

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

2020 г.



Регистрационный № 018-0320

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЕРОЯТНОСТИ РАЗВИТИЯ
ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА У ПАЦИЕНТОВ С ЦИРРОЗОМ
ПЕЧЕНИ И ОСТРОЙ КРОВОПОТЕРЕЙ ТЯЖЕЛОЙ СТЕПЕНИ
ТЯЖЕСТИ ПОСРЕДСТВОМ ОЦЕНКИ ИНДЕКСА БЛЕББИНГА
КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ ЛИМФОЦИТОВ
инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: учреждение образования
«Гомельский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ: д.м.н., профессор Дундаров З.А., к.м.н., доцент Надыров Э.А.,
Евсеенко Д.А.

Гомель, 2020

Настоящая инструкция по применению (далее – инструкция) может быть использована в комплексе медицинских услуг, направленных на определение вероятности развития окислительного стресса (далее – ОС) у пациентов с циррозом печени и острой кровопотерей тяжелой степени тяжести (МКБ10 – K74.6; I85.0) посредством оценки индекса блеббинга клеточной стенки лимфоцитов.

Метод предназначен для врачей-хирургов, врачей-анестезиологов-реаниматологов, врачей лабораторной диагностики, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с циррозом печени и острой кровопотерей тяжелой степени тяжести в амбулаторных и/или стационарных условиях, и/или в отделениях дневного пребывания учреждений здравоохранения Республики Беларусь.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, РЕАКТИВОВ И Т.Д.

1. Пробирки вакуумные с жидким напылением ЭДТА К3 объемом 5 мл.
2. Пробирки одноразовые пластиковые с крышкой объемом 10 мл, центрифужные градуированные.
3. Пипетки Пастера градуированные однократного применения из ПЭ, стерильные объемом 3 мл.
4. Штатив для пробирок объемом 10 мл, диаметр гнезда 18 мм.
5. Натрий-фосфатный буфер (PBS, pH 7,4).
6. Фиколл-верографин плотностью 1,075-1077 г/см³.
7. Высокоскоростная центрифуга (от 2000 до 8000 об./мин.) с ротором для пробирок типа одноразовых пластиковых с крышкой, центрифужных градуированных объемом 10 мл.

8. Дозатор одноканальный механический переменного объема.
9. Одноразовые наконечники для дозаторов (универсально подходящих ко всем дозаторам) объемом 5-200 мкл.
10. Микроцентрифуга-вортекс (от 1500 до 3000 об./мин.).
11. Чашки Петри пластиковые стерильные, диаметр 35 мм.
12. Микроскоп с насадкой для фазово-контрастной микроскопии.
13. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
14. Емкость с дезинфицирующим раствором.
15. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Цирроз печени, осложненный острой кровопотерей тяжелой степени тяжести.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Метод, изложенный в данной инструкции, реализуется поэтапно.

1. Фракционирование лимфоцитарной взвеси.

- 1.1 Получение биологического материала (венозной крови) осуществляют из локтевой вены в вакуумную пробирку с ЭДТА в объеме 5 мл. После взятия кровь перемешивают, плавно переворачивая пробирку вверх дном. Неохлажденные пробы необходимо использовать в течение часа для последующего фракционирования лимфоцитарной взвеси или не более суток при хранении от +4°C до +8°C. Цельная кровь не подлежит заморозке.

- 1.2 В центрифужную пробирку объемом 10 мл (№1) при помощи пипетки Пастера вносят 5 мл венозной периферической крови из вакуумной пробирки, содержащей жидкое напыление ЭДТА.
- 1.3 Далее в пробирку №1 при помощи пипетки Пастера аккуратно, по стенке пробирки, добавляют натрий-фосфатный буфер в соотношении 1:1.
- 1.4 В центрифужную пробирку объемом 10 мл (№2) при помощи пипетки Пастера вносят фиколл-верографин объёмом 2 мл и аккуратно, по стенке пробирки, при помощи пипетки Пастера добавляют содержимое пробирки №1 в соотношении 1:2.

2. Центрифугирование.

- 2.1. Пробирку №2 помещают в центрифугу и выставляют параметры: скорость вращения 3000 оборотов/минута, ускорение, равное 400 G, 25 минут.
- 2.2. После окончания центрифугирования надосадочное «облако» лимфоцитов из пробирки №2 при помощи дозатора вносят в пробирку №3 и аккуратно, по стенке пробирки, добавляют натрий-фосфатный буфер при помощи пипетки Пастера доводя до объёма 10 мл.
- 2.3. Пробирку №3 помещают в центрифугу и выставляют параметры: скорость вращения 3000 оборотов/минута, ускорение, равное 400 G, 25 минут.
- 2.4. После окончания центрифугирования удаляют супернатант при помощи пипетки Пастера.
- 2.5. Полученную лимфоцитарную взвесь в пробирке при помощи микроцентрифуги-вортекс перемешивают в течение минуты.
- 2.6. Лимфоциты наносят дозатором на чашку Петри в количестве 30-40 мкл.

2.7. Осуществляют фазово-контрастную микроскопию полученной лимфоцитарной взвеси при увеличении микроскопа 600×.

3. Подсчет индекса блеббинга лимфоцитов (ИБЛ).

3.1. Подсчет ИБЛ осуществляется по следующей формуле:

$$\text{ИБЛ} = \frac{\text{Терминальный блеббинг лимфоцитов} \times 100}{\sum \text{блеббинг лимфоцитов}} \\ \text{(начальный блеббинг} + \text{терминальный блеббинг)}$$

4. Интерпретация полученных результатов.

4.1. При пороговом значении индекса блеббинга лимфоцитов >15,8 у пациентов с циррозом печени и острой кровопотерей тяжелой степени тяжести можно определить вероятность развития ОС, который требует коррекции нарушений антиоксидантного статуса.

ВОЗМОЖНЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ И ОШИБКИ

Причиной ошибочных результатов при исследовании может быть нарушение правил взятия, хранения и транспортировки биологического материала, использование реактивов с истекшим сроком годности или неправильно хранившихся, загрязнение реагентов, погрешность пипетирования реагентов, неточно выставленные параметры центрифугирования.

Путь устранения – соблюдение правил организации и проведения исследования в клиничко-диагностической лаборатории.