

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра

Е.Л.Богдан

2020 г.



Регистрационный № 073-0720

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЕРОЯТНОСТИ РАЗВИТИЯ ХРОНИЧЕСКИХ ДИФFUЗНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПЕЧЕНИ, ОСНОВАННЫЙ НА ОПРЕДЕЛЕНИИ ГИАЛУРОНИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ СЫВОРОТКИ КРОВИ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

АВТОРЫ: д.м.н., профессор Юпатов Г.И., д.м.н., профессор Генералов И.И., к.м.н., доцент Окулич В.К., Прищепенко В.А.

Витебск, 2020

В настоящей инструкции (далее – инструкция) изложен метод определения вероятности развития хронических диффузных заболеваний печени (далее – ХДЗП), основанный на определении гиалуронидазной активности сыворотки крови, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику и медицинскую профилактику хронического гепатита (K70.1, K71.3-K71.6, K73), фиброза и цирроза печени (K70.3, K71.6, K74).

Инструкция предназначена для врачей-гастроэнтерологов, врачей-терапевтов, врачей лабораторной диагностики и иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с заболеваниями печени в стационарных и (или) амбулаторных условиях, и (или) в условиях отделения дневного пребывания.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

- одноразовые системы взятия крови (типа шприц-пробирка, обеспечивающая как поршневой способ забора крови, так и вакуумный и вакуумные системы, обеспечивающие сбор крови вакуумным методом; при их отсутствии - стерильные одноразовые шприцы: 10 мл, 20 мл);
 - вата медицинская;
 - стерильные пробирки объемом 15 мл с крышками;
 - весы лабораторные по ГОСТ 19491–74;
 - разновесы по ГОСТ 7328–65;
 - колбы с градуированной горловиной по ГОСТ 12738–77;
 - термостат электрический суховоздушный с автоматическим терморегулятором и ценой деления 0,1°C;
 - холодильная камера с температурой (+)4°C, морозильная камера с температурой (-)20°C;
 - центрифуга лабораторная клиническая;
 - спектрофотометр многоканальный с возможностью измерения при длине волны 405 нм;
 - автоматические регулируемые пипетки со стерильными наконечниками вместимостью 100-1000 мкл, 20-200 мкл;
 - рН-метр;
 - пробирки стеклянные по ГОСТ 10515–75;
 - пробирки пластиковые типа «Эппендорф» по 1,5 мл;
 - вода дистиллированная по ГОСТ 7609 – 72;
 - полистироловый планшет для ИФА;
 - гиалуроновая кислота;
 - 1 н раствор уксусной кислоты;
 - 1 н раствор натрия гидроксида;

- 0,9% раствор натрия хлорида;
- 1 н раствор соляной и серной кислоты;
- 0,75% раствор риванола.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Заболевания и патологические состояния, сопровождающиеся жалобами, которые могут соответствовать хроническому диффузному заболеванию печени (K70.1, K70.3, K71.3-K71.6, K73, K74).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Противопоказания, соответствующие таковым для венепункции.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

1. Получение биологического материала.

В качестве биологического материала используют сыворотку крови. Для получения сыворотки крови в стерильные маркированные пробирки с крышками (оранжевого цвета) собирают периферическую венозную кровь пациента натошак в условиях процедурного кабинета или лаборатории. Кровь в закрытых пробирках выдерживают при комнатной температуре от 30 до 60 минут до образования сгустка. Кровь центрифугируют в течение 10 минут с угловой скоростью вращения ротора 10000 оборотов в минуту при комнатной температуре. С помощью автоматической пипетки со стерильными наконечниками, не касаясь слоя форменных элементов, переносят надосадочную жидкость (сыворотку крови) в маркированные пробирки типа «Эппендорф». Для целей, связанных с методом, изложенным в настоящей инструкции, используют сыворотку крови сразу после получения или замораживают и хранят при температуре не выше (-)20°C не более 1 месяца.

2. Приготовление 0,004 М ацетатного буферного раствора, рН 3,8.

Для приготовления буферного раствора готовят 100 мл исходного 0,1 М ацетатного буфера (рН 3,8). Для этого к 84,3 мл 1 н раствора уксусной кислоты добавляют 10 мл 1 н гидроксида натрия. Контролируют рН буфера, при необходимости раствор доводят до нужной рН. Далее из исходного буферного раствора готовят рабочий 0,004 М ацетатный буфер, путем добавления 0,9% раствора NaCl.

3. Приготовление субстрата гиалуроновой кислоты

Для постановки реакции гиалуроновую кислоту (ГК) получают по методам, предложенным РНИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи из пупочных канатиков человека. Пупочные канатики разрезают, отмывают от крови

дистиллированной водой, извлекают сосуды. Препарат трехкратно отмывают дистиллированной водой. Далее препарат измельчается до кашицеобразного состояния. Материал заливается дистиллированной водой в объемном соотношении 1:1. Материал помещается в холодильник при (+)4 °С на 24 ч. Далее препарат нагревается до кипения и фильтруется через ватный фильтр. Полученный препарат центрифугируется при 6000 об/мин в течение 15 мин. Надосадочная жидкость собирается во флаконы и замораживается. Дальнейшее осветление и очистка раствора проводится последовательным трехкратным размораживанием, центрифугированием при 6000 об/мин в течение 15 мин, сбором надосадочной жидкости и заморозкой.

После очистки препарата проводится его стандартизация по оптической плотности риванолового сгустка. В центрифужной пробирке к 0,2 мл препарата гиалуроновой кислоты добавляется 0,1 мл 0,9% раствора хлорида натрия, тщательно встряхивается, затем вносится 0,1 мл рабочего 0,004 М ацетатного буфера, рН 3,8, содержащего 0,9% раствор хлорида натрия, и также тщательно встряхивается. К полученной смеси добавляется 0,02 мл 0,75% раствора риванола и встряхивается до получения сгустка. Проводится отмывание пробы 5–8 мл дистиллированной воды, сгусток осаждается в течение 2–3 мин при комнатной температуре. Далее сгусток центрифугируется при 1000 об/мин в течение 1 мин, надосады сливаются.

Для измерения оптической плотности пробы сгусток экстрагируется в 0,5 мл смеси равных объемов 1 н HCl и концентрированной серной кислоты. Далее смесь нагревается до (+)100 °С в течение 2–3 мин.

Для измерения оптической плотности 0,2 мл пробы вносится в полистироловый планшет для ИФА. Измерение проводится спектрофотометрически при длине волны 405 нм.

Для определения гиалуронидазной активности сыворотки крови используется препарат ГК с оптической плотностью сгустка 0,85–1,05. При более высокой оптической плотности препарат разводится дистиллированной водой и повторяется процедура стандартизации.

4. Постановка реакции для определения гиалуронидазной активности сыворотки крови

Для постановки реакции в центрифужных пробирках в дублях готовится 0,1 мл последовательного разведения сывороток крови от 1:1000 до 1:32000. К каждому разведению сывороток последовательно добавляется 0,1 мл 0,004 М рН 3,8 ацетатного буфера, содержащего 0,15 М раствор хлорида натрия и 0,2 мл стандартного препарата гиалуроновой кислоты. Полученный раствор тщательно встряхивается. В качестве контроля вместо разведения сыворотки используется 0,9% раствор NaCl. Проводится инкубация смеси при температуре (+)37 °С в

течение 1 ч. После инкубации в каждую из пробирок добавляется 20 мкл 0,75% риванола. Для получения сгустка пробирки тщательно встряхиваются.

5. Учет результатов реакции

Результат реакции оценивается по образованию сгустка в баллах, где 0 – это плотный сгусток (отсутствие активности),

1 – рыхлый сгусток,

2 – рыхлый сгусток, хлопья, нити,

3 – хлопья, нити,

4 – хлопья,

5 – полный распад сгустка (максимальная активность).

За отсутствие активности принимается результат, полученный в контрольных пробах.

Оценивается титр сыворотки, в котором определяется минимальная активность гиалуронидазы (на один и более баллов выше контрольной пробы).

6. Клиническая интерпретация результатов

Выявление гиалуронидазной активности в титре сыворотки крови выше 1:6000 указывает на высокую вероятность развития хронического гепатита (K70.1, K71.3-K71.6, K73) или фиброза и цирроза печени (K70.3, K71.6, K74).

ВРЕМЯ, ЗАТРАЧЕННОЕ НА КАЖДЫЙ ЭТАП МЕТОДА (ХРОНОМЕТРИЯ)

Этап постановки реакции	Время
Приготовление буферного раствора	40 минут (1 раз в месяц)
Приготовление раствора гиалуроновой кислоты	2 часа (1 раз в месяц)
Постановка реакции	10 минут (при каждой постановке)
Инкубация проб	1 час (при каждой постановке)
Учет результатов реакции (48 проб)	5 минут (при каждой постановке)
Клиническая интерпретация полученных данных	10 минут

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ

1. Нарушение условий получения и хранения биологических материалов может исказить результат реакции.

2. Нарушение условий хранения реактивов, использование реактивов с истекшим сроком годности не может гарантировать достоверных результатов.

3. Неполное растворение реактивов (наличие осадка, нитей, хлопьев при визуальном исследовании) приведет к изменению их концентрации, что может повлиять на конечный результат.

4. Хранение буферного раствора при температуре выше $(+4^{\circ}\text{C})$, может привести к изменению параметров буферной системы и активности ферментов.