

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

«*12*» *сентября* 2019 г.

Регистрационный № 104-0719



МЕТОД ПРОГНОЗИРОВАНИЯ АКТИВНОСТИ ЭПИЛЕПСИИ С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОМАРКЕРОВ

Инструкция по применению

Учреждение-разработчик: государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр психического здоровья»

Авторы: д.м.н. Докукина Т. В., к.м.н. Хлебоказов Ф. П., к.м.н. Асташонок А. Н., к.м.н. Слобина Е. Л., Махров М. В., Мартыненко А. И., Шамрук И. В., Захаревич О. Ю., Будько Т. О.

Минск, 2019

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод прогнозирования активности эпилепсии с использованием биомаркеров, указывающих на развитие нейродегенерации при выявлении превышающих нормальные значения концентраций, или регресс активности эпилепсии при их снижении/нормализации. Метод может быть использован в комплексе оказания медицинских услуг, направленных на лечение пациентов с эпилепсией.

Инструкция предназначена для врачей-психиатров-наркологов, врачей-неврологов, врачей лабораторной диагностики, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с эпилепсией в стационарных и/или амбулаторных условиях, и/или условиях отделения дневного пребывания.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Эпилепсия (G-40 по МКБ-10).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Не имеется.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, РЕАКТИВОВ, ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Инструменты и расходные материалы:

- шприцы одноразовые стерильные (5 мл) или вакутайнеры на 5 мл для забора крови из вены.
- стерильные иглы, стерильные пластиковые или стеклянные пробирки для забора ликвора.
- пробирки типа «эппендорф» (объемом 1,5 мл), криопробирки (объемом 2мл)
- пробирки пластиковые (объемом 10 мл) для приготовления разведений;

- стаканы мерные 100, 200, 500 мл, цилиндры мерные 100 мл;
 - холодильник бытовой (+2– +8°C) с морозильной камерой (-20°C);
 - дозаторы пипеточные с переменным объемом от 0 до 1000 мкл;
 - секундомер механический лабораторный, время анализа: мин., сек;
 - вортекс, скорость вращения от 0 до 1000 об/мин;
 - термостат, поддерживаемая температура от комнатной до 60 °С;
 - фотометр для микропланшетов для проведения иммуноферментного анализа ИФА, рабочие длины волн, нм – 450; 490; 540; 595; 650; 750;
 - штатив для пробирок лабораторный;
 - бумага фильтровальная;
 - вода деионизованная, дистиллированная высокой степени очистки.
2. ИФА-тест системы для выявления нейрофиламентов легких цепей и фосфорилированной изоформы тау-белка.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Пробоподготовка биологического материала

(кровь, цереброспинальная жидкость)

Взятие крови следует производить натошак из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8-1,1 мм) в вакутайнер. После взятия крови пробирку следует плавно несколько раз перевернуть вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом. После перемешивания пробирку поместить в штатив.

Плазму крови получают путем центрифугирования пробирки с цельной кровью в течение 10-20 минут при 3000 об/мин, после чего плазму отбирают наконечниками (на 1 мл) с аэрозольным барьером и переносят в пробирки типа «эппендорф». Образцы плазмы крови следует разлить небольшими (0,1-0,3 мл) порциями в отдельные стерильные пробирки объемом 1,5 мл типа «эппендорф». Образцы, предназначенные для длительного хранения, отбирают

в криопробирки на 2 мл с завинчивающимися крышками. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

Для получения сыворотки крови образцы центрифугируют при +4 °С при 1500 - 3000 об/мин) не более 15 - 20 минут. Полученную сыворотку отделяют от форменных элементов крови и плотно закрывают пробирки крышкой. Если получена липемическая или гемолизированная сыворотка, образец выбраковывают.

Условия хранения и транспортирования материала: образцы цельной крови могут храниться при температуре не более 25°С – в течение 6 часов с момента получения материала; при температуре от 2 до 8°С – не более одних суток; образцы плазмы крови: при температуре 2-8°С – в течение 5 суток; при температуре минус 16-20°С – в течение года. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

Транспортирование пробирок с кровью и микропробирок с плазмой осуществляют в специальном термоконтейнере с охлаждающим элементом или в термосе со льдом при температуре плюс 2-8°С.

Забор крови и ее транспортировка производится согласно приказу Министерства Здравоохранения Республики Беларусь «О порядке организации преаналитического этапа лабораторных исследований» (10.11.2015 г. N 1123).

Цереброспинальную жидкость (ликвор) получают путем прокола поясничной области одноразовыми пункционными иглами. Забор ликвора в количестве не менее 1 мл проводят в одноразовые пластиковые пробирки объемом 1,5 мл.

Условия хранения и транспортирования материала: при температуре от 2 до 8°С – в течение 1 суток; при температуре минус 20°С – в течение 1 месяца; при температуре минус 70°С – длительно. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

Транспортирование осуществляют в специальном термоконтейнере с охлаждающими элементами или в термосе со льдом: при температуре от 2 до 8°С – в течение 6 часов, в замороженном виде – в течение 1 суток.

Количественное определение маркера повреждения нейронов: фосфорилированного тау-белка и маркера аксонального повреждения нейронов ЦНС – нейрофиламентов легких цепей в биологическом материале проводится методом иммуноферментного анализа.

Наибольший диагностический потенциал доказан для двух маркеров: фосфорилированного тау-белка и нейрофиламентов легких цепей (таблица). Наиболее чувствительным маркером нейродегенерации на ранних стадиях является уровень фосфорилированного тау-белка в крови или цереброспинальной жидкости. Повышение уровня фосфорилированного тау-белка в крови отражает непрерывность и прогрессиентность течения патологического процесса. Изменения в концентрации нейрофиламентов отражают степень деградации аксонов нейронов головного мозга, позволяя прогнозировать, как будут развиваться изменения в тканях головного мозга и, соответственно, аггравацию заболевания или наступление стойкой клинической ремиссии.

Таблица – Концентрации нейрофиламентов легких цепей в сыворотке крови и тау-белка (общего и фосфорилированной изоформы) в плазме крови и цереброспинальной жидкости (ликвор) в норме, при нейродегенеративном процессе у пациентов с фармакорезистентной эпилепсией

Показатель	Биологический материал	Нейродегенеративный процесс на фоне эпилепсии	Норма (пг/мл)
Общий тау	Плазма крови	↓(снижается или не определяется вообще)	10-20
	Цереброспинальная жидкость	↓ снижается в 2-3 раза	50-180
Фосфорилированный тау-белок (пг/мл)	Плазма крови	↑ выше 10 пг/мл	0-8
	Цереброспинальная жидкость	↑ увеличивается (в 1,5-2 раза)	20-30
Нейрофиламенты легких цепей	Сыворотка крови	↑ выше 40 пг/мл	0-38 пг/мл

Определение концентраций фосфорилированного тау-белка, нейрофиламентов легких цепей при различных вариантах течения эпилепсии значительно повышает точность диагностики на ранних стадиях

нейродегенеративного процесса и позволяет выявить пациентов, имеющих острое течение заболевания. При этом, следует помнить: сочетание и сопоставление клинических, нейропсихологических и биохимических показателей позволит получить наибольшую диагностическую и прогностическую значимость.

ВОЗМОЖНЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МЕТОДА

Несоблюдение последовательности проведения этапов и технологии применения метода может приводить к порче биологического материала. Для исключения ошибок необходимо соблюдать правила и рекомендации, изложенные в данной инструкции. Для обеспечения достоверности результатов образцы следует исследовать четырехкратно.

Ошибки при оценке результатов детекции биомаркеров (фосфорилированного тау-белка, амилоидов A β 40, A β 42) методом иммуноферментного анализа могут быть обусловлены:

- нарушениями технологии приготовления анализируемых образцов (пробоподготовки), что приводит к получению ложноотрицательных результатов;
- при исследовании плазмы крови методом иммуноферментного анализа необходимо предварительно вносить в исследуемую пробирку специфические ингибиторы протеаз (концентрация 1мМ), препятствующие разрушению биомаркеров (в первую очередь амилоида A β 42);
- использованием реактивов с истекшим сроком годности или неправильно хранившихся.