты можно получить при неправильном заборе и хранении образцов сыворотки крови, неточном количестве взятого образца и пипетированных реагентов, использовании реактивов с истекшим сроком годности, использовании сыворотки крови, размороженной более одного раза.