**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

|  |  |
| --- | --- |
|  | УТВЕРЖДАЮ  Заместитель Министра  \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Е.Л.Богдан  «\_\_\_\_» \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_2020 г.  Регистрационный № 074-0720 |

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЕРОЯТНОСТИ РАЗВИТИЯ ХРОНИЧЕСКИХ ДИФФУЗНЫХ** ЗАБОЛЕВАНИЙ ПЕЧЕНИ, ОСНОВАННЫЙ НА ОПРЕДЕЛЕНИИ ЭЛАСТАЗНОЙ 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., к.м.н., доцент Окулич В.К., Прищепенко В.А.

Витебск, 2020

В настоящей инструкции (далее – инструкция) изложен метод определения вероятности развитияхронических диффузных заболеваний печени (далее – ХДЗП), основанный на определении эластазной активности сыворотки крови, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику и медицинскую профилактику хронического гепатита (К70.1, К71.3-К71.6, К73), фиброза и цирроза печени (К70.3, К71.6, К74).

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 НЕОБХОДИМЫХМЕДИЦИНСКИХ 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 целения 0,1оС;

- холодильная камера с температурой (+)4оС, морозильная камера с температурой (-)20оС;

- центрифуга лабораторная клиническая;

- спектрофотометр многоканальный с возможностью измерения при длине волны 492 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;

- трис-(гидроксиметил)-аминометан (сухое вещество);

- 0,1 М раствор соляной кислоты;

- полистироловый планшет для ИФА;

- эластин-конго красный (сухое вещество);

- 0,9% раствор натрия хлорида.

**ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Заболевания и патологические состояния, сопровождающиеся жалобами, которые могут соответствовать хроническому диффузному заболеванию печени (К70.1, К70.3, К71.3-К71.6, К73, К74).

**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 периферическою венозную кровь пациента натощак 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/мин. 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 (-)20оС не более 1 месяца.

**2. Приготовление 0,2 М трис-HCl буфера c pH-7,4**

Для приготовления буферного раствора 6,057 мг трис-(гидроксиметил)-аминометана растворяют в 50 мл дистиллированной воды. К полученному раствору добавляют 42 мл 0,1 М HCl, полученный раствор доводят до рН 7,4. Раствор хранят в холодильнике при температуре (+)4оС не более месяца.

**3. Приготовление рабочего раствора эластин-Конго красного**

Для приготовления рабочего раствора 8 мг эластин-Конго красного растворяют в 10 мл рабочего 0,2 М трис-HCl буфера с рН 7,4. Полученный раствор хранят в холодильнике при температуре (+)4 оС не более суток.

**4. Постановка реакции для определения эластазной активности сыворотки крови**

Постановка реакции проводится в пробирках типа «Эппендорф». Для каждого образца используют две пробы: опытную и контрольную. Реакционная смесь опытной пробы состоит из 400 мкл рабочего раствора эластин-конго красного в трис-HCl буфере рН 7,4 и 100 мкл сыворотки крови. В контрольную пробу вносят 400 мкл трис-HCl буфера c pH-7,4 и 100 мкл сыворотки крови. Далее проводится инкубация исследуемых проб в термостате при (+)37°С в течение 24 ч. После инкубации проводится осаждение не разрушенного эластин-конго красного в центрифуге в течение 10 минут при 10 тыс. оборотов/мин. По 150 мкл надосадочной жидкости переносится в дублях в лунки полистиролового планшета.

**5. Учет результатов реакции**

Учет результатов реакции проводится путем определения оптической плотности проб спектрофотометрически, при длине волны 492 нм.

Для устранения искажения результатов реакции результат вычисляют как разницу между средними показателями опытных и контрольных проб. Пересчет результатов реакции в пикокаталы проводят по формуле 1, полученной при построении калибровочного графика:

X(пкат) = (0,0027 + 1,7 х Аоп)2(1)

где X – искомый результат;

0,0027 и 1,7 - используемые для расчета эластазной активности постоянные величины;

Аоп – разница оптических плотностей опытной и контрольной проб.

**6. Клиническая интерпретация результатов**

Выявление эластазной активности сыворотки крови выше 0,35 пкат указывает на высокую вероятность развития хронического гепатита (К70.1, К71.3-К71.6, К73) или фиброза и цирроза печени (К70.3, К71.6, К74).

**ВРЕМЯ, ЗАТРАЧЕННОЕ НА КАЖДЫЙ ЭТАП МЕТОДА (ХРОНОМЕТРИЯ)**

|  |  |
| --- | --- |
| **Этап постановки реакции** | **Время** |
| Приготовление буферного раствора | 40 минут (1 раз в месяц) |
| Приготовление раствора эластин-конго красного | 10 минут (1 раз в сутки) |
| Постановка реакции | 30 минут (при каждой постановке, для 48 образцов) |
| Инкубация проб | 24 часа (при каждой постановке) |
| Центрифугирование проб | 10 минут (при каждой постановке) |
| Учет результатов реакции (48 проб) | 30 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 (+)4оС, может привести к изменению параметров буферной системы и активности ферментов.