



**АЛГОРИТМ ДИАГНОСТИКИ
СПОНТАННОГО БАКТЕРИАЛЬНОГО ПЕРИТОНИТА
У ПАЦИЕНТА С ЦИРРОЗОМ ПЕЧЕНИ С АСЦИТОМ**

инструкция по применению

Учреждения-разработчики:

УО «Гомельский государственный медицинский университет»,

ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»,

УО «Белорусский государственный медицинский университет»,

УЗ «Гомельская городская клиническая больница №3»,

ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека»

Авторы: к.м.н., доцент Малаева Е.Г.,

Гавриленко Д.И,

д.м.н., профессор Силивончик Н.Н.,

к.м.н., доцент Адаменко Е.И.,

Кобрусева Л.А.,

Шпаковский Ю.П.,

Шулькина Е.В.,

Прокопович А.С.,

Шевченко Н.И.

Гомель-Минск, 2012

В настоящей инструкции по применению изложен алгоритм диагностики осложнения цирроза печени - спонтанного бактериального перитонита. Предназначена для врачей общей практики, врачей-терапевтов, врачей-гастроэнтерологов, врачей-хирургов, врачей-лаборантов.

Перечень условных обозначений

АЖ	- асцитическая жидкость
СБП	- спонтанный бактериальный перитонит
ЭДТА	- этилендиаминтетрауксусная кислота

Перечень необходимого оборудования, реактивов, изделий медицинской техники и др.

Гематологический анализатор, микроскоп, камера Горяева, камера Фукса-Розенталя, тест-полоски для биохимического и клинического исследования мочи, коммерческие флаконы для исследования крови и других стерильных в норме жидкостей организма, ультразвуковой цифровой сканнер.

Показания к применению:

Цирроз печени с асцитом у пациентов при наличии:

- признаков перитонита или инфекции (абдоминальная боль, повышение температуры тела, лейкоцитоз, тахикардия, артериальная гипотония);
- развития или усугубления печеночной энцефалопатии;
- ухудшения функции почек;
- желудочно-кишечное кровотечения (перед назначением антибиотиков).

Описание технологии используемого способа

Этап I. Экспресс-диагностика спонтанного бактериального перитонита у постели пациента с помощью тест-полосок

Проводится врачами общей практики в амбулаториях врача общей практики, врачами-терапевтами и врачами-хирургами в приемных покоях больниц. Протокол исследования составляет 2 минуты.

Прикроватная экспресс-диагностика выполняется с помощью тест-полосок, используемых для биохимического и клинического исследования мочи (определение числа лейкоцитов в АЖ полуколичественным способом). Способ основан на определении активности эстеразы нейтрофильных лейкоцитов и позволяет обнаруживать нейтрофилы в АЖ: интенсивность окраски тест-полосок определяется числом нейтрофильных лейкоцитов в АЖ.

Способ осуществляют следующим образом: сразу после получения АЖ в пробирку с АЖ объемом 5 мл погружают тест-полоску на несколько секунд. После смачивания тест-полоски через 2 мин. сравнивают интенсивность окраски аналитической зоны тест-полоски с окраской зон цветовой шкалы на упаковке фирмы-производителя. Если интенсивность окраски аналитической зоны тест-полоски и цветовой шкалы близка или совпадает – концентрация исследуемого компонента в образце приближается или равна количественному значению, указанному на шкале. На основании полученного результата можно сделать вывод о количественном содержании в ней нейтрофилов (более или менее 250 кл/мкл). При содержании нейтрофилов менее 250 кл/мкл заключают об отсутствии СБП и необходимости проводить дальнейшее цитологическое исследование АЖ. Содержание нейтрофилов более 250 кл/мкл ($0,25 \times 10^9/\text{л}$) при наличии признаков системного

воспалительного ответа в отсутствие интраабдоминального или хирургически леченного источника инфекции позволяет сделать заключение о наличии СБП и назначить эмпирическую антибактериальную терапию. Терапия СБП не может откладываться до получения результатов исследования культуры бактерий АЖ.

Этап II. Определение спонтанного бактериального перитонита способом подсчета нейтрофильных лейкоцитов в асцитической жидкости (исследование может быть в качестве I этапа)

Проводится фельдшерами-лаборантами и врачами лабораторной диагностики районных, городских, областных больниц. К подсчету нейтрофилов в АЖ следует приступить возможно скорее после парацентеза (не более чем через 4 часа). Подсчет осуществляется одним из способов: 1) подсчет нейтрофильных лейкоцитов в счетной камере, 2) подсчет общего количества лейкоцитов в счетной камере с последующим определением процентного и количественного содержания нейтрофилов в фиксированном мазке, 3) подсчет количества нейтрофильных лейкоцитов в гематологическом анализаторе.

Способ 1. Подсчет нейтрофильных лейкоцитов в счетной камере

Ход исследования. Для данного способа необходимо 20-40 мл АЖ. Так как лейкоцитов в АЖ нередко мало, желательно пользоваться специальными камерами большей емкости – Фукса-Розенталя (емкость 3,2 мкл). АЖ тщательно перемешивают вращением пробирки между ладонями в течение 2–3 мин. Асцитическую жидкость не разводят, а только прибавляют к ней 1/10 объема 100 г/л уксусной кислоты, подкрашенной метилфиолетом (0,5 г на 5 мл кислоты) для растворения

эритроцитов и окрашивания клеток. Лучше пользоваться реактивом Самсона: ледяная уксусная кислота – 30 мл, карболовая кислота – 2 мл, спиртовой раствор фуксина (1:10) 2 мл; его доливают дистиллированной водой до 100 мл. Реактив стоек, окрашивает ядра клеток в красновато-фиолетовый цвет, что облегчает подсчет клеток и их дифференцирование.

В сухую агглютинационную пробирку вносят АЖ и реактив Самсона в соотношении 10:1, перемешивают и оставляют на 10–15 мин. для прокрашивания клеточных элементов. Смесь набирают пипеткой и заполняют ее заранее приготовленную камеру Фукса-Розенталя. Счетная камера Фукса-Розенталя состоит из 16 больших квадратов, каждый из которых разделен на 16 малых – всего 256 квадратов. Площадь сетки 16 мм, глубина 0,2 мм, объем камеры 3,2 мкл. Лейкоциты считают на всей площади сетки камеры при малом увеличении микроскопа (окуляр 15, объектив 8). Для дифференциации клеток используется окуляр 7, объектив 40. Число лейкоцитов в 1 л рассчитывают по формуле:

$$[(\text{число элементов во всей камере} \times 11) \div 3,2 \times 10] \times 10^6 = \text{число элементов в камере} \div 3 \times 10^6$$

При использовании камеры Горяева (емкость камеры 0,9 мкл) необходимо считать не менее чем в 3 камерах, взяв затем среднее арифметическое. Число лейкоцитов в 1 л рассчитывают по формуле:

$$\text{цитоз в 1 л} = \text{число элементов в камере} \times 1,2 \times 10^6 \text{ л}$$

Способ 2. Подсчет общего количества лейкоцитов в счетной камере с последующим определением содержания нейтрофилов

Ход исследования. Для данного способа необходимо 20 мл АЖ. 1) 10 мл АЖ набирают в пробирку с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) и центрифугируют при 1500 об/мин. в течение 10 минут. После этого 9 мл надосадочной жидкости удаляют, а 40 мкл оставшейся АЖ разводят жидкостью Тюрка (1–3% раствор ледяной уксусной кислоты – 3

мл; 1% водный раствор генцианвиолета – 3,3 мл; дистиллированная вода – 300 мл), тщательно перемешивают и заполняют счетную камеру. Подсчет количества лейкоцитов производится при увеличении микроскопа $\times 40$ в 1 мм^3 (мкл) асцитической жидкости. 2) Оставшиеся 10 мл АЖ набирают в пробирку и центрифугируют при 1500 об/мин. в течение 10 минут, после чего 9 мл надосадочной жидкости удаляют, а оставшуюся АЖ наносят на предметное стекло и окрашивают по методу Май-Грюнвальду-Гимзе.

Технология приготовления препарата, окрашенного данным способом следующая: А) Полученный мазок на предметном стекле фиксируется метанолом, после чего на него наносится раствор Май-Грюнвальда в течение 3-х минут. Б) Затем добавляется дистиллированная вода (на 1 минуту). В) Полученный раствор удаляется без использования проточной воды (путем сливания раствора с поверхности стекла). Г) Далее на мазок наносится раствор Гимзе (0,3 мл краски Гимзе, разведенной в 10 мл дистиллированной воды). Д) Препарат промывается в дистиллированной воде. Е) Высушивание при комнатной температуре. Производят подсчет процентного содержания нейтрофилов при увеличении микроскопа $\times 100$. 3). После этого рассчитывают количественное содержание нейтрофилов в мм^3 (мкл) АЖ.

Способ 1 и способ 2 являются «золотым стандартом» диагностики СБП, в то же время они трудоемки, в определенной степени субъективны.

Способ 3. Подсчет лейкоцитов асцитической жидкости в гематологическом анализаторе

Для данного способа необходимо 20 мл АЖ.

Способ достоверный, простой и быстрый, однако требует специального оборудования (гематологический анализатор). Существует

вероятность сбоя в работе аппарата при наличии примесей в АЖ (например, нитей фибрина).

Этап III. Микробиологическое исследование асцитической жидкости

Микробиологическое исследование АЖ необходимо для: 1) более тонкого установления вариантов СБП, 2) идентификации микроорганизмов и определение их чувствительности к антибактериальным средствам. Проводится культуральным способом.

Ход исследования. Для данного способа необходимо 20 мл АЖ. Асцитическая жидкость объемом не менее 10 мл следует ввести в коммерческий флакон для исследования крови и других, стерильных в норме жидкостей организма. Проведение исследования АЖ в анаэробных условиях нецелесообразно, так как анаэробная флора не характерна для СБП. Параллельно с исследованием АЖ должно быть выполнено культуральное исследование крови, так как СБП часто ассоциируется с бактериемией. Идентификация микроорганизма и определение лекарственной чувствительности проводятся по мере получения результата.

После получения результатов культурального исследования АЖ, а также учитывая данные предыдущего этапа (подсчет нейтрофилов), возможна верификация следующих вариантов СБП, а также возможного вторичного бактериального перитонита:

1) классический СБП: повышение абсолютного содержания нейтрофилов в АЖ ≥ 250 кл/мкл и положительный результат микробиологического анализа АЖ (показано назначение курса антибиотиков с учетом чувствительности положительной культуры);

2) культуру-негативный нейтрофильный асцит: повышение абсолютного содержания нейтрофилов в АЖ ≥ 250 кл/мкл и отрицательный результат микробиологического анализа АЖ (показано продолжение эмпирической антибиотикотерапии);

3) бактериальный асцит: содержание нейтрофилов в АЖ ≤ 250 кл/мкл и положительный результат микробиологического анализа АЖ (назначается последующий курс антибиотиков с учетом чувствительности положительной культуры);

4) полимикробная культура АЖ, выделение анаэробов или грибов: возможный вторичный бактериальный перитонит (поиск интраабдоминального источника инфекции, дифференциальная диагностика первичного и вторичного бактериального перитонита; в отсутствии интраабдоминального источника инфекции, полимикробный бактериальный асцит требует назначения антибиотиков с учетом чувствительности идентифицированных микроорганизмов).

В случае неадекватного ответа (динамики клинических, лабораторных показателей) на проведение антибиотикотерапии может потребоваться повторный парацентез с оценкой данных и выполнением этапов алгоритма.

Собственно алгоритм диагностики СБП у пациентов с циррозом печени с асцитом представлен на рисунке.

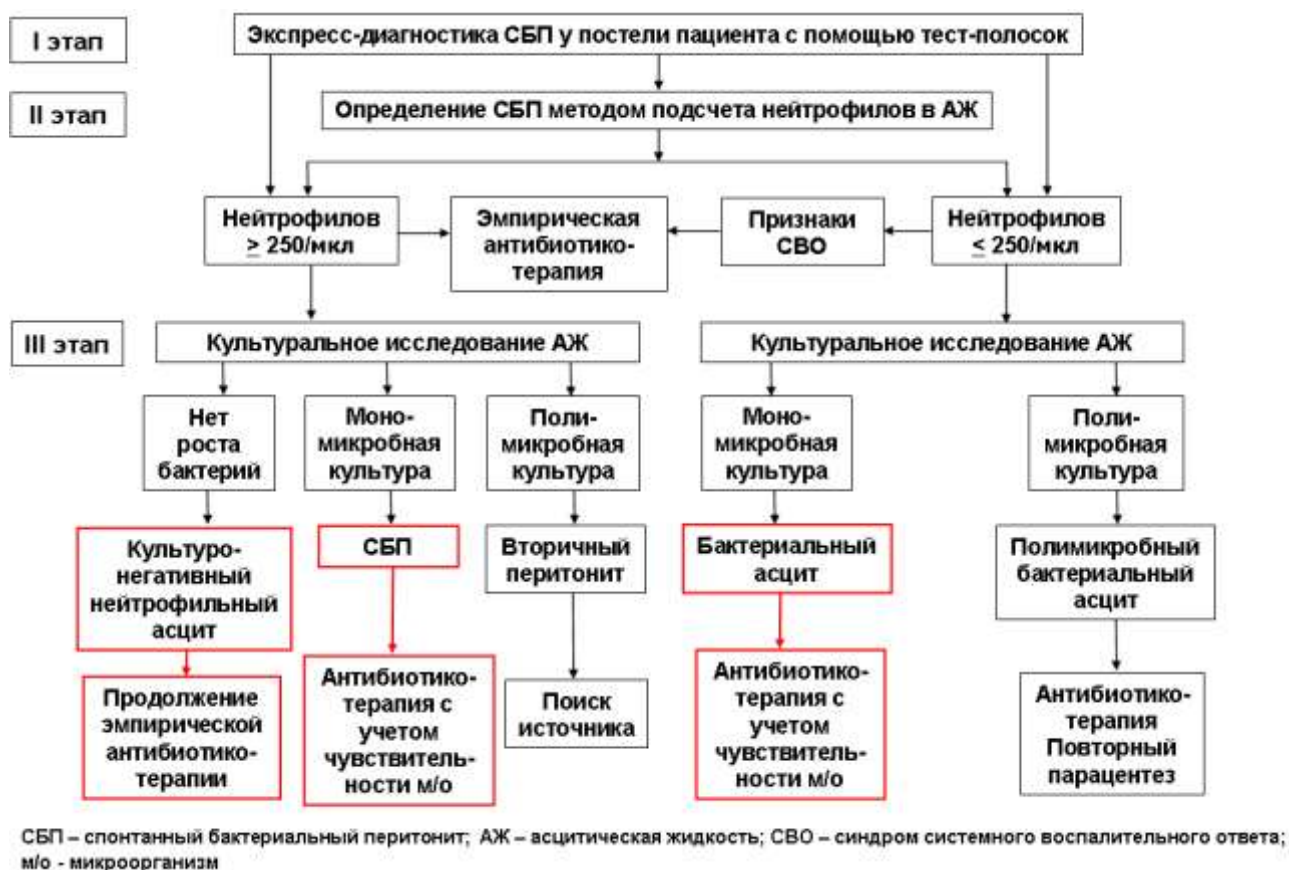


Рисунок – Алгоритм диагностики спонтанного бактериального перитонита и его вариантов

Необходимо отметить, что на этапе оказания первичной помощи для диагностики СБП и назначения эмпирической антибиотикотерапии достаточно выполнения исследования числа нейтрофилов с помощью тест-полосок. В случае проведения диагностического поиска на уровне специализированной и квалифицированной помощи требуется выполнение всех этапов алгоритма или начало исследования со II этапа (минуя этап экспресс-диагностики с помощью тест-полосок).

Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении и пути их устранения

1. При повышении рН и низкой осмолярности АЖ ускоряется лизис лейкоцитов – это приводит к быстрому уменьшению их количества, а через 2–3 ч практически полному разрушению, что может стать причиной

ложноотрицательного результата при подсчете нейтрофилов АЖ. В связи с этим рекомендуется немедленное направление АЖ на цитологическое исследование после проведения диагностического парацентеза. Определение нейтрофилов с помощью тест-полосок возможно даже в случае их лизиса.

2. Определенную сложность представляет подсчет и определение нейтрофилов при геморрагическом характере АЖ (эритроцитов $>10\ 000/\text{мкл}$). В таком случае при подсчете нейтрофилов в счетной камере необходима корректирующая поправка – от полученного количества нейтрофилов вычитают 1 нейтрофил на 250 эритроцитов. При использовании тест-полоски для определения нейтрофилов в АЖ геморрагического характера достаточно предварительно подвергнуть образец АЖ центрифугированию в пробирке в течение 10 мин. при 1500 об/мин. После этого в образовавшуюся надосадочную область образца АЖ погружают тест-полоску, результат оценивают через 2 мин.

3. При изучении цитоза с помощью автоматического гематологического анализатора не всегда представляется возможным определение количества нейтрофилов АЖ при относительно низких, но патологических уровнях нейтроцитоза в АЖ ($<500\ \text{кл}/\text{мкл}$). В таком случае необходимо дублировать исследование содержания нейтрофилов микроскопическим способом.

ОБОСНОВАНИЕ ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АЛГОРИТМА ДИАГНОСТИКИ СПОНТАННОГО БАКТЕРИАЛЬНОГО ПЕРИТОНИТА У БОЛЬНОГО ЦИРРОЗОМ ПЕЧЕНИ С АСЦИТОМ

Спонтанный бактериальный перитонит (СБП) – инфекционный асцит в отсутствие интраабдоминального или хирургически леченного источника инфекции (вторичный бактериальный перитонит) – является результатом инфицирования асцитической жидкости во время эпизодов транзиторной бактериемии на фоне снижения иммунитета [1, 2, 3]. Частота СБП у госпитализированных больных циррозом печени составляет 10–30%, в то время как у амбулаторных больных значительно меньше – около 3,5% [4]. Основным механизмом развития СБП – бактериальная транслокация микроорганизмов из просвета кишечника в мезентериальные лимфатические узлы, а затем и в системный кровоток, асцитическую жидкость. В качестве факторов риска называют выраженные нарушения функции печени, класс тяжести цирроза С, низкий уровень белка в асцитической жидкости (<10 г/л) [1]. Летальность при СБП составляет 30–50%. После перенесенного эпизода СБП сохраняется риск рецидивов: в течение года он составляет около 70% [5]. Наличие СБП у больного циррозом печени является показанием к неотложному назначению антибактериальных препаратов [2].

При циррозе печени проявления СБП трудно диагностируются в связи с неспецифическими клиническими признаками, а иногда и полным их отсутствием. Для диагностики и контроля проводимой антибактериальной терапии СБП проводят исследование асцитической жидкости. При наличии симптомов и/или лабораторных признаков, указывающих на развитие инфекции, обязательны повторные исследования асцитической жидкости.

Диагностические критерии СБП (определенный диагноз) [3]:

- положительный результат анализа асцитической жидкости (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pneumococcus*) может быть получен до появления нейтрофильного ответа;

- повышение абсолютного содержания нейтрофилов в асцитической жидкости (≥ 250 нейтрофилов/ мм^3);
- отсутствие очевидного интраабдоминального или хирургически леченного источника инфекции.

Диагностические критерии СБП (предположительный диагноз):

- отрицательные результаты анализа асцитической жидкости;
- содержание ≥ 250 нейтрофилов/ мм^3 асцитической жидкости;
- лихорадка, озноб, боли в животе, напряжение передней брюшной стенки, уменьшение перистальтических звуков.

Наиболее достоверным способом диагностики СБП и выбора лечения является микробиологическое исследование асцитической жидкости. Недостатками этого способа является длительность получения результатов, трудность анаэробного культивирования.

В литературе описан способ выявления СБП на основании определения в асцитической жидкости количественного и качественного состава короткоцепочечных жирных кислот (уксусной, пропионовой, изомаляной и др.), которые являются метаболитами анаэробной и аэробной микрофлоры [6]. Метод позволяет не только определить инфицированность асцитической жидкости, но и верифицировать микробный состав. Недостатками являются – относительность результатов (связаны с метаболической активностью микрофлоры), потеря 15–20% метаболитов в процессе подготовки проб.

Цитологическое исследование асцитической жидкости с подсчетом количества лейкоцитов [4, 7] имеет ограничения в применении в выходные дни и ночные часы, в некоторых случаях результаты лабораторных исследований могут приходиться только на следующий день, что приводит к позднему назначению антибактериальной терапии и прогрессированию симптомов СБП.

В качестве альтернативы подсчету лейкоцитов с помощью микроскопии предлагается определение лактоферрина в асцитической жидкости. Уровень лактоферрина в биологических жидкостях увеличивается пропорционально

количеству лейкоцитов. Однако имеющиеся данные об эффективности метода ограничены одним исследованием [8]. Кроме того, исследование имеет высокую стоимость.

Предлагаемый способ экспресс-диагностики СБП у больного циррозом с помощью тест-полосок позволяет относительно просто обнаруживать лейкоциты в асцитической жидкости. Полученный положительный результат (≥ 250 нейтрофилов/ мм^3 асцитической жидкости) является основным критерием назначения антибактериального лечения.

Таким образом, предлагаемый алгоритм диагностики СБП у больного циррозом печени с асцитом с использованием тест-полосок для экспресс-диагностики позволит в ранние сроки установить или предположить диагноз СБП и своевременно назначить лечение.

Литература:

1. Koulaouzidis, A. Spontaneous bacterial peritonitis / A. Koulaouzidis, S. Bhat, A.A. Saeed // *World J. Gastroenterol.* – 2009. – Vol. 15. – P. 1042–1049.
2. EASL clinical practice guidelines on the management of ascites, spontaneous bacterial peritonitis, and hepatorenal syndrome in cirrhosis // *J. Hepatol.* – 2010. – Vol. 53. – P. 397–417.
3. Wong F., Bernardi M., Balk R. et al. Sepsis in cirrhosis: report on the 7th meeting of the International Ascites Club // *Gut.* – 2005. – Vol. 54. – P. 718–725.
4. Riggio, O. Accuracy of the automated cell counters for management of spontaneous bacterial peritonitis / O. Riggio, S. Angeloni, A. Parente et al. // *World J. Gastroenterol.* – 2008. – Vol. 14. – P. 5689–5694.
5. Tandon P., Garcia-Tsao G. Bacterial infections, sepsis, and multiorgan failure in cirrhosis // *Semin. Liver Dis.* – 2008. – Vol. 28. – P. 26–42.
6. Патент РФ 2002122771/15. Способ определения инфицированного выпота брюшной полости и способ лечения заболеваний, сопровождающихся выпотом в брюшную полость/ М.Д. Ардатская, О.Н. Минушкин, Н.С. Иконников // Приоритет от 26.08.2002г.

7. Методы клинических лабораторных исследований под ред. проф. В.С. Камышникова – Минск «Белорусская наука» – 2002. – С. 737.

8. Parsi, M. Ascitic fluid lactoferrin for diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis / M. Parsi, S. Saadeh, N. Zein et al. // Gastroenterology. – 2008 – Vol. 135. – P. 803–807.

Доцент кафедры внутренних болезней №1 с курсом гематологии УО «Гомельский государственный медицинский университет», кандидат медицинских наук

Е.Г. Малаева

Ассистент кафедры пропедевтики внутренних болезней УО «Гомельский государственный медицинский университет»

Д.И. Гавриленко

Профессор кафедры общей врачебной практики ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», доктор медицинских наук, профессор

Н.Н. Силивончик

Доцент 3-й кафедры внутренних болезней УО «Белорусский государственный медицинский университет», кандидат медицинских наук, доцент

Е.И. Адаменко

Заведующая отделением гастроэнтерологии ГУЗ «Гомельская городская клиническая больница №3»

Л.А. Кобрусева

Заведующий отделением лучевой диагностики ГУЗ «Гомельская городская клиническая больница №3»

Ю.П. Шпаковский

Заведующая клинико-диагностической
лабораторией ГУЗ «Гомельская городская
клиническая больница №3»

Е.В. Шулькина

Заведующий клинико-диагностической
лаборатории ГУ «Республиканский научно-
практический центр радиационной
медицины и экологии человека»

А.С. Прокопович

Врач-бактериолог клинико-
диагностической лаборатории ГУ
«Республиканский научно-практический
центр радиационной медицины и экологии
человека»

Н.И. Шевченко