

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

«12» августа 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

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д. Л. Пиневиц

06.09.2019

Регистрационный № 104-0719

**МЕТОД ПРОГНОЗИРОВАНИЯ АКТИВНОСТИ ЭПИЛЕПСИИ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОМАРКЕРОВ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический
центр психического здоровья»

АВТОРЫ: д-р мед. наук Т. В. Докукина, канд. мед. наук Ф. П. Хлебоказов, канд.
мед. наук А. Н. Асташонок, канд. мед. наук Е. Л. Слобина, М. В. Махров,
А. И. Мартыненко, И. В. Шамрук, О. Ю. Захаревич, Т. О. Бутько

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.

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

1. Инструменты и расходные материалы:

шприцы одноразовые стерильные (5 мл) или вакутайнеры (5 мл) для забора крови из вены;

стерильные иглы, стерильные пластиковые или стеклянные пробирки для забора ликвора;

пробирки типа «эппендорф» (1,5 мл), криопробирки (2 мл);

пробирки пластиковые (10 мл) для приготовления разведений;

стаканы мерные 100, 200, 500 мл, цилиндры мерные 100 мл;

холодильник бытовой (2–8 °С) с морозильной камерой (-20 °С);

дозаторы пипеточные с переменным объемом от 0 до 1000 мкл;

секундомер механический лабораторный, время анализа: мин, с;

вортекс, скорость вращения от 0 до 1000 об/мин;

термостат, поддерживаемая температура от комнатной до 60 °С;

фотометр для микропланшетов для 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.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Эпилепсия (G-40 по МКБ-10).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Пробоподготовка биологического материала (кровь, цереброспинальная жидкость)

Забор крови следует производить натошак из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8–1,1 мм) в вакутейнер. После забора пробирку следует плавно несколько раз перевернуть вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом; затем пробирку поместить в штатив.

Плазму крови получают путем центрифугирования пробирки с цельной кровью в течение 10–20 мин 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 мин. 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 ч с момента получения материала; от 2 до 8 °С — не более 1 сут; образцы плазмы крови: при температуре 2–8 °С — в течение 5 сут; -16–20 °С — в течение 1 года. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

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

Забор крови и ее транспортировка производится согласно приказу Министерства здравоохранения Республики Беларусь «О порядке организации преаналитического этапа лабораторных исследований» от 10.11.2015 № 1123.

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

Условия хранения и транспортировки материала осуществляются: при температуре от 2 до 8 °С — в течение 1 сут; -20 °С — 1 мес.; -70 °С — длительно. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

Транспортировку осуществляют в специальном термоконтейнере с охлаждающими элементами или в термосе со льдом: при температуре от 2 до 8 °С — в течение 6 ч, в замороженном виде — 1 сут.

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

Наибольший диагностический потенциал доказан для 2 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 прогрессивность 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

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.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Несоблюдение последовательности проведения этапов и технологии применения метода может привести 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, Аβ40, Аβ42) методом иммуноферментного анализа могут быть обусловлены:

нарушением технологии приготовления анализируемых образцов (пробоподготовки), что приводит к получению ложноотрицательных результатов;

предварительное внесение при исследовании плазмы крови методом иммуноферментного анализа в исследуемую пробирку специфических ингибиторов протеаз (концентрация 1 мМ), препятствующие разрушению биомаркеров (в первую очередь A β 42);

использованием реактивов с истекшим сроком годности или, которые хранились неправильно.