

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Е.Л.Богдан

«17» августа 2021 г.

Регистрационный № 196-1220

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЕРОЯТНОСТИ РАЗВИТИЯ СЕПТИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ

(инструкция по применению)

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

АВТОРЫ: Трусевич М.О., д-р мед. наук, профессор, член-корр. НАН
Беларуси Титов Л.П., канд. мед. наук, доцент Горбич Ю.Л.

Минск, 2020

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Е.Л.Богдан

28.01.2021

Регистрационный № 196-1220

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЕРОЯТНОСТИ РАЗВИТИЯ СЕПТИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ

(инструкция по применению)

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

АВТОРЫ: Трусевич М.О., д-р мед. наук, профессор, член-корр. НАН
Беларуси Титов Л.П., канд. мед. наук, доцент Горбич Ю.Л.

Минск, 2020

В настоящей инструкции по применению (далее - инструкция) изложен метод определения вероятности развития септических состояний, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на медицинскую профилактику сепсиса и септического шока.

Метод, изложенный в данной инструкции, предназначен для врачей-инфекционистов, врачей-лаборантов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с бактериемией в амбулаторных и (или) стационарных условиях, и (или) в условиях отделения дневного пребывания.

1. Показания к применению

Стрептококковый сепсис (A40), другой сепсис (A41), септический шок (R57.2).

2. Противопоказания к применению: отсутствуют.

3. Перечень необходимых изделий медицинской техники и изделий медицинского назначения

Таблица 1 - Изделия медицинской техники для проведения исследования

<i>Проточная цитометрия</i>
Цитофлюориметр проточный
Центрифуга лабораторная, обеспечивающая скорость вращения ротора до 3000 об/мин
Вортекс
Дозаторы автоматические переменного объема
Холодильник (от +2 до +8°C)
УФ-лампа бактерицидная
<i>Иммуноферментный анализ</i>
Анализатор иммуноферментный автоматический
Дозаторы автоматические переменного объема
УФ-лампа бактерицидная

Таблица 2 - Реактивы для проведения исследования

<i>Проточная цитометрия</i>
Моноклональные антитела к антигенам человека: lin (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 и CD56), HLA-DR, CD11c, CD123, CD64, CD163

Фосфатно-солевой буферный раствор pH 7,2-7,4
Раствор для лизиса эритроцитов
<i>Иммуноферментный анализ</i>
Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации прокальцитонина
Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации интерлейкина-6
Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации пресепсина (sCD14)

Необходимы следующие изделия медицинского назначения: пробирки для цитофлюориметра; одноразовые наконечники для автоматических дозаторов от 200 до 5000 мкл; вакутайнеры с ЭДТА; вакутайнеры без антикоагулянта; штативы для пробирок; халаты, резиновые перчатки.

Качество используемых реактивов должно соответствовать техническим требованиям, предъявляемым к реагентам для проведения иммунологических и серологических исследований.

4. Технология осуществления метода

Материалом для исследования является цельная периферическая кровь. Метод определения вероятности развития септических состояний пациентов основан на определении сывороточных уровней прокальцитонина, интерлейкина-6 и пресепсина, а также на иммунофенотипическом определении субпопуляций дендритных клеток и CD64 на нейтрофилах.

1) Получение и транспортировка биологического материала.

Получение биологического материала (кровь) производится общепринятыми методами из локтевой вены в объеме 5 мл в вакутайнеры с ЭДТА и в объеме 5 мл в вакутайнеры без антикоагулянта.

Вакутайнеры с кровью доставляются в лабораторию в день получения материала. Кровь хранится до использования не более 8 часов при комнатной температуре.

2) Определение сывороточных маркеров воспаления методом иммуноферментного анализа.

Количественное определения содержания прокальцитонина, интерлейкина-6 и пресепсина в сыворотке крови осуществляются иммуноферментным методом с использованием коммерческих тест-систем и (или) наборов реагентов.

По результатам измерения вычисляется среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с анализируемыми образцами. Строится калибровочный график зависимости оптической плотности от концентрации сывороточного антигена в калибровочных образцах. На основании калибровочного графика определяются концентрации анализируемых образцов.

3) Определение плазмоцитоидных и миелоидных дендритных клеток и CD64 на нейтрофилах методом проточной цитометрии.

Используются следующие панели антител:

Пробирка №1: Смесь моноклональных антител (lin-FITC, HLA-DR-PE-Cy7, CD11c-APC, CD123-PE).

Пробирка №2: Смесь моноклональных антител (CD64-FITC, CD163-PE).

В пробирки добавляются антитела в необходимом количестве (согласно инструкции к моноклональным антителам). Затем в каждую пробирку вносится по 100 мкл крови, перемешивается на вортексе и инкубируется 15 мин. при +4°C в темноте. После этого проводится лизис эритроцитов путем добавления 3 мл лизирующего раствора. Пробирки с лизированными эритроцитами перемешиваются на вортексе и инкубируются 15 мин. при комнатной температуре в темноте. Центрифугированием осаждаются клетки в течение 5 мин. при 1500 об./мин. Удаляется супернатант и клетки суспендируются в 300 мкл

фосфатно-солевого буферного раствора. Учет проводится на проточном цитофлюориметре.

Проточный цитофлюориметр должен быть настроен согласно инструкции по эксплуатации прибора. Анализ исследуемых образцов проводится с подсчетом клеток не менее 100000. Для определения дендритных клеток используется следующая стратегия гейтирования: вначале на цитограмме FSC-H/SSC-H выделяется регион мононуклеарных клеток. На цитограмме HLA-DR/lin (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 и CD56) гейтируется регион lin-HLA-DR+. Далее на цитограмме CD11c/CD123 проводится учет миелоидных дендритных клеток с фенотипом lin-HLA-DR+CD11c+CD123- и плазмоцитоидных дендритных клеток с фенотипом lin-HLA-DR+CD11c-CD123+.

Для определения CD64 на нейтрофилах используется следующая схема гейтирования: вначале выделяется регион гранулоцитов на цитограмме светорассеяния. Затем выделяется регион CD64+ клеток и CD64+CD163- на соответствующих гистограммах.

4) Интерпретация результатов

Маркерами септического состояния пациента являются:

процентное содержание в крови миелоидных дендритных клеток ниже 0,045%;

процентное содержание в крови плазмоцитоидных дендритных клеток ниже 0,058%;

доля нейтрофилов, несущих маркер CD64, выше 20%;

содержание прокальцитонина в сыворотке крови выше 1,5 нг/мл;

содержание интерлейкина-6 в сыворотке крови выше 100 пг/мл;

содержание пресепсина (sCD14) в сыворотке крови выше 1 нг/мл.

Наличие любых четырех из шести вышеперечисленных показателей свидетельствует о высокой вероятности развития септического состояния пациента.

Наличие всех шести показателей свидетельствует о септическом состоянии пациента.

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

Ошибки могут быть связаны с нарушением технологии выполнения исследования.

Пути устранения ошибок:

1. Соблюдение последовательности операций при выполнении исследований, соблюдение объемов реактивов.
2. Точное соблюдение условий хранения материалов и реактивов, необходимых для выполнения исследований.
3. Точное следование инструкций по эксплуатации приборов.
4. При выполнении исследований необходимо соблюдать меры безопасности согласно действующим ТНПА.