

Доклад. с. 14

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР
ГЛАВНОЕ УПРАВЛЕНИЕ
ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ ПОМОЩИ

**ЗАГОТОВКА ПЛАЗМЫ ОЖГОВЫХ
РЕКОНВАЛЕСЦЕНТОВ
ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОГО
ИСПОЛЬЗОВАНИЯ**

Методические рекомендации

*Ин. Рерикова Т. В.
Г. Тихонова Г. Я.
для ожогового центра
организации "Кабель"
Т. В. 17.10.83*

Москва 1980 г.

~~Секрет~~
Гаврилову
Комитету здравоохранения
с научными рекомендациями

[Handwritten signature]

Методические рекомендации подготовлены Н. Р. Панченковым, Т. П. Аникиной, И. К. Корякиной, Э. Н. Луковкиной, Г. Н. Шведовой, Р. И. Муразяном, Н. А. Федоровым, Т. В. Голосовой — сотрудниками Центрального ордена Ленина и ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательского института гематологии и переливания крови (директор — член-корр. АМН, профессор О. К. Гаврилов).

"УТВЕРЖДАЮ"
Начальник Главного Управления лечебно-профилактической помощи Министерства здравоохранения СССР

[Handwritten signature] (И. В. Шаткин)
"28" *[Handwritten date]* 1980 г.
№ 10/11-25

ЗАГОТОВКА ПЛАЗМЫ ОЖОГОВЫХ РЕКОНВАЛЕСЦЕНТОВ
ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
Методические рекомендации.

Иммунные плазмы направленного действия положительно зарекомендовали себя при лечении многих заболеваний и инфекционных осложнений. Однако до настоящего времени заготовка иммунных препаратов связана с определенными сложностями, затрудняющими их получение в достаточном количестве для широкого клинического применения. Наиболее остро вопрос применения иммунных плазм встает перед врачами, занимающимися лечением больных с обширными ожогами, так как у данной группы пациентов часто встречаются инфекционные осложнения, вызываемые ассоциациями микробных возбудителей, как правило, устойчивых к подавляющему большинству антибиотиков, используемых в клинике. Проведенные в последние годы исследования свидетельствуют, что использование средств пассивной иммунизации у обожженных позволяет значительно снизить процент инфекционных осложнений и летальных исходов.

Плазма ожоговых реконвалесцентов является наиболее универсаль-

ной иммунной средой, так как в ней содержатся в высоком титре "противоожоговые" и различные противомикробные антитела.

В настоящее время является общепризнанным роль аутоинтоксикации в развитии ожоговой токсемии, что привело к разработке эффективного, патогенетически обоснованного метода иммунотерапии, направленного на нейтрализацию содержащихся в плазме ожоговых реконвалесцентов антителами токсинов, циркулирующих в крови больных. Научные изыскания по иммунотерапии ожоговой болезни показали, что плазма или кровь человека, перенесшего ожоговую болезнь оказывает лечебный эффект при использовании их у пострадавших в остром периоде ожоговой болезни. Указанное объясняется содержанием в данных препаратах "противоожоговых" антител.

За время пребывания в ожоговом стационаре пострадавшие контактируют с различными представителями микрофлоры, наиболее часто вызывавшими инфекционные осложнения у обожженных: стафилококком, протеей, синегнойной и кишечной палочками. Доказано, что в ответ на микробные антигенные раздражители в организме обожженных вырабатываются соответствующие антитела.

Содержание различных антиоксидантных и противомикробных антител зависит от обширности, глубины поражения и времени, прошедшего с момента травмы. При легкой и средней тяжести течения ожоговой болезни в крови больных начиная с 21 - 28 дня выявляются специфические "противоожоговые" антитела, которые сохраняются в высоком титре в дальнейшем до 2-х лет и более. Показано, что во время пребывания в стационаре в течение первых 30 дней увеличивается количество антител к стафилококку, повышается содержание специфического стафилококкового альфа-стафилолизина. В более поздние сроки отмечается интенсивное антителообразование в отношении протей, синегнойной и кишечной палочек. В результате плазма ожоговых реконвалесцентов, заготовленная через 1 месяц после получения ожоговой травмы, обладает высокой противостафи-

лококковой активностью; через 2 - 3 месяца отмечается также высокая активность в отношении синегнойной и кишечной палочек, протей.

Оптимальной категорией лиц, перенесших ожоговую болезнь у которых целесообразно взятие плазмы, являются реконвалесценты, имевшие ожоги, квалифицированные по тяжести поражения от 5 до 30 единиц (1 единица соответствует 1% поверхностного ожога, 1% глубокого ожога - 3 единицы), то есть лица перенесшие ожоговую болезнь легкой и средней степени тяжести. При обширных глубоких ожогах (индекс тяжести поражения 60 и более) антителообразование оказывается резко подавленным. Таким пациентам в процессе лечения переливаются большие дозы крови, плазмы, белковых гидролизатов и других трансфузионных сред, что часто ведет к сенсибилизации, выработке антител против клеток крови, белковых компонентов плазмы и т.д. В связи с указанным, у пациентов, перенесших обширные глубокие ожоги, взятие плазмы можно производить только после тщательного клинико-лабораторного и всестороннего иммунологического контроля. Проведенные исследования показали, что наиболее интенсивное увеличение количества "противоожоговых" и микробных антител наблюдается у больных с ожогами III степени площадью 7 - 15% поверхности тела. Менее целесообразно направлять на плазмаферез и лиц перенесших ограниченные поверхностные ожоги в связи с их кратковременным пребыванием в стационаре (менее 21 дня), то есть минимального срока необходимого для выработки "противоожоговых" и противомикробных антител.

Видаравливающие пациенты охотно соглашались на плазмаферез после беседы, в которой врач объясняет абсолютную безвредность процедуры и ценность получаемой плазмы для лечения тяжелообожженных.

Заготовка иммунных препаратов от доноров - ожоговых реконвалесцентов возможна методом обычной экфузии и метода плазмафереза

"Инструкция по применению плазмафереза", М., 1972 г.). Более целесообразным является второй, так как столь важные для лечения больных антитела находятся в плазме. При плазмаферезе, проводимом раз в 14 дней, можно однократно изъять 250 мл плазмы. С помощью обычной эксузии получаемое количество плазмы значительно меньше -- около 100 - 130 мл. Остальная часть дозы состоит из клеточных элементов крови. Заготовленная кровь ожогового реконвалесцента должна быть перелита больному в ближайшие дни, в то время как плазму можно заморозить при температуре -20-30°C и хранить до одного года (иммунная активность сохраняется на 80 - 90%) или подвергнуть лиофильной сушке. Нецелесообразность заготовки плазмы, а не крови объясняется еще и тем, что для получения положительного действия необходимо применение больших доз -- не менее 250-500 мл плазмы (или соответственно 500-1000 мл крови) в сутки на протяжении 5 - 7 дней. Переливание такого большого количества крови может неблагоприятно сказаться на состоянии реципиента. К тому же такое большое количество иммунной крови технически сложно заготовить в столь непродолжительный промежуток времени.

На предполагаемых доноров -- ожоговых реконвалесцентов распространяются все правила, инструкции и другие нормативные документы регламентирующие донорство (Инструкция по медицинскому освидетельствованию доноров крови от 17.10.1978г. № 06-14/13). Донором может стать любой пациент, перенесший ожоговую болезнь (легкой и средней степени тяжести), с полностью восстановленным кожным покровом, не имеющий противопоказаний к донорству.

После согласия донора, перенесшего ожог, на плазмаферез целесообразно исследовать количество антител в его сыворотке крови. Полученные результаты вносятся в "Паспорт плазмы ожогового реконвалесцента", наклеиваемого на мешок с плазмой после плазмафереза следующего образца.

Паспорт плазмы ожогового реконвалесцента.

ФИО донора _____
Дата заготовки _____
Группа крови _____ Резус-фактор _____
Содержание антител:
"противоожоговые" _____
антиальфастафилолизин (АЕ/мл) _____
противомикробные антитела:
синегнойные _____
кишечные _____
протейные _____
стафилококковые _____

Наличие на заготовленной плазме данного паспорта позволяет выбрать из заготовленных доз наиболее эффективные, содержащие в высоком титре антитела для конкретного больного (с наибольшей активностью в отношении стафилококка, синегнойной и кишечной палочек, протей).

Повышенное содержание антител у ожогового реконвалесцента сохраняется в период 3 - 5 плазмаферезов, проводимых с интервалами в 14 - 28 дней. Через 5 - 6 месяцев после выписки из стационара содержание микробных антител в сыворотке крови значительно снижается и поэтому полученная после этих сроков плазма, как правило, не является иммунной.

При титровании сывороток ожоговых реконвалесцентов количество стафилококкового альфастафилолизина используется реакция нейтрализации гемолитических свойств стафилококкового токсина (по Выгодчикову). Количество бактериальных антител к стафилококку, синегнойной и кишечной палочкам определяется в реакции бактериальной агглютинации с использованием водорастворимых формолантигенов,

приготавливаемых из микробной взвеси данной культуры.

Ниже приводятся методики необходимые для составления характеристики плазмы ожоговых реконвалесцентов.

Метод титрования альфа-стафилолизина.

Для титрования необходимо иметь: стафилококковый токсин, эритроциты кролика, стандартную антистафилококковую сыворотку, выпускаемую институтом им. Л.А.Тарасевича.

Приготовление взвеси эритроцитов. Кровь кролика дефибринируют во флаконе с бусами встряхиванием, фильтруют через марлю и сливают в центрифужную пробирку. Отмечают ее уровень. Эритроциты трехкратно отмывают путем центрифугирования при скорости не более 1000 об/мин в физиологическом растворе. Отмытые эритроциты доливаются до метки физиологическим раствором и из этого количества готовится рабочая взвесь эритроцитов из расчета 1 мл эритроцитов + 2 мл физиологического раствора.

Определение содержания альфа-стафилолизина в сыворотке крови. Испытуемую сыворотку разводят стерильными пипетками физиологическим раствором 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:30 и т.д. Применяемый для титрования стафилококковый токсин разводят из расчета ЛН/5. К 1 мл каждого разведения сыворотки добавляется по 1 мл разведенного стафилококкового токсина (ЛН/5). После встряхивания в каждую пробирку добавляется по 1 капле трижды отмытых эритроцитов кролика. Пробирки выдерживаются в термостате 1 час при 37°C и 1 час при комнатной температуре. Максимальное разведение сыворотки в смеси с которой ЛН/5 токсина дает гемолиз не более чем на 50% содержит 1/5 ед. антиальфа-стафилолизина. В 1 мл исходной неразведенной сыворотки содержание антиальфа-стафилолизина в 5 раз меньше, чем величина разведения сыворотки в последней пробирке, где отмечено отсутствие гемолиза.

Для контроля эритроцитов берется 2 мл физиологического раствора и 2 капли эритроцитов. Для контроля токсина к 1 мл физиологического раствора прибавляется 1 мл разведенного токсина и 2 капли эритроцитов. В контроле эритроцитов гемолиза быть не должно. В контроле токсина гемолиз должен быть полный.

Количественное определение бактериальных антител.

При постановке реакции агглютинации используются формоловные антигены культур стафилококка, синегнойной палочки, протей, кишечной палочки. Для приготовления антигена 1 млрд взвеси суточной культуры обезвреживается 10% раствором формалина (из расчета 0,1 мл на 1 мл взвеси) в течение 48 часов. После проверки на стерильность антигены могут храниться и использоваться в течение 2-х месяцев. Штаммы, дающие спонтанную агглютинацию, в работе не используются.

Сыворотка донора ожогового реконвалесцента, предназначенная для титрования инактивируется 30 минут при 56°C. Для определения количества антител готовятся ряд кратных разведений сыворотки в физиологическом растворе (1:1, 1:20, 1:40 и т.д.). В каждую пробирку вносится по 0,1 мл антигена. Пробирки выдерживаются 2 часа при 37°C, затем 18 часов при комнатной температуре. Учет результатов реакции проводится с помощью агглютиноскопа. Максимальное разведение, где отмечается образование агглютиногенов, считается титром сыворотки в отношении данного вида антител.

Количество антител в сыворотках можно считать повышенным, если они превышают следующие величины:

- Золотистый стафилококк - 1:320
- Кишечная палочка - 1:80
- Синегнойная палочка - 1:40
- Протей - 1:40

Определение "противоожоговых" антител.

Для определения антиоксического "противоожогового" титра используется сыворотка больного с субтотальным ожогом, взятая через 24 часа с момента травмы (T_{24}). Антиоксический титр определяется по нейтрализации токсического действия T_{24} при добавлении кратных разведений сыворотки ожогового реконвалесцента. Инкубация смеси T_{24} и равного количества сыворотки реконвалесцента проводится в термостате в течение 3-х часов и затем исследуется методом гемокультур. С целью борьбы с острой ожоговой токсемией рекомендуется применять сыворотки с антиоксическим титром не менее 1:16.

Метод гемокультуры заключается в следующем: Приготовление культивируемого материала (лейкоцитарной пленки) и питательной среды: 10 мл крови человека и 10 мл крови здорового кролика берется в 4 парафинированных пробирки (по 5 мл в каждую) с добавлением 2-х капель раствора гепарина 1:1000 на 5 мл крови. До и после центрифугирования кровь сохраняется на льду. Кровь центрифугируется при 5000 оборотов в течение 15 минут. Плазма из всех пробирок отсасывается в сухую парафинированную пробирку и служит питательной средой гемокультур. 2 пробирки с форменными элементами донора-человека помещаются в теплую воду (37°C). Через 30 минут лейкоцитарные пленки из пробирок переносятся в чашки Петри с раствором Рингера и тщательно отмываются. Выбирается пленка одинаковой толщины на всем протяжении и переносится во вторую чашку с раствором Рингера, где ее нарезают кусочками 0,3-0,5 мм (культивируемый материал).

Культивирование производится в сферических кюветах на покровном стекле по принципу висячей капли. В каждой кювете культивируется по 2 кусочка лейкоцитарной пленки.

Контрольные культуры погружаются в питательную среду смешанную с равным количеством раствора Рингера. Опытные культуры культивируются на питательной среде, к которой добавлено равное количество исследуемой сыворотки. Для контроля используются 4 кюветы для опыта - по 4 кюветы на каждую пробу. Культивирование производится в термостате при 37°C в течение 18 часов.

Показателем биологической активности служит величина зоны миграции лейкоцитов вокруг культивируемого кусочка лейкоцитарной пленки. При помощи рисовального аппарата контуры кусочков и зон миграции переносятся на бумагу. Измерение площадей производится планиметром. Вычисляются относительные площади миграции контрольных и опытных культур. Для каждой пробы и контроля вычисляется средняя величина зоны миграции из 6-8 лейкоцитарных кусочков. Площадь миграции контрольных культур принимается за 100. Это физиологическая величина миграции, она входит и в миграцию опытных культур. Поэтому для выяснения изменений миграции под влиянием исследуемой сыворотки она вычитается. Если величина зоны миграции опытных культур меньше контроля, то при вычислении получается величина с отрицательным знаком (сыворотка реконвалесцента не обладает антиоксическим действием).

За антиоксический титр принимается максимальное разведение сыворотки под влиянием которого зона миграции превышает контрольную.

Клиническое использование плазмы ожоговых реконвалесцентов целесообразно во всех периодах ожоговой болезни. Начальные проявления интоксикации в периоде ожогового шока могут быть значительно уменьшены с помощью переливаний плазмы ожоговых реконвалесцентов начиная со 2-х суток после получения травмы в дозах 250-500 мл (в зависимости от тяжести шока). Плазма ожоговых реконвалесцентов является наиболее эффективным средством борьбы с выраженной интоксикацией, характерной для периода токсемии ожоговой болезни.

В зависимости от степени интоксикации используются переливания плазмы ожоговых реконвалесцентов ежедневно по 250-500 мл. В септикотоксическом периоде ожоговой болезни плазма ожоговых реконвалесцентов используется не только с целью дезинтоксикации, но и для борьбы с угрожающими жизни инфекционными осложнениями. При этом, в зависимости от характера возбудителя подбирается плазма содержащая в высоком титре антител именно для данного возбудителя или микробной ассоциации. При подозрении на сепсис или, тем более, подтвержденном бактериологически сепсисе, начинают с переливания 500 мл плазмы ожоговых реконвалесцентов, затем ежедневно по 250 мл до клинического улучшения состояния обожженного. После купирования критического состояния по 250 мл через 2-3 дня в течение недели.

Благодаря наличию в высоком титре антител к различным микробным возбудителям плазма ожоговых реконвалесцентов может быть использована при тяжелых хирургических гнойно-септических заболеваниях и осложнениях.

ОТРЫВНОЙ ЛИСТ

для учета эффективности заготовки плазмы ожоговых реконвалесцентов.

Направлять в информационно-вычислительный центр: Москва, Москворецкая набережная, 2-а.

1. Заготовка плазмы ожоговых реконвалесцентов.

2. _____

(кем и когда утвержден)

3. Результаты применения метода:

положительные _____
(количество наблюдений)

неопределенные _____
(количество наблюдений)

отрицательные _____
(количество наблюдений)

Общее количество наблюдений _____

Наблюдения проводились с _____ 19__ по _____ 19__ г.

4. Замечания и пожелания (текст)

Подпись _____
(должность, ф.и.о. лица, заполнившего карту)