

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: учреждение образования
«Гомельский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ: д.м.н., профессор Новикова И.А., д.м.н., профессор Лызикив
А.Н., к.м.н., доцент Берещенко В.В., к.б.н., доцент Шевченко Н.И.

Гомель, 2021

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод оценки вероятности развития перитонита (К65) у пациентов с хронической болезнью почек (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 (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 (ЛЗХЛ) радикалообразующей смеси в присутствии перитонеального диализата и плазмы крови пациентов с последующим расчётом 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.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

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

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Противопоказаний нет.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ И ЛЕКАРАТВЕННЫХ СРЕДСТВ

1. Спектрофотометр/флюориметр 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 (рН=8,8);
9. Сернокислое железо ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (квалификация не менее ч.д.а.);
10. 0,9% раствор хлорида натрия;
11. Перекись водорода (3% раствор);
12. Диализирующий раствор (рН=5,5-7,0).

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА С УКАЗАНИЕМ ЭТАПОВ

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 1мл крови), и перитонеальный диализат, который собирают после перитонеального диализа в пробирку с гепарином (из расчета 15–20 ЕД гепарина на 1 мл исследуемого материала).

1. Подготовка исследуемого материала и расходных материалов

1.1 Полученную кровь центрифугируют в течение 10 минут 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

1.3 0,01% 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 месяца.

1.4 Трис-буфер (рН=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 рН 1М раствором соляной кислоты. Хранят при комнатной температуре (18-25°С).

1.5 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.

1.6 3% раствор перекиси водорода.

2. Ход определения

2.1 Включают прибор (Спектрофотометр/флюориметр Cary Eclipse FL 1002M003 (Variant, USA) за 15-20 минут 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% раствора люминола и 0,1 мл 0,9% 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% 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% раствора перекиси водорода.

2.4 Закрывают крышку прибора и производят автоматическую регистрацию хемиллюминесценции (ХЛ) в течение 5 минут.

Основные этапы выполнения исследования представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Основные этапы выполнения анализа

Ингредиенты	Опытная	Контрольная
Трис-буфер (pH=8.8)	1 мл	1 мл
25 ммоль/л раствор сернокислого железа	0,1 мл	0,1 мл
0,01% раствор люминола	0,1 мл	0,1 мл
Исследуемый материал (плазма/перитонеальный диализат)	0,1 мл	–
0,9% раствор натрия хлорида/ раствор для диализа	–	0,1 мл
3% раствор перекиси водорода	0,1 мл	0,1 мл
Регистрация результатов		

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 И ОШИБОК ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МЕТОДА

Осложнений нет.

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 часов 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 № 873 от 10.09.2009 г. «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 хемилюминесцентного метода оценки про/антиоксидантного баланса в биологическом материале

№ п/п	Содержание работ	Время, мин	
		единичное	каждое последу ющее
1	Подготовка реактивов к проведению анализа	15	5
2	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	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/перитонеальный диализат	5	5
		10	10
7	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 десятилетие во всём мире отмечается тенденция к росту числа пациентов, страдающих хронической болезнью почек (ХБП) [1, 2, 3]. ХБП 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 [4, 5, 6]. Ежегодный прирост числа таких пациентов в среднем составляет 10,5% [7].

Диализный перитонит в первый год нахождения на ПД развивается у 60% пациентов [8]. После перенесенного перитонита у отдельных пациентов наблюдается выраженная спаечная болезнь брюшной полости, которая препятствует дальнейшему проведению ПД. Диализный перитонит нередко вызывает значительные трудности при дифференциальной диагностике с перитонитом от острой хирургической патологии, на что указывают мировые публикации [9]. 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 ПД [10, 11]. 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 (АОЗ), в результате чего в организме развивается окислительный стресс. Среди оксидантов наиболее важная роль принадлежит активным формам кислорода (АФК), которые индуцируют свободнорадикальное окисление (СРО) 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, инол, супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, хелаторы металлов переменной валентности и др.) [12, 13]. 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 СРО, 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 СРО в модельной системе после добавления биологического материала оценивается хемилюминесценцией [14]. Нами использована технология люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ), а именно один из подходов основанный на сравнении параметров ЛЗХЛ радикалообразующей системы в отсутствие и присутствии биологического материала. Степень угнетения свечения в присутствии биологического материала зависит как от исходного уровня СРО, 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 [15, 16].

Поэтому показатель интенсивности вспышки хемилюминесценции (I_{max}) может потенциально служить индикатором наличия и тяжести различных патологических процессов. Ранняя диагностика диализного перитонита путем определения параметров ЛЗХЛ 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.

Литература:

1. Бикбов Б.Т. Заместительная терапия терминальной хронической почечной недостаточности в Российской Федерации в 1998-2013 гг. Отчет по данным Российского регистра заместительной почечной терапии. Часть первая / Б.Т. Бикбов, Н.А. Томилина // Нефрология и диализ. – 2015. – №3. – С. 5-111.
2. Тонелли, М. Хроническая болезнь почек и старение популяции / М. Тонелли, М. Риелла // Клиническая нефрология. – 2014. – №1. – С. 4-7.
3. Шутов, А.М. Хроническая болезнь почек – глобальная проблема XXI века / А.М. Шутов // Клиническая медицина. –2014.– №5. – С. 5-10.
4. Земченков, А.Ю. Темпы прогрессирования хронической болезни почек по данным Санкт-Петербургского городского регистра ХБП / А.Ю. Земченков, И.Н. Конакова // Нефрология и диализ. – 2015. –№ 1 (Т. 17). – С. 34-51.
5. Национальные рекомендации. Хроническая болезнь почек: основные принципы скрининга, диагностики, профилактики и подходы к лечению / А. В. Смирнов, Е. М. Шилов, В. А. Добронравов, И. Г. Каюков, И. Н. Бобкова, М. Ю.

Швецов, А. Н. Цыгин, А. М. Шутов // Клиническая нефрология. – 2012. – №4. – С. 4-26.

6. Garcia-Garcia, G. Chronic kidney disease in disadvantaged populations / G. Garcia-Garcia, V. Jha // Indian J. Nephrol. – 2015. – Vol. 25. – P. 65-69.

7. Хроническая болезнь почек и нефропротективная терапия. Часть 2. Распространенность, нозологический состав, факторы риска и диагностика ХБП / М. Ю. Швецов, И. Н. Бобкова, И. Б. Колина и др. // Вопросы врачебной практики. – 2012. – № 21. – С. 60-65.

8. ISPD catheter-related infection recommendations: 2017 update / C. C. Szeto [et all.] // Peritoneal Dialysis International. – 2017. – Vol. 37 (2). – P. 141-154.

9. Perforative Peritonitis caused by Appendicitis in a Patient on Peritoneal Dialysis / Masashi Mizuno, Yasuhiro Suzuki, Keisuke Nonaka [et all.] // The Japanese Society of Internal Medicine. – 2013. – V. 52. – P. 1177-1181.

10. Microbiology and outcomes of peritonitis in Australian peritoneal dialysis patients / J. R. Ghali [et al.] // Peritoneal Dialysis International. – 2011. – Vol. 31 (6). – P. 651-662.

11. Risk factors for abdominal wall complications in peritoneal dialysis patients / G. Del Peso, M. A. Bajo, O. Costero [et all.] // Peritoneal Dialysis International. – 2014. – Vol. 23. – P. 249-254.

12. Оксидативный стресс и хроническая болезнь почек / Ф.А. Тугушева [и др.] // Нефрология. – 2007. – Т. 11. – № 3. – С. 29-47.

13. Иммунологические нарушения у пациентов с хронической болезнью почек. Перспективы иммунозаместительной терапии / А.М. Андрусёв [и др.] // Клиническая практика. – 2014. – № 3 (10). – С. 83-88.

14. Антиоксидантная активность биологических жидкостей человека: методология и клиническое значение / Н.А. Беляков, С.Г. Смесько // Эфферентная терапия. – 2005. – Т.11. – №1. – С.5-21.

15. Хемилюминесцентные методы в биохимических исследованиях / Н.А. Дружина, А.Ю. Моисеев // Украинский биохимический журнал. – 2005. – Т.77. – № 2. – С.58-65.

16. Состояние про/антиоксидантной системы крови у реципиентов почечного аллотрансплантата / Т.С. Петренко [и др.] // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. – 2017. – Т.6. – №2. – С.224-231.