

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Е.Л. Богдан

« 22 » 07 2021 г.

Регистрационный № 073-0621

**МЕТОД ПРОГНОЗИРОВАНИЯ НЕБЛАГОПРИЯТНОГО ИСХОДА
БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ У ПАЦИЕНТОВ С ТЯЖЕЛЫМ
ТЕЧЕНИЕМ ЗАБОЛЕВАНИЯ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ: д-р. мед. наук, проф. Доценко Э.А., Захарова А.Г., канд. биол. наук Фомина Е.Г, Кабанова Ю.А.

Минск, 2021

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод прогнозирования неблагоприятного исхода бактериальных инфекций тяжелого течения, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение тяжелых бактериальных инфекций (пневмония, инфекционный эндокардита, сепсис).

Инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-инфекционистов, иных врачей-специалистов, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающим тяжелыми бактериальными инфекциями в условиях отделений дневного пребывания и (или) стационарных условиях (пневмония, сепсис и т. д.).

1 Перечень необходимых медицинских изделий, медицинской техники, реагентов и др.

1. Медицинские изделия и медицинская техника в соответствии с утвержденными ТНПА на базе организаций здравоохранения или медицинских научных организаций:

- проточный цитометр BD FACSCalibur (BD, США или аналогичный) с программой BD CellQuest;
- флюоресцентный микроскоп Nikon Eclipse TE2000-E с цифровой камерой;
- программное обеспечение для получения изображений «NIS-Elements BR»;
- программа анализа изображений «Bioscan-NT».
- холодильник бытовой с морозильной и холодильной камерами (+2–8 °С; –20 °С);
- вортекс лабораторный;
- центрифуга Avanti J-301;

- автоматические дозаторы переменного объёма 1-10 мкл; 20-200, 100-1000 мкл, 1-5 мл;
- наконечники сериальные однократного применения 1–20 мкл, 20–200 мкл, 100–1000 мкл, 1–5 мл;
- пробирки центрифужные объём 15 мл с крышкой;
- пробирки полистироловые объемом 5,0 мл для проточного цитометр;
- цилиндр мерный объемом 100 мл;
- световой микроскоп;
- камера Горяева;
- предметные и покровные стекла;
- монтирующая жидкость.

2. Медицинские изделия, реагенты и расходные материалы, необходимые в соответствии с утвержденными ТНПА на базе организаций здравоохранения или медицинских научных организаций:

- Лизирующий раствор:
10× раствор, 100 мл: 8,99 г хлорида аммония, 1,0 г гидрокарбоната калия, 37,0 мг натриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты, mQ-воды до 100 мл.
- градиент плотности фиколл-пак 1076 г/л для разделения клеток крови;
- буферный раствор DPBS;
- аннексин V;
- параформальдегид 4%;
- емкость с дезинфицирующим средством;
- средства индивидуальной защиты;
- моноклональные антитела и зонды (таблица 1).

Таблица 1 – Панели антител для определения показателей клеточного иммунитета

| Панель антител | Канал флуоресценции | | | |
|--|-----------------------|-------------|-------------|--------------|
| | F | FL2 (PE) | P | FL4 (APC) |
| Г-МЛСК | Lin-маркеры HLA-DR | CD15 | CD33 | CD11b |
| Субпопуляции Т-клеток: клетки памяти, диф-ые и истощенные | C D | C D L | C D P | C D RA |
| Основные и дополнительные субпопуляции моноклеарных клеток крови | CD3 | CD16+CD56 | CD45 | CD19 |
| | CD4 | CD8 | CD3 | HLA-DR |
| | | CD28 | CD4 | CD25 |
| | CD19 | CD5 | | CD27 |

3. Диагностические тест-системы для определения в сыворотке крови общего холестерина (ОХ), холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС-ЛПНП), холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС-ЛПВП), триглицеридов.

4. Средства индивидуальной защиты и дезинфектанты:

- лабораторный халат;
- латексные или нитриловые перчатки;
- дезинфицирующий раствор для инаktivации биологического материала.

2 Показания к применению

Пневмония (код по МКБ-10 – J18.0) тяжелого течения;
сепсис (код по МКБ-10 – A40.0-A41.0) с различной локализацией первичного очага;

другие бактериальные инфекции, не классифицируемые в других рубриках (A48.0);

бактериальная инфекция неуточненной локализации (A49.0).

3 Противопоказания к применению

Абсолютные противопоказания: беременность во все сроки, , период грудного вскармливания, иные противопоказания, соответствующие таковым для применения изделий медицинского назначения и лекарственных средств, необходимых для реализации метода, изложенного в инструкции.

Относительные противопоказания: повышенная индивидуальная чувствительность; острая почечная недостаточность.

4. Технология использования метода

4.1. Исследование показателей иммунного статуса

4.1.1 Получение биологического материала

В качестве биологического материала используют кровь, полученную из периферической вены общепринятыми методами, помещённую в стерильную пробирку или вакутайнер, содержащий натриевую соль гепарина в качестве антикоагулянта. Биологический материал может транспортироваться и храниться при температуре от +2 до +25 °С.

4.1.2. Иммунофенотипирование клеток крови (Табл.1)

Для каждой пробы отбирают и маркируют необходимое количество пробирок для цитофлуориметра. Подписывают каждую пробирку, указывая вначале идентификационный номер образца крови, а после точки – номер пробирки в панели антител: 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5. Добавляют антитела в соответствующую пробирку в количестве, рекомендуемом производителем (согласно инструкции по применению антител) (таблица

1). К моноклональным антителам добавляют 100 мкл крови, убедившись в соответствии пробы и номера пробирки, тщательно перемешивают содержимое пробирок и инкубируют в течение 15 мин при комнатной температуре в темном месте. Далее эритроциты лизируют в 2 мл 1 х лизирующего раствора в течение 15 мин при комнатной температуре в темном месте. Затем клетки центрифугируют 5 мин 250g, супернатант удаляют в емкость с дезраствором. Ресуспендируют клетки в 100-200 мкл буферного раствора. Исследование проводят на проточном цитометре.

4.1.3 Исследование показателей липидтранспортной системы

Использую стандартные диагностические тест-системы для определения в сыворотке крови общего холестерина (ОХ), холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС-ЛПНП), холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС-ЛПВП), триглицеридов

4.1.4. Показатели, определяющие неблагоприятный исход бактериальных инфекций тяжелого течения.

- снижение уровня ОХ менее 2,0 ммоль/л, в сочетании: уровень ХС-ЛПВП менее 0,5 ммоль/л и/или уровень ХС-ЛПНП менее 1,0 ммоль/л
- снижение содержания Т-лимфоцитов (CD3+) $\leq 56\%$ (норма 64,9 – 83,5%);
- значительное снижение Т-регуляторных клеток (CD4+CD25hi CD127-) $\leq 0,6\%$ (норма 1,7 – 6,0%);
- повышение процентного содержания субпопуляций В-лимфоцитов (CD19+) более чем в 1,5 раза от нормы верхней границы нормы (норма 6,8 – 15,9%) при снижении В1-клеток (CD19+ CD5+) $\leq 0,57\%$ (норма 1,1 – 3,9%);

- увеличение доли истощенных Т-лимфоцитов более 8,0% (норма 0,7 – 3,9%).

При наличии 2-х критериев, а именно: дисметаболического (нарушение обмена холестерина) и любого иммунологического делается вывод о неблагоприятном исходе бактериальной инфекции тяжелого течения.

5. Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении и пути их устранения

В таблице представлены проблемы и методические ошибки, которые могут возникнуть при выполнении метода с описанием причин возникновения и путей их устранения (таблица).

Таблица — Возможные ошибки или осложнения при выполнении метода и пути их устранения

| Проблема | Возможная причина | Пути устранения |
|---|---|--|
| Анализ иммунофенотипа: слабая интенсивность свечения, плохое разделение популяций | Недостаточное количество антител | Добавлять достаточное количество антител |
| | «Выгорание» флуорохромов | Инкубация клеток в темноте, сведение времени манипуляций с клетками к минимуму |
| | «Тусклые» флуорохромы | Использовать наиболее яркие флуорохромы (BV421, PE, APC, PE-Cy7) |
| | Недостаточное смешивание антител с пробой | Тщательно смешивать антитела с клетками |
| | Некорректно выполненная настройка цитометра | Настраивать цитофлуориметр согласно инструкции по эксплуатации |
| Высокая фоновая флуоресценция | Клетки не отмыты от антител | Тщательно отмывать клетки в буфере для окрашивания |

| | | |
|---------------------------------|--|--|
| | Некачественные антитела | Использовать другие антитела |
| | Некорректно выполненная настройка цитометра | Настраивать цитофлуориметр согласно инструкции по эксплуатации |
| Чрезмерные потери клеток | Недостаточное время центрифугирования | Соблюдать время центрифугирования |
| | Некорректное удаление супернатанта | Правильно удалять супернатант |
| | Непригодные растворы, длительное время инкубации | Следовать пунктам инструкции |
| Недостаточный лизис эритроцитов | Неправильно приготовленный раствор | Правильно готовить и хранить раствор |
| | Некорректный температурный режим | Лизис при комнатной температуре |
| | Недостаточное перемешивание | Двукратное перемешивание на шейкере |