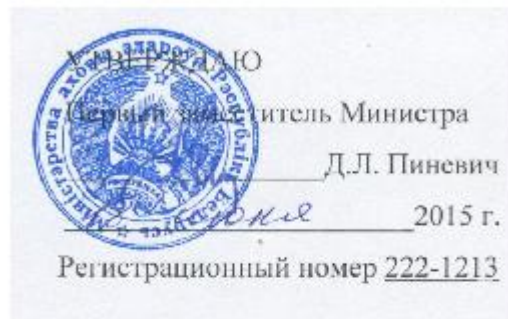


**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**



**МЕТОД ОЦЕНКИ СТЕПЕНИ АКТИВНОСТИ И ТЯЖЕСТИ  
ИНФЕКЦИОННО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

инструкция по применению

**УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:**

Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет»

**АВТОРЫ:**

Д.м.н., профессор, Новикова И.А., Петренко Т.С., Вершинина С.И.,  
Прокопович А.С.

Гомель, 2013

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д.Л. Пиневич  
18.06.2015

Регистрационный № 222-1213

**МЕТОД ОЦЕНКИ СТЕПЕНИ АКТИВНОСТИ И ТЯЖЕСТИ  
ИНФЕКЦИОННО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Гомельский государственный  
медицинский университет»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. И.А. Новикова, Т.С. Петренко, С.И. Вершинина,  
А.С. Прокопович

Гомель 2013

Метод, изложенный в настоящей инструкции по применению (далее — инструкция), позволяет оценить активность и тяжесть воспалительного процесса по состоянию про-/антиоксидантной активности биологических жидкостей с использованием технологии люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ). Может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику инфекционно-воспалительных заболеваний для объективизации и повышения точности диагностики в качестве дополнительного лабораторного критерия.

Метод, изложенный в настоящей инструкции, предназначен для врачей лабораторной диагностики, врачей-терапевтов, врачей-инфекционистов, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения различного профиля районного, областного и республиканского уровней.

### **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

1. Спектрофотометр/флюориметр.
2. Автоматические дозаторы (0,1–1 мл) с одноразовыми наконечниками.
3. Кварцевые кюветы к прибору (длина оптического пути 10 мм).
4. Пробирки для взятия материала.
5. Люминол (5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндион; 3-Аминофталгидрозид).
6. Трис-буфер (pH = 8,8).
7. Сернокислое железо ( $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ) (квалификация не менее ч.д.а.).
8. Физиологический раствор (0,9% раствор хлорида натрия, аптечный).
9. Перекись водорода (33% раствор).
10. Бидистиллированная вода.
11. ДМСО — диметилсульфоксид (димексид аптечный).

### **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Диагностика степени активности и тяжести инфекционно-воспалительных заболеваний различной локализации для выбора адекватной терапии, оценки ее эффективности и своевременной коррекции.

### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Противопоказания отсутствуют, так как метод выполняется *in vitro*.

### **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

Метод может быть выполнен с использованием в качестве биологического материала плазмы крови, эритроцитов или смешанной слюны (при соответствующей локализации патологического процесса).

Кровь получают путем венепункции с соблюдением стандартных правил преаналитического этапа, используя в качестве антикоагулянта гепарин (из расчета 15–20 ЕД гепарина на 1 мл крови).

Смешанную слюну собирают до чистки зубов, после полоскания полости рта кипяченой водой путем сплевывания в чистую сухую пробирку.

## 1. Подготовка исследуемого материала и расходных материалов

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

1.2. Эритроциты из осадка трижды отмывают физиологическим раствором, после чего готовят суспензию эритроцитов в физиологическом растворе, доводя количество эритроцитов до  $10^6$ /мл (контроль в камере Горяева).

1.3. Слюну перед анализом центрифугируют в течение 10 мин при 1500 об./мин (500 g), надосадочную жидкость собирают пипеткой, переносят в пластиковую пробирку и дополнительно центрифугируют при 8000 об./мин (2800 g) в течение 15 мин. Супернатант используют для анализа.

Для выполнения методики достаточно 0,1 мл исследуемого образца.

### Подготовка расходных материалов

1.4. 0,01% раствор люминола: 5 мг люминола растворяют в 5 мл димексида, перед проведением исследования смешивают 1 мл исходного раствора с 9 мл физиологического раствора. Исходный раствор можно хранить в темном месте при комнатной температуре (18–25°C) в течение 1 мес.

1.5. 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 1 М раствором соляной кислоты. Хранят при комнатной температуре (18–25°C).

1.6. 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.

1.7. 3% раствор перекиси водорода: в 1 мл 33% раствора перекиси водорода добавляют 9 мл бидистиллированной воды, готовят *ex tempore*, раствор хранению не подлежит.

## 2. Ход определения

2.1. Включают прибор за 15–20 мин до исследования.

2.2. Настраивают длину волны возбуждения — 400 нм, длину волны эмиссии — 450 нм.

2.3. Устанавливают ширину щели эмиссионного монохроматора 5 нм, эмиссионный фильтр в положение Open (открыт). Настраивают PMT Detector voltage (напряжение фотоэлектромножителя) на среднее (600 мВ).

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

**Контроль:** 1 мл трис-буфера (pH = 8,8), 0,1 мл сернокислого железа (25 ммоль/л), 0,1 мл 0,01% раствора люминола и 0,1 мл 0,9% раствора хлорида натрия, перемешивают.

**Опыт:** 1 мл трис-буфера (pH = 8,8), 0,1 мл сернокислого железа (25 ммоль/л), 0,1 мл 0,01% раствора люминола и 0,1 мл исследуемого образца, перемешивают.

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

2.5. Закрывают крышку прибора и производят автоматическую регистрацию ХЛ в течение 5 мин для плазмы крови и слюны, и в течение 10 мин для суспензии эритроцитов. Последнее обстоятельство обусловлено более медленным формированием вспышки индуцированной ХЛ в эритроцитах.

Основные этапы выполнения исследования представлены в таблице 1.

Таблица 1. — Основные этапы выполнения анализа

Ингредиенты	Опытная проба	Контрольная проба
Трис-буфер (рН = 8,8)	1 мл	1 мл
Раствор сернокислого железа (25 ммоль/л)	0,1 мл	0,1 мл
0,01% раствор люминола	0,1 мл	0,1 мл
Исследуемый материал (плазма, суспензия эритроцитов, слюна)	0,1 мл	—
0,9% раствор натрия хлорида	—	0,1 мл
3% раствор перекиси водорода	0,1 мл	0,1 мл
Регистрация результатов		

### 3. Идентификация результатов

3.1. Прибор автоматически регистрирует в опытной и контрольной пробах следующие параметры ЛЗХЛ:

3.1.1. Максимальная интенсивность свечения ( $I_{\max}$ ).

3.1.2. Площадь под кривой хемилюминесценции (светосумма,  $S$ ).

3.2. Результаты исследования представляются как степень подавления значений вышеуказанных показателей при добавлении биологического материала относительно положительного контроля и выражаются в процентах. Для расчета отклонений параметров исследуемой пробы от соответствующих значений положительного контроля используется формула:

$$[(ЛЗХЛ_{\text{к}} - ЛЗХЛ_{\text{о}}) / ЛЗХЛ_{\text{к}}] \times 100\%,$$

где  $ЛЗХЛ_{\text{к}}$  — показатель ХЛ (раздельно для  $I_{\max}$ ,  $S$ ) радикалообразующей смеси в присутствии физиологического раствора (контроль);

$ЛЗХЛ_{\text{о}}$  — показатель ХЛ (раздельно для  $I_{\max}$ ,  $S$ ) радикалообразующей смеси в присутствии исследуемого материала (опыт).

### 4. Интерпретация результатов

Референтный интервал и трактовка результатов в зависимости от использованного для исследования материала приведены в таблицах 2–4.

Таблица 2. — Результаты ЛЗХЛ при использовании плазмы крови

Параметры ЛЗХЛ, %	Состояние про-/антиоксидантной системы	Клиническая интерпретация
$I_{\max} \geq 72$ $S \geq 54$	Стабильное равновесие между про- и антиоксидантами	Норма
$58 \leq I_{\max} < 72$ $45 \leq S < 54$	Сдвиг в соотношении про- и антиоксидантов функционального характера	Воспалительный процесс неактивен
$I_{\max} < 58$ $S < 45$	Дисбаланс в системе про-/антиоксидантов с относительной недостаточностью антиоксидантного звена	Активный воспалительный процесс

Таблица 3. — Результаты ЛЗХЛ при использовании смешанной слюны

Параметры ЛЗХЛ, %	Состояние про-/антиоксидантной системы	Клиническая интерпретация
$I_{\max} \geq 75$ $S \geq 62$	Стабильное равновесие между про- и антиоксидантами	Норма
$61 \leq I_{\max} < 75$ $55 \leq S < 62$	Сдвиг в соотношении про- и антиоксидантов функционального характера	Воспалительный процесс неактивен
$47 \leq I_{\max} < 61$ $24 \leq S < 55$	Дисбаланс в системе про-/антиоксидантов с относительной недостаточностью антиоксидантного звена	Активный воспалительный процесс

Таблица 4. — Результаты ЛЗХЛ при использовании суспензии эритроцитов

Параметры ЛЗХЛ, %	Состояние про-/антиоксидантной системы	Клиническая интерпретация
$I_{\max} \geq 78$ $S \geq 58$	Стабильное равновесие между про- и антиоксидантами	Норма
$67 \leq I_{\max} < 78$ $52 \leq S < 58$	Сдвиг в соотношении про- и антиоксидантов функционального характера	Воспалительный процесс неактивен
$30 \leq I_{\max} < 67$ $32 \leq S < 52$	Дисбаланс в системе про-/антиоксидантов с относительной недостаточностью антиоксидантного звена	Активный воспалительный процесс

Усугубление сдвига про-/антиоксидантного равновесия на 50% и более от указанного в таблице нижнего предела свидетельствует о тяжелом течении инфекционно-воспалительного процесса, развитии осложнений и неблагоприятном исходе заболевания.

## **ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

Контроль качества метода. Техника безопасности

Ошибки могут быть связаны с нарушением технологии выполнения анализа.

При исследовании смешанной слюны могут быть получены ложнозаниженные результаты у курящих пациентов.

Пути устранения осложнений и ошибок:

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. Не использовать в качестве биологического материала смешанную слюну у курящих пациентов.

5. Контроль качества проводимых лабораторных исследований осуществляется методом изучения 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.

6. 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. Следует соблюдать санитарно-противоэпидемический режим при работе с биологическим материалом.

Таблица 5. — Хронометраж хемилюминесцентного метода оценки про-/антиоксидантной активности в биологическом материале

№ п/п	Содержание работ	Время, мин	
		единичное	каждое последующее
1	Подготовка реактивов к проведению анализа	15	5
2	Внесение реактивов в кюветы спектрофотометра/флуориметра (кроме перекиси водорода)	2,5	2,0
3	Внесение физиологического раствора (контрольная проба) и исследуемых образцов (опытная проба) в кюветы спектрофотометра/флуориметра	1	1
4	Добавление 3% раствора перекиси водорода во все кюветы непосредственно перед регистрацией ЛЗХЛ	0,1	0,1
5	Перемешивание ручное	0,1	0,1
6	Регистрация ЛЗХЛ: а) плазма/слюна б) суспензия эритроцитов	5	5
		10	10
7	Автоматическое проведение расчетов по результатам исследования	3	3
<b>Всего</b>		<b>26,7 (31,7)</b>	<b>16,7 (21,7)</b>