



Медицинский алфавит
Серии научно-практических рецензируемых журналов

15
(231)
2014

Современная ЛАБОРАТОРИЯ

№3

Modern Laboratory

MEDICAL ALPHABET Russian Professional Medical Journal



- Фундаментальные основы лабораторной медицины
- Разработка, производство, технологии
- Лабораторное оборудование
- Реагенты
- Новые методы
- Практика
- Экспресс-диагностика
- Организация лабораторной службы
- Конгрессы и конференции

Наш индекс в каталоге
«РОСПЕЧАТЬ» 36228

www.medalfavit.ru

Можно ли увидеть „отпечаток пальцев“ бактерии?



MALDI Biotyper

- Штамм-специфическая экспресс-идентификация
- Легкость управления: результат от трех нажатий кнопки мыши
- Простота анализа: один протокол для всех видов бактерий
- Пополняемая библиотека масс-спектров, готовая к использованию

Новейшая система MALDI BioTyper™ предлагает микробиологам уникальный и гибкий подход к определению микроорганизмов: экспресс-идентификация бактерий с помощью одного простого анализа. Обширная, готовая к использованию библиотека масс-спектров позволяет точно идентифицировать любые штаммы по их белковым профилям в автоматическом режиме. Идентифицируйте и классифицируйте микроорганизмы по их характеристичному молекулярному профилю — индивидуальному „отпечатку пальцев“ для надежной дифференциации бактериальных штаммов.

Для получения более подробной информации и демонстрации систем обращайтесь к нам!

www.bruker.com

ООО „Брукер“

г. Москва

8(495) 517-9284

8(495) 517-9285

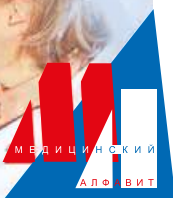
г. Новосибирск

8(383) 319-0789

8(383) 333-2241

ms@bruker.ru

MALDI-TOF MS



Современная лаборатория №3 Медицинский алфавит

Серия журналов для специалистов

№ 15 (231) 2014

www.medalfavit.ru

Издатель: издательство медицинской литературы ООО «Альфмед»
Тел.: (495) 616-48-00
E-mail: medalfavit@mail.ru

Учредитель и главный редактор
издательства **Т. В. Синица**

Почтовый адрес редакции:
129344, г. Москва, ул. Верхоянская, д. 18, к. 2
Тел.: (495) 616-48-00, 221-76-48
E-mail: medalfavit@mail.ru

Главный редактор серии журналов
«Медицинский алфавит»

А. С. Ермолов

Редационный совет журнала «Медицинский алфавит»

В. Г. Акимкин, д.м.н., проф.
А. Ж. Гильманов, д.м.н., проф.
Е. А. Евдокимов, д.м.н., проф.
А. С. Ермолов, д.м.н., проф.
А. А. Кулаков, д.м.н., проф.
Р. Г. Оганов, д.м.н., проф.
В. И. Покровский, д.м.н., проф.
С. А. Рабинович, д.м.н., проф.
В. Е. Синицын, д.м.н., проф.
С. К. Терновой, д.м.н., проф.
Н. В. Шестопалов, д.м.н., проф.
С. Н. Щербо, д.м.н., проф.

Председатель редакционного совета
журнала «Медицинский алфавит»
серии «Современная лаборатория»:

С. Н. Щербо

Руководитель отдела рекламы
и маркетинга: **Ю. В. Попов**
medalfavit@bk.ru

Руководитель отдела продвижения,
распространения и выставочной
деятельности **Ирина Синица**
medalfavit_pr@mail.ru

Редакция оставляет за собой право
сокращения и стилистической правки текста
без дополнительных согласований с авторами.
Мнение редакции может не совпадать
с точкой зрения авторов опубликованных
материалов.

Редакция не несет ответственности
за последствия, связанные с неправильным
использованием информации.

Журнал зарегистрирован Министерством РФ
по делам печати, теле-, радиовещания
и средств массовых коммуникаций.
Рег. номер ПИ № 77-11514 от 04.01.2002
Уст. тираж 12000. Формат А4.
Цена договорная.

При перепечатке ссылка на журнал «МА»
обязательна. За содержание рекламы
ответственность несет рекламодатель.
За достоверность сведений, изложенных
в статьях, ответственность несет автор.

Наш индекс в каталоге «РОСПЕЧАТЬ»
36228 (комплект)

e-mail: medalfavit@mail.ru

Содержание

- 7 **Есть ли будущее у специальности «врач клинической лабораторной диагностики»?** Дискуссия
А. Г. Кочетов, О. В. Островский, В. С. Берестовская, А. В. Ильин, М. А. Годков
- 12 **Маркеры активации свертывания крови у амбулаторных больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями, получающих антикоагулянтную терапию**
О. О. Белявская, Т. В. Вавилова
- 17 **Основные требования к методу определения гликированного гемоглобина**
М. Г. Морозова, В. С. Берестовская, Е. С. Ларичева
- 21 **К вопросу о применении коммерческих транспортных сред для взятия патологического материала при обследовании на дифтерию**
О. Ю. Борисова, И. А. Чагина, Н. Т. Гадуа
- 25 **Опыт применения анализатора мочи UF-1000i Sysmex с технологией проточной цитофлуорометрии: быстрое получение результата, повышение клинической значимости анализа и существенный экономический эффект**
Л. И. Станкевич
- 32 **Оценка клеточного компонента биотрансплантатов с помощью витального окрашивания**
М. С. Макаров, В. Б. Хватов, О. И. Коношко, М. В. Сторожжева, Н. В. Боровкова, И. Н. Пономарев
- 36 **Как измерить преаналитическое качество: алгоритм оценки и мониторинга**
Е. В. Тиванова
- 36 **Эффективность работы и перспективы развития диагностических служб регионов России обсудили на пресс-завтраке ассоциации IMEDA**
- 40 **Выявление антинуклеарных антител: международные рекомендации и собственный опыт**
С. В. Лапин, А. В. Мазинг, Т. В. Булгакова, О. С. Напалкова, М. Ю. Первакова, И. С. Холопова, А. Л. Маслянский, А. А. Толоян
- 48 **Анализ холестерина ЛПНП — 80 лет совершенствования. Итог: клиническое решение зависит от выбора аналитической процедуры?**
О. В. Островский, В. Е. Веровский, Д. Н. Лучинин, Н. П. Мурзина
- 51 **Роль микробиологической службы в обеспечении эффективной антибиотикотерапии на современном этапе**
М. С. Поляк
- 56 **Молекулярно-генетическая методика оценки риска неблагоприятного течения заболевания при поверхностном раке мочевого пузыря**
О. В. Синицына, А. А. Чанкина, М. В. Илюшкина, Д. В. Долгих
- 58 **Морфологическая диагностика новообразований гепатопанкреатобилиарной зоны на материале тонкоигольной аспирационной биопсии**
И. Н. Костючек, О. Л. Василёва, С. Л. Воробьев, Е. Г. Солоницын
- 60 **Поиск новых маркеров иммунологической эффективности высокоактивной антиретровирусной терапии при ВИЧ-инфекции**
И. В. Решетников, В. Э. Цейликман
- 63 **Опыт внедрения системы менеджмента качества в медицинской лаборатории многопрофильной клиники на примере использования ЛИС**
И. Ю. Трегубов, Н. Ю. Голикова
- 64 **О повышении качества коагуляционных тестов**
М. В. Кутепов
- 68 **Подписка**

Contents

- 7 *Future of the specialty physician clinical laboratory. Discussion*
A. G. Kochetov, O. V. Ostrovsky, V. S. Berestovskaya, A. V. Ilin, M. A. Godkov
- 12 *Coagulation activation markers of outpatients with cardiovascular diseases receiving anticoagulants*
O. O. Belyavskaya, T. V. Vavilova
- 17 *The main requirements for the method measurement HbA1c*
M. G. Morozova, V. S. Berestovskaya, E. S. Laricheva
- 21 *Use of commercial transport media for the pathological material sample for examination of diphtheria*
O. Y. Borisova, I. A. Chagina, N. T. Gadua
- 25 *Experience of using UF-1000i Sysmex urine analyzer with a method of flow cytometry: improving the clinical significance of results, faster diagnosis and significant economic effect*
L. I. Stankevich
- 32 *Evaluation cellular component biotransplantat using vital staining*
M. C. Makarov, V. B. Khatov, O. I. Konyushko, M. V. Storozheva, N. V. Borovkova, I. N. Ponomarev
- 36 *Preanalytical Quality: how to measure? Practical recommendation*
E. V. Tivanova
- 39 *Performance and prospects for the development of diagnostic services in the Russian regions were discussed at Association IMEDA press luncheon*
- 40 *Detection of antinuclear antibodies: international recommendations and own experience*
S. V. Lapin, A. V. Mazing, T. V. Bulgakova, O. S. Napalkova, M. Yu. Pervakova, I. S. Kholopova, A. L. Maslyansky, A. A. Tolyan
- 48 *Analysis of LDL-cholesterol — 80 years of cultivation. Bottom line: a clinical decision depends on the choice of the analytical procedure?*
O. V. Ostrovskiy, V. E. Verovskiy, D. A. Luchinin, N. P. Murzina
- 51 *The role of bacteriological service in providing the effective antibiotic therapy today*
M. S. Polyak
- 56 *Molecular-genetic technique of the risk estimation for the adverse current of disease at superficial bladder carcinoma*
O. V. Sinitsina, A. A. Chankina, M. V. Iliushkina, D. V. Dolgikh
- 58 *Morphological diagnosis of hepatopancreatobiliary malignancies on fna-biopsy*
I. N. Kostyuchek, O. L. Vasileva, S. L. Vorobyev, E. G. Solonitsyn
- 60 *The search of new markers of immunological efficiency of highly active antiretroviral therapy at HIV-infection*
I. V. Reshetnikov, V. E. Tseilikman
- 63 *Experience in implementation of quality management system in multi-field hospital medical laboratory using Laboratory Information System*
I. Yu. Tregubov, N. Yu. Golikova
- 64 *About improving the quality of coagulation tests*
M. V. Kutepov
- 68 *Subscription*

С 2011 года журнал «Медицинский алфавит» включен в Научную электронную библиотеку и Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), имеет Импакт-фактор.

Редакционная коллегия

Вавилова Татьяна Владимировна, д.м.н., проф., зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики и генетики ФГБУ «Федеральный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

Гильманов Александр Жанович, д.м.н., проф., вице-президент Российской ассоциации медицинской лабораторной диагностики, зав. кафедрой биохимии и лабораторной диагностики ГОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет», г. Уфа

Годков Михаил Андреевич, д.м.н., врач высшей категории, рук. отдела лабораторной диагностики ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского», г. Москва

Долгих Татьяна Ивановна, д.м.н., проф., зав. центральной научно-исследовательской лабораторией и руководитель академического центра лабораторной диагностики Омской государственной медицинской академии, г. Омск

Жуковский Александр Васильевич, д.м.н., проф., начальник отдела трансляционной медицины и бионотехнологии ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования», г. Москва

Косырев Александр Борисович, к.м.н., доцент кафедры биохимии ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования», г. Москва, ген. директор ООО ТПО «Медиолаб», г. Москва

Падюков Леонид Николаевич, проф. отделения ревматологии медицинского отдела Каролинского института, Стокгольм, Швеция

Первухин Юрий Владиславович, к.м.н., проф., зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики с курсом бактериологии ГБОУ ВПО «Ставропольский государственный медицинский университет», г. Ставрополь

Тарасенко Ольга Анатольевна, д.м.н., проф., зам. генерального директора ФГБУ ВНИИИМТ Росздравнадзора, врач высшей квалификационной категории

Терёхина Наталья Александровна, д.м.н., проф., зав. кафедрой биохимии Пермской государственной медицинской академии им. акад. Е.А. Вагнера, г. Пермь

Шипулин Герман Александрович, к.м.н., рук. отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, г. Москва

Щербо Сергей Николаевич, д.м.н., проф., вице-президент Российской ассоциации медицинской лабораторной диагностики, зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова», г. Москва

Эмануэль Владимир Леонидович, д.м.н., проф., зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины, директор научно-методического центра Минздрава России по молекулярной медицине на базе СПбГМУ им. И.П. Павлова, вице-президент Российской ассоциации медицинской лабораторной диагностики, гл. специалист-эксперт по клинической лабораторной диагностике Росздравнадзора по Северо-Западному федеральному округу, г. Санкт-Петербург

Editorial Board

Vavilova T. V., MD, DMSci, professor North-Western State Medical University n. a. I. I. Mechnikov, St. Petersburg

Gilmanov A. V., MD, DMSci, professor, Bashkir State Medical University, Ufa

Godkov M. A., MD, DMSci, Research Institute of Emergency Medicine n. a. N. V. Sklifosovsky, Moscow

Dolgih T. I., MD, DMSci, professor, Omsk State Medical Academy, Omsk

Zhukotsky A. V., MD, DMSci, professor, Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow

Kosirev A. B., PhD, associate professor, Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Mediolab, Moscow

Padyukov L. N., professor of Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

Pervushin Y. N., PhD, professor, Stavropol State Medical University, Stavropol

Tarasenko O. A., MD, DMSci Hygiene and Epidemiology Centre, Moscow

Terekhina N. A., MD, DMSci, professor, Perm State Medical Academy n. a. acad. E. A. Wagner, Perm

Shipulin G. A., PhD, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow

Scherbo S. N., MD, DMSci, professor, Russian National Research Medical University n. a. N. I. Pirogov, Moscow

Emanuel V. L., MD, DMSci, professor, First State Medical University of St. Petersburg n. a. I. P. Pavlov, St. Petersburg

ВНИМАНИЮ АВТОРОВ НАШЕГО ИЗДАНИЯ!

Важная информация о форме цитирования материалов, опубликованных в журналах серии «Медицинский алфавит»

В связи с требованием РИНЦ об унификации цитирования ссылки на материалы журнала следует оформлять в строгом соответствии с указанным образцом:

Фамилия И. О. Название статьи. // Медицинский алфавит. — Год. — Том X, № X. — С. XX–XX.

Например: *Имельбаева Э. А., Гильманов А. Ж. Особенности эритроцитарных антигенов // Медицинский алфавит. — 2014. — Том 2 («Современная лаборатория»), № 12. — С. 14–18.*

Вопросы об оформлении ссылок направляйте, пожалуйста, по адресу medalfavit@mail.ru.

30 августа 2014 года на 84-м году жизни скончался председатель правления общероссийского Научно-практического общества специалистов лабораторной медицины, главный редактор журнала «Клиническая лабораторная диагностика», заведующий лабораторией проблем клинико-лабораторной диагностики Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, лауреат Государственной премии СССР, премий Г.Ф. Ланга и С.П. Боткина, заслуженный деятель науки Российской Федерации, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАЕН

Вадим Владимирович Меньшиков

Вадим Владимирович Меньшиков родился 12 февраля 1931 года в Москве в семье врача и инженера. За свою трудовую жизнь он прошел долгий путь: от студента, а затем ординатора и аспиранта кафедры госпитальной терапии 1 ММИ, до кандидата и доктора медицинских наук, профессора той же кафедры, работал под руководством выдающегося терапевта, академика А.Л. Мясникова. В 1961 году он создал и до 1965 года возглавлял гормональную лабораторию в составе клиники госпитальной терапии, затем ставшую межклинической.

С 1974 по 1980 годы Вадим Владимирович — проректор по научной работе 1 ММИ, с 1980 по 1986 годы — ректор и заведующий кафедрой биохимии Государственного Центрального института физической культуры Госкомспорта СССР. С 1986 по 1987 гг. — директор Центрального НИИ медико-биологических проблем спорта.

С 1987 по 1988 гг. — заместитель председателя Исполкома Московского городского Совета депутатов трудящихся по вопросам образования, здравоохранения, социального обеспечения, физкультуры и спорта.

С 1988 по 1999 гг. — первый заместитель председателя правления Советского, затем Международного фонда милосердия и здоровья, председатель координационного совета, генеральный директор исполнительной дирекции фонда.

С 1993 года до последних дней Вадим Владимирович возглавлял лабораторию проблем клинико-лабораторной диагностики Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (до 2010 — ММА им. И.М. Сеченова), с 1995 года — Общероссийскую общественную организацию «Научно-практическое общество специалистов лабораторной медицины» (до 2011 г. — Научное общество специалистов клинической лабораторной диагностики). Как председатель общества он до последних дней вел колоссальную работу по повышению профессионального уровня специалистов.

Его научная деятельность во многом определила пути и направления развития лабораторной медицины как одного из важнейших разделов здравоохранения страны. Идеи и разработки Вадима Владимировича становились приказами и стандартами, ведущими вперед Российскую лабораторию.

Вадим Владимирович являлся одним из основателей и с 1968 года главным редактором журнала «Клиническая лабораторная диагностика».

Заслуги Вадима Владимировича были высоко оценены государством. Он награждён орденом Трудового Красного Знамени, орденом Дружбы Народов, орденом Знак Почёта и многими медалями.

В.В. Меньшиков был разносторонне образованным и одаренным человеком. Его отличительными



чертами были скромность, демократичность, чуткость и внимательность к людям. В.В. Меньшиков пользовался заслуженным авторитетом и большим уважением со стороны всех, кто работал и общался с ним. В памяти соратников, учеников и коллег — всех, кто имел честь его знать, Вадим Владимирович Меньшиков останется сильным и мудрым человеком. Он всегда шел в ногу со временем, остро чувствовал перспективные и актуальные направления развития медицины. Его отличали глубокая преданность науке, творческая энергия и завидная работоспособность. Его книги и статьи вызывали и вызывают неиссякаемый интерес у отечественных и зарубежных специалистов.

Коллеги, друзья и ученики всегда будут помнить Вадима Владимировича Меньшикова.

Светлая ему память!

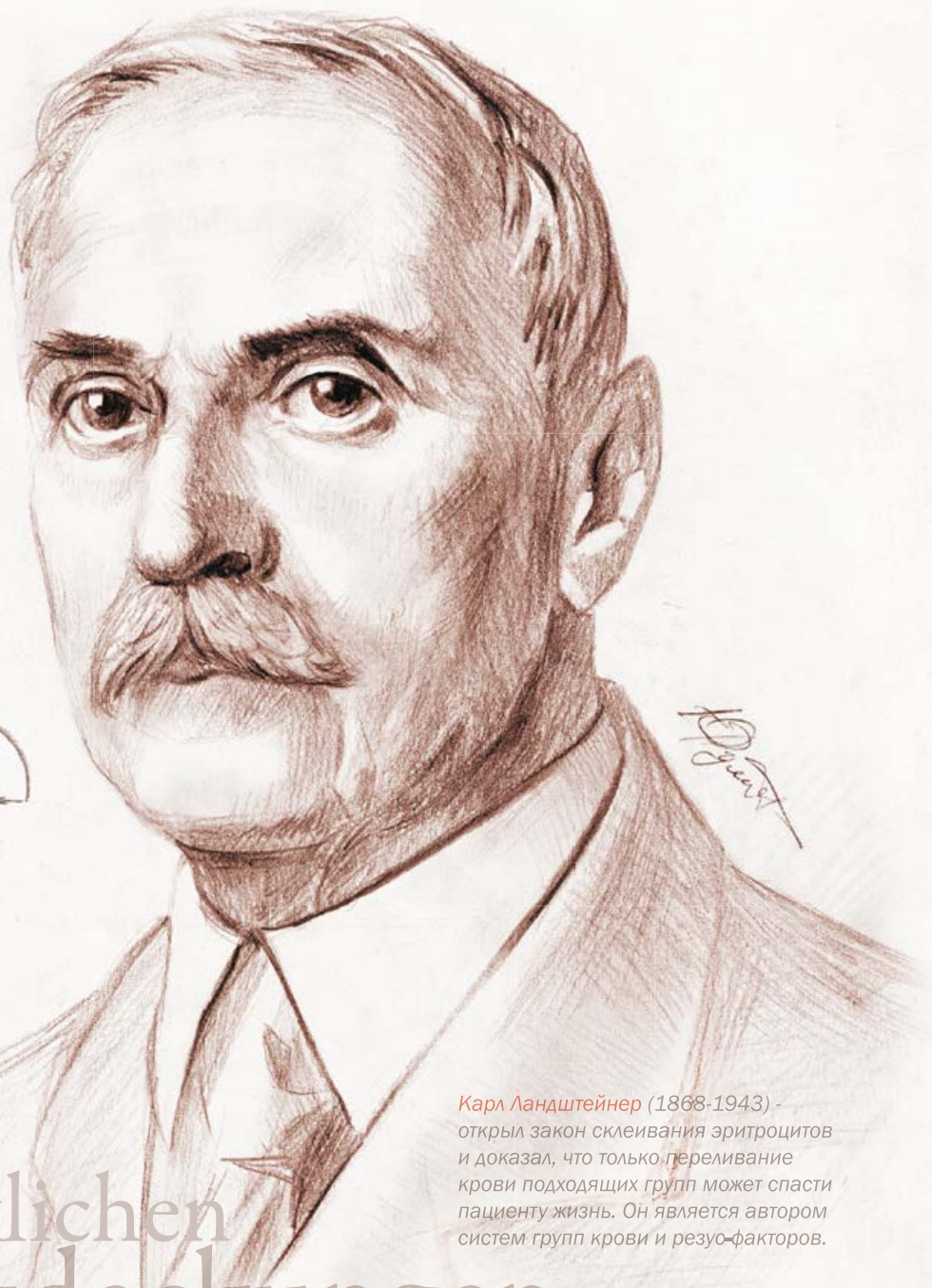
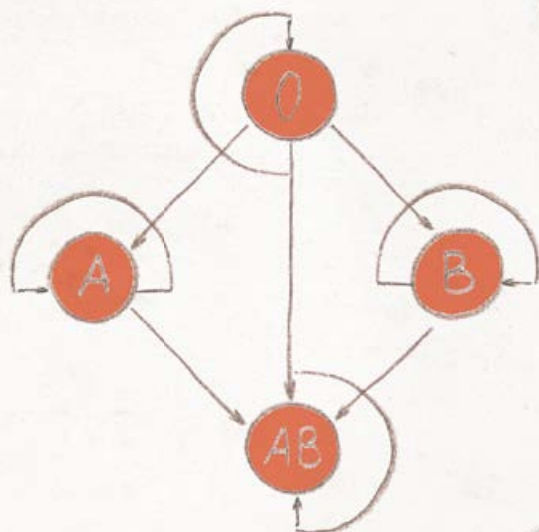
Уважаемые коллеги! Коллектив журнала «Медицинский алфавит» серии «Современная лаборатория» скорбит, что ушел из жизни наш друг и соратник. В.В. Меньшиков. Мы будем помнить его, как человека интеллигентного, высокообразованного, эрудированного и очень доброго. Для нашего издательства В.В. Меньшиков много сделал с момента основания журнала. Он активно способствовал становлению и развитию научной составляющей нашего журнала и нам всегда хотелось равняться на высокий уровень, заданный его работами.

Мы благодарны Вадиму Владимировичу за его многолетнюю работу по формированию в стране эффективной лабораторной службы.

Синицка Татьяна Владимировна



ОЛЬВЕКС
ДИАГНОСТИКУМ



Карл Ландштейнер (1868-1943) - открыл закон склеивания эритроцитов и доказал, что только переливание крови подходящих групп может спасти пациенту жизнь. Он является автором систем групп крови и резус-факторов.

Wir verwirklichen
die Entdeckungen
Воплощаем научные открытия

ООО "ОЛЬВЕКС ДИАГНОСТИКУМ"
(812) 412-6546, 412-5185, 412-8380
Сайт: Olvex.ru

Биохимические наборы.
Лабораторное оборудование.
Производство. Реализация.

Есть ли будущее у специальности «врач клинической лабораторной диагностики»?

Future of the specialty physician clinical laboratory. Discussion

A. G. Kochetov, O. V. Ostrovsky, V. S. Berestovskaya, A. V. Ilin, M. A. Godkov

В рамках XIX Всероссийской научно-практической конференции «Консолидация науки и практики в лабораторной медицине», прошедшей 25–27 марта 2014 года в КРОКУС-Экспо, состоялась дискуссия «Есть ли будущее у специальности «врач клинической лабораторной диагностики»?

Выбранная тема дискуссии обусловлена двумя глобальными тенденциями, наблюдаемыми в лабораторной медицине:

1. глубокой автоматизацией выполняемых аналитических процессов, вплоть до полного исключения участия медицинского персонала в производственном цикле;
2. существенным усложнением интерпретации получаемых результатов исследований вследствие многократного расширения спектра тестируемых параметров организма пациента и резкого увеличения данных о патофизиологических процессах, обуславливающих течение конкретной патологии у данного пациента.

Какова сегодняшняя роль врача клинической лабораторной диагностики в лечебно-диагностическом процессе? Кем и как она регламентируется? Где и у кого следует обучаться? — вот неполный перечень вопросов, стоящих на сегодняшний день перед специалистами лабораторной медицины.



А. Г. Кочетов



О. В. Островский



В. С. Берестовская



А. В. Ильин



М. А. Годков

Участники дискуссии:

А. Г. Кочетов, д.м.н., проф., гл. внештатный специалист по клинической лабораторной диагностике Минздрава России

О. В. Островский, д.м.н., проф., зав. кафедрой теоретической биохимии с курсом клинической биохимии ВолГМУ (г. Волгоград)

В. С. Берестовская, к.м.н., доцент кафедры клинической лабораторной диагностики, СЗГМУ им. И.И. Мечникова, (г. Санкт-Петербург)

А. В. Ильин, врач высшей категории, зав. клинко-диагностической лабораторией Эндокринологического научного центра Минздрава России (г. Москва)

Ведущий:

М. А. Годков, д.м.н., проф.

Вопросы для обсуждения

1. Вытеснят ли современные автоматизированные комплексы врача КЛД из диагностического процесса?
2. Чем будут заниматься врачи КЛД в эпоху всеобщей роботизации? Умирает или обретает новую значимость профессия врача КЛД? Машина или специалист?

Островский О. В. — Область знаний, которой мы занимаемся — клиническая лабораторная диагностика. Наша специальность имеет два направления: лабораторная аналитика и клиническая диагностика. Все, что мы делаем, основано на так называемых патологиях, и это является тем базисом, на котором мы строим свои умозаключения, проводим исследования и т.д. Здесь я бы хотел обратить ваше внимание на такой нюанс: нашу лабораторную аналитику мы воплощаем в клиническую диагностику, что является главной задачей. Этот комплекс приводит к появлению нашей специальности.

В тоже время врачи-клиницисты считают, что диагностику обеспечивают именно они. И дальше очень важный момент: кто кому и что открывает.

Клиницисты хотят, чтобы клиническая лабораторная диагностика, как параклиническая дисциплина, ушла из области лечебных дисциплин. Однако, мне кажется, что тот рубеж, который врачи клинической лабораторной диагностики отдавать не должны, заключается именно в принятии клинического решения. Хотя сейчас «документально» это стоит достаточно далеко от нас.

Большая проблема в образовании. Тем, кто заканчивал медицинские вузы, я могу задать вопрос: назовете ли вы хоть один предмет в медицинском образовании, в котором бы было слово «диагностика»? Я знаю только один — это «лучевая диагностика». Диагностика и лечение — это две стороны лечебного процесса. Но вот терапия есть (хирургические болезни, клиническая

фармакология и т.д.), а что касается диагностики — только лучевая и все! Врачи выпускаются, имея о диагностике очень сумбурное впечатление.

Пример: публикация в журнале американского кардиологического общества за 2009 год. В этой статье один из известнейших экспертов по тропонину Роберт Джейси публикует свой взгляд на историю тропонинов и на развитие проблемы тропонинов в истории. Вывод или ключевая фраза, которую он приводит: «когда тропонин был паршивым анализом, это был замечательный тест, но теперь, когда он становится замечательным анализом, он превращается в паршивый тест». Обратите внимание, между аналитикой и диагностикой имеется большое противоречие и это противоречие преодолеваем мы,

врачи клинической лабораторной диагностики. Поэтому, без всякого сомнения, это медицинская специальность, и она должна всегда так звучать.

Еще один пример, как осуществляется анализ данных в информатике и других естественных науках. Мы отлично знаем, что самые лучшие данные — это количественные, которые мы получаем в лабораториях. Любые данные, которые мы переводим из количественных в качественные, всегда чреваты потерей информативности и этого следует избегать. Однако, что происходит в клинической лабораторной диагностике — у нас есть своя методология. И каким образом эта методология звучит — что такое болезнь?

Болезнь — это самобытность симптомов. Симптомы всегда качественные, и отсюда появляется клиническая лабораторная диагностика. Очень интересный момент — перевод количественных изменений в качественные (если читать Флетчера, у него это называется упрощение данных), необходимо упрощение данных с выделением этих симптомов, и уже на отставании этих симптомов получается определение болезни. Данные эти получаются качественные, количественные и порядковые. Дальше проводится анализ данных с выделением симптомов, и на обнаруженных симптомах ставится диагноз.

Задача клинической лабораторной диагностики — измерить уровень или получить симптом? Это достаточно философский вопрос. Это одна из причин наших бесконечных споров с метрологами. Они измеряют величины, а мы с вами ищем симптомы.

Еще один пример. В аудитории знают, что липопротеиды низкой плотности — это основной фактор риска из всего липидного обмена. При интерпретации липидного профиля надо ориентироваться на показатель липопротеидов низкой плотности. В чем состоит неприятность, связанная с этим методом? В том, что мы чаще всего используем для расчетов так называемую формулу Фридвальда. Мы вычитаем из общего холестерина холестерин, который содержится в липопротеидах очень низкой плотности и в высокой плотности, и в результате получаем цифру холестерина липопротеида низкой плотности. Фридвальд предложил это в 70–80-х годах, и с тех пор мы пользуемся этой формулой.

Но сложность в том, что хиломикроны плохо определяются. Необходимо определять триглицериды. Триглицериды необходимо определять натошак. И вообще формула Фридвальда работает только тогда, когда триглицеридов достаточно низкое количество в крови. Когда триглицериды повышаются, а это случается после каждого приема пищи, то сразу исследование проводить нельзя. Естественно, это неудобно при профосмотрах. Мы должны всегда брать тощакую кровь, и это требует подготовки больного, что не всегда возможно. В связи с этим в последние годы были введены методы прямого определения липопротеидов низкой плотности, и сейчас практически все производители выпускают наборы для автоматических анализаторов для прямого определения показателя липопротеидов низкой плотности.

Работа, которую я сейчас привел в примере — это работа 2009 года, которая сравнивает определения холестерина новыми прямыми методами с расчетами формулы Фридвальда. В заключение работы сказано, что прямой анализ — это хорошо и удобно, но есть недостатки: нижняя концентрация при прямом анализе может привести к интерпретационным проблемам.

Мы провели подобные исследования, которые опубликованы в 2012 году. Исследования дали результат, что если показатель выше 3,5 — эти большие обязательно должны, по стандарту, получать статины, симвостатины или какой-то другой из статинов. Однако по Фридвальду из 1 тысячи выбранных положительный результат у 489 человек, а при прямом методе — у 247. Разница показателей практически в два раза. Немного поменяла технология, а на сколько это повлияло на принятие конечного клинического решения — принимать статины или не принимать?

Чтобы ответить на вопрос, что правильно, нужно быть врачом клинической лабораторной диагностики.

Эксперты Американского кардиологического общества (СЕИ) собирались и обсуждали границы принятия клинических решений, на основании которых ВНОК (Всероссийское научное общество кардиологов) выпустило рекомендации. Они-то базировались на Фремингемском исследовании, а это исследование проводилось двадцатилетиями в США. Все было постро-

ено на определениях по Фридвальду, поэтому получается, что раньше анализировали по Фридвальду, а теперь — совсем другими методами.

Таким образом, обратите внимание, может ли аналитик быть врачом лабораторной диагностики? Мне кажется, нет. Теперь обратный вопрос. Насколько глубоко врач-хирург, терапевт, кардиолог представляют проблемы аналитики и каково их влияние на принятие решения? Я выпускник медицинского вуза (специальность «лечебное дело»), всю жизнь занимаюсь именно лабораторной диагностикой. Однако и мои рекомендации клиницисты всегда воспринимают в штыки. Понять проблемы взаимодействия между аналитикой и лабораторной диагностикой клиницисты не могут.

Я слышал, здесь в нескольких лекциях называлось специальное слово «валидация». Так вот, в нашей профессии две валидации: аналитическая и клиническая. И только один человек может все это соединить в одной точке, это и есть врач клинической лабораторной диагностики. На мой взгляд, без человека, который все это дело объединяет, здесь никак нельзя.

Берестовская В. С. — 70 процентов аудитории в этом зале изначально находятся на одной точке зрения, а я своё выступление сразу назову игрой на чужом поле.

В клинической лабораторной диагностике слово «клиническая» стоит на первом месте. И тут проявляется некоторая двойственность нашей позиции: находясь в лаборатории, мы далеко «ушли» от пациента. Вместе с тем мы же активно отстаиваем свое право на участие в лечебном процессе. Давайте посмотрим, насколько мы готовы к этому сегодня. Я не говорю о том, что это категорически делать нельзя, но если у нас готовность сегодня проводить те самые жизненные рекомендации, о которых 70 процентов говорят, что да.

Если обратиться к уже принятому нами стандарту 15189, то мы увидим, что действительно в обеспечении качества постаналитического этапа сотрудник лаборатории несет ответственность. Это очень важно, что есть ответственность за корректную интерпретацию, а также использование результатов лабораторного исследования наилучшим образом в интересах пациента.

Я думаю, что я не единственный представитель клинической лаборатории, к которому обращаются за консультацией. Либо мы предлагаем свои услуги консультантов, либо нас приглашают. Как-то к нам попал образец крови девочки, в течение пяти лет ее наблюдали лучшие гепатологи города. Жалобы у нее были на слабость и утомляемость. В течение пяти лет был повышенный уровень АЛТ и АСТ. За пять лет, естественно, ей была проведена диагностика, проведены анализы на отсутствие болезни Вильсона-Коновалова и в перспективе, в ближайшее время у нее стояла биопсия печени. Нашими сотрудниками при участии клиницистов был проведен полноценный клинический разбор данного случая заболевания, и ребенку поставили диагноз «миопатия».

Кроме клиницистов в качестве заказчиков может выступать пациент. Сегодня те исследования, которые проводятся в Высшей школе экономики по взаимодействию системы здравоохранения и пациента, показывают, что существует пациент, назовем его «версия 2.0». То есть тот пациент, который просто приходил к врачу, слушал и выполнял те назначения, которые ему делал лечащий врач, практически закончился. Теперь пациенты очень активно осваивают медийное пространство, они лучше некоторых лечащих врачей знают симптомы и течение заболевания, знают терапевтические схемы, и, очень важно, у пациентов есть мотивация, это люди, которые очень высоко мотивированы, поэтому они готовы воспринимать знания. Они активно участвуют в социальных сетях, но у них есть очень серьезный минус, они самоучки, у них нет медицинского образования, поэтому количество ошибок, которые они могут совершить, еще больше.

Мы готовы взаимодействовать еще и в этом «медийном» пространстве? Я предлагаю на сегодня расценивать уже «версию 3.0» пациента. Сегодня есть приборы для самотестирования. И это уже пациент, который не просто читает, но и проходит самостоятельную диагностику. Я увидела на сайте Сибирского отделения Российской академии наук в разделе «рекомендации для пациентов с протезированными клапанами сердца», как они должны на основании самотестирования проводить коррекцию лечения. Это профессиональное сообщество,

это то, что мы, как отрасль медицины, порекомендовали нашим пациентам. Поэтому неслучайно у Американского общества клинической лабораторной науки есть человек, который входит в совет по обзору проблем лабораторной диагностики в СМИ и интернете.

Уже известно, что можно использовать информационное пространство с целью обеспечения, как ни странно, безопасности пациента. Сайт, который был разработан Labtest online совместным проектом с Американской ассоциацией клинической химии, это то поле, где действительно можно объединиться, и очень важно, что это рецензируемый сайт. То есть абы какие рекомендации там не появляются. Сайт разработан для того, чтобы помочь пациентам разобраться с теми исследованиями, которые им назначены, и, самое интересное, он может нам помочь решить определенные задачи.

И теперь вопрос о тех заключениях, которые большинство из нас готовы вписывать в историю болезни. Мы готовы нести юридическую ответственность за последствия этих решений? Не просто дать рекомендацию, а понять, что в случае неблагоприятного исхода мы будем нести очень серьезную ответственность: юридическую, административную, уголовную и так далее. То есть все, что касается юридического пространства. Американцы, они ведь не зря организовали первое профессиональное общество реаниматологов, потому что нужна была юридическая защита. Здесь они на сайте переложили на пациента ответственность за свою лабораторную диагностику.

Я бы хотела присоединиться к предыдущему докладчику: кто готовит врачей-патологов, которые готовы давать заключение? Насколько мы готовы? Та программа обучения, которая есть на сегодня, не позволяет этого. Уже девятый год я отвечаю за подготовку клинических ординаторов и интернов. Сегодня 72 часа отводятся на изучение гематологии. И вы предлагаете этих людей выпускать для того, чтобы давать заключения? Я посмотрела проект, который есть в стандартах, где записано, что формулирование клиничко-лабораторного заключения — это комплекс лабораторных исследований в базовом объеме: в объеме иммунной системы, системы гемостаза. Для меня осталось

загадкой, почему нет неотложных состояний, когда сотрудник экспресс-лаборатории действительно находится в непосредственной близости от лечащего врача, пациента и действительно его консультация оказывается важной. И дальше: консультация пациентов, что тоже меня очень насторожило, то есть консультация пациента и анализ его результатов — это тоже часть обязанностей специалиста клинической лабораторной диагностики. Насколько мы к этому готовы? Если мы, профессиональное сообщество, для себя примем такие условия, правила игры, то мы обязаны будем их выполнять. Я не готова формулировать диагноз и анализировать и консультировать пациента, у меня нет информации для того, чтобы давать грамотные заключения, за которые мне потом придется отвечать. Поэтому, когда мы принимаем на себя обязанность консультирования, прописанную в стандартах, давайте подумаем еще раз, это игра за безопасность пациента или против?

Ильин А. В. — Я занимаю нейтральную позицию в этом споре и объясню вам ее. Мы пытаемся поделить всех на белых и черных. В лаборатории должны быть все специалисты. Это должны быть аналитики, для которых в первую очередь важен правильный результат. Неважно, что за материал поступил в лабораторию, его обязанность выполнить ряд аналитических действий. Но должны быть люди с другим мышлением, которые должны определять именно методы проведения.

Работая в стационаре, я сталкиваюсь и с амбулаторными, и со стационарными больными. Больные из стационара не просят врачей давать заключения. Это правильно — мы не всегда знаем, что происходит за стенами лаборатории: какую терапию, диету и методологию используют врачи для постановки диагноза. Следовательно, интерпретировать и бить в колокола, что мы получили какие-то запредельные значения (такие случаи у нас бывают очень редко), просто является некорректным. Но обсудить вместе с клиницистом спорные вопросы крайне важно. Только тогда мы можем трактовать результат и разобраться в сложных непонятных случаях трактовки этих результатов. Поэтому я думаю, что должно быть все сбалансировано, должны быть специалисты всех уровней.

Островский О. В. — Можно ли каким-либо способом аналитику избежать ответственности за постановку диагноза, и что сам аналитик, делая только анализы, избегает ответственности, как Вы полагаете? Готовы ли вы взять на себя ответственность за диагностику?

Берестовская В. С. — Если вы оказались в лаборатории, значит, вы не берете на себя ответственность. Те, кто готов, сидят на приеме. Обязательно должна быть консультация в отношении выбора исследования, это должно быть обязательно. Отвечая за себя, еще на шестом курсе я поняла, что не могу на себя взять такую ответственность.

Островский О. В. — Я бы хотел привести пример из практики. Девушка 17-ти лет, узнав о положительном лабораторном диагнозе на гепатит С, решает покончить жизнь самоубийством. Ее спасают, и ни в одном из последующих анализов гепатит найти не удалось. Как вы полагаете, кто виноват в этой ситуации? Кто несет ответственность?

Ильин А. В. — Я попробую ответить на этот вопрос. Это проблема лечащего врача, потому что мы постоянно говорим, что наши тесты скрининговые, и для уточнения диагноза требуются дополнительные исследования.

Годков М. А. — Александр Викторович, скажите, пожалуйста, а если мы возьмем качественно обученного лаборанта, чем его работа будет отличаться от работы врача?

Ильин А. В. — Абсолютно ничем. Посмотрите: у нас специалисты с высшим образованием обучаются аналитической химии 8, а то и 10 лет. А в западных лабораториях на аналогичных рабочих местах, на таком же оборудовании работают техники, лаборанты и даже люди без специального медицинского образования.

Реплика из зала. — Зачем получать высшее образование, если я, врач, закончивший медицинский институт, потом аспирантуру, спустя десять лет

обучения не имею права консультировать врачей по некоторым исследованиям? Не моя прерогатива лечить пациентов, но огромное количество врачей не знают как лечить, и только посещая конференцию, на которой мы сейчас здесь вместе, я получаю информацию и дальше рассказываю в своем городе, как нужно применять некоторые технологии. Я считаю, что врач лабораторной диагностики должен до определенного момента в определенной области обязательно участвовать в диагностическом процессе.

Выступление из зала. — Говорят о том, что в лабораторной диагностике очень много лиц с высшим образованием, а лаборантов очень мало. А где наш Минздрав, который нами не совсем правильно управляет? У нас много врачей, но лаборантов нет, нет поступающих в училища, и врачи выполняют работу лаборантов!

Островский О. В. — Хотел бы обратить ваше внимание, сейчас выпускается такая аппаратура, постепенно сходятся методы, и мы уже видим аппаратуру, выполняющую различные виды исследований комплексно. Например, проточная цитометрия объединяет в себе множество функций. Следующий шаг — объединение в одном корпусе биохимии и гематологии. Мы получим один комбайн, в который персоналу нужно будет только «вставлять пробирки». Я не уверен, что будет нужен химик и специалист аналитики.

Реплика из зала. — У нас возникает проблема, что мы не успеваем охватить всю информацию, потому что бурно развиваются молекулярная диагностика, биотехнологии, вирусология, генетика. И даже в лаборатории, где мы все с образованием патологов, мы звоним другим специалистам, узнаем результаты для сравнения, даже в пределах лаборатории. Мы тоже врачи, нас учат анализировать, учат выставлять алгоритмы.

Реплика из зала. — У меня маленькое замечание. Мне кажется, происходит подмена понятий. Мы говорим, должен ли врач лабораторной диагностики консультировать клинических докторов? Мое мнение:

да, должен. А должен ли он нести ответственность? У меня вопрос: за что? Если за диагностику, то да, должен, а если за диагноз, то должен нести ответственность лечащий врач. Разница между диагнозом и диагностикой такая: диагностика — это набор симптомов пациента, и только лечащий врач должен всю информацию у себя сложить и поставить диагноз.

Берестовская В. С. — Вопрос об обучении. Здесь собрались люди равнодушные, и люди, которые регулярно занимаются самообразованием, настроенные на то, чтобы систематически, каждый день повышать свой профессиональный уровень. Стандарт один для всех, и если каждому сотруднику вашей лаборатории будет вменено в обязанности давать заключения, думаю, ни один человек сейчас не будет против. Консультационные услуги могут выполняться до проведения исследования: правильный выбор алгоритма и метода обследования, подготовки больного и т.д. При необходимости, если будет соответствующий запрос, то следует проводить и интерпретацию полученных результатов совместно с клиницистом.

К сожалению, подчас, для ведения качественной консультативной деятельности нашим специалистам не хватает базовых знаний о принципах консультирования, патофизиологических и биохимических особенностях протекания тех или иных видов патологии, навыков по «увязыванию» в единую клиническую гипотезу результатов исследований по различным лабораторным направлениям (биохимии, иммунологии, микробиологии и т.д.).

Откуда специалисты клинической лабораторной диагностики могут получать подобную информацию? Прежде всего — это циклы усовершенствования врачей, данные литературы, научные журналы или семинары, которые проводят профильные кафедры и заинтересованные компании. Где больше информации? Вопрос сложный и неоднозначный. В этом ключе получается, что врачу клинической лабораторной диагностики достаточно сложно нести ответственность за клиническую интерпретацию результатов исследований, так как базовой информации недостаточно.



Надежность и безопасность в лабораторном секторе



- Взрывобезопасный объем для хранения взрывчатых и легковоспламеняемых веществ соответствует требованиям ATEX 95
- Электронный блок управления позволяет точно задать температуру хранения
- Наличие сигнализации: в случае изменения температуры или незакрытой двери, пропадания питания по сети (визуальная)
- Интегрированная регистрация и хранение данных по min\max температуре, случаях срабатывания сигнализации и пропадания питания
- RS 485 интерфейс и безпотенциальные контакты для дополнительной регистрации данных по температуре и сигнализации
- 1 точка калибровки обеспечивает точный контроль температуры хранения.



ООО «Либхерр-Русланд»
123104 Москва, Большой Палашевский пер. д. 13/2
+7 (495) 280-03-27
+7 (495) 280-03-76
www.lab.liebherr.com

LIEBHERR



О. О. Белявская

Маркеры активации свертывания крови у амбулаторных больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями, получающих антикоагулянтную терапию

О. О. Белявская, врач¹

Т. В. Вавилова, д.м.н., проф., зав. кафедрой^{1,2}



Т. В. Вавилова

¹Межрайонная централизованная клиничко-диагностическая лаборатория ГБУЗ «Городской консультативно-диагностический центр № 1», г. Санкт-Петербург
²Кафедра клинической лабораторной диагностики и генетики ФГБУ «Федеральный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова», Санкт-Петербург

Coagulation activation markers of outpatients with cardiovascular diseases receiving anticoagulants

O. O. Belyavskaya¹, T. V. Vavilova^{1,2}

¹Municipal Consultative and Diagnostic Centre № 1, St.-Petersburg, Russia

²Federal Medical Research Centre n.a. V. A. Almazov, St.-Petersburg, Russia

Резюме

Сохраняется проблема оценки эффективности антикоагулянтной терапии в амбулаторной практике. В исследование включены 200 больных: 64 получали варфарин, 70 — дабигатран и 66 — ривароксабан. Всем больным были измерены маркеры активации свертывания крови. Оценены риски тромбозомболических осложнений. Выявлено, что достижение целевого значения МНО при приеме варфарина ведет к снижению уровня D-димера ниже точки cut-off. Не отмечено достоверных изменений маркеров активации свертывания в течение 18 месяцев приема новых пероральных антикоагулянтов. В группе больных с D-димером < 0,5 мкг/мл наблюдается достоверно значимое удлинение тромбинового времени при приеме дабигатрана и АПТВ при приеме ривароксабана, а также снижение уровня активности фактора VIII и антигена фактора Виллебранда вне зависимости от принимаемого препарата.

Ключевые слова: варфарин, дабигатран, ривароксабан, маркеры активации свертывания.

Summary

There is still the problem of assessing the effects of anticoagulants on outpatients. 200 patients were included: 64 received warfarin, 70 — dabigatran, 66 — rivaroxaban. Coagulation activation markers were performed on all patients. Risks of thromboembolism were assessed. It has been shown, that warfarin (INR within the target range) leads to lower levels of D-dimer below the cut-off. There were no significant changes in markers of coagulation activation for 18 months on new oral anticoagulants. In the group of patients with D-dimer < 0.5 mkg/ml a thrombin time when receiving dabigatran and aPTT when receiving rivaroxaban were significantly prolonged, as well as reducing the level of factor VIII activity and von Willebrand factor antigen, regardless of the drug received.

Key words: warfarin, dabigatran, rivaroxaban, coagulation activation markers.

Введение

Проблема профилактики тромбозомболических осложнений (ТЭО) занимает ведущее место в мировой и российской клинической практике в течение многих лет. В России кардиоваскулярные события являются причиной смерти в 62% случаев (World Health Organization, NCD Country Profiles, 2011). Существенную долю составляют ишемические инсульты кардиоэмболического генеза. Распространенность фибрилляции предсердий (ФП) в общей популяции составляет 1–2%, ассоциируется с увеличением смертности, частотой госпитализаций, ухудшением качества жизни [1]. К ТЭО относится также тромбоз глубоких вен (ТГВ) и тромбозомболия легочной артерии (ТЭЛА).

По данным ассоциации флебологов 2010 года, в общей популяции ежегодно фиксируют 50–70 новых случаев заболевания на 100 тысяч человек. В пожилом и старческом возрасте частота ТГВ увеличивается в несколько раз. Непосредственной опасностью для жизни пациента является развитие ТЭЛА, которую регистрируют ежегодно с частотой 35–40 на 100 тысяч человек [2]. Пациенты с последствиями ОНМК, ТГВ, ТЭЛА составляют значительную долю амбулаторных больных. Поэтому лечению осложнений сердечно-сосудистых заболеваний и предупреждению вторичных эпизодов отводится главная роль в работе неврологов, сосудистых хирургов, пульмонологов, терапевтов и врачей других специальностей.

Показано, что результаты скрининговых клоттинговых тестов, как правило, остаются неизменными даже при наступлении тромбоза [3], так как они отражают лишь 5% всего генерируемого тромбина [4]. Чаще всего в качестве маркера активации свертывания крови с целью выявления гиперкоагуляционного состояния используется D-димер, однако в литературе встречается указание на клиническую значимость и других лабораторных критериев (фибриноген, антиген фактора Виллебранда, активность фактора VIII, фрагменты 1+2 протромбина, тромбин-антитромбиновый комплекс). В исследовании ARIC, проведенном группой авторов, было установлено, что повышенные значения кон-

центрации фибриногена, антигена фактора Виллебранда и активности фактора VIII статистически достоверно связаны с неблагоприятными, в том числе смертельными исходами сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) [5]. Однако не разработаны стандарты и алгоритмы выполнения этих исследования у амбулаторных больных с ССЗ, принимающих пероральные антикоагулянты. В 2003 году было показано, что только антитромботическая терапия вызывает уменьшение смертности, связанной с ФП [6]. Риск возникновения рецидивов ТГВ и ТЭЛА кумулятивно возрастает у пациентов, не получающих стандартной антикоагулянтной терапии, до 40% через десять лет [7].

С середины XX века основными препаратами, доказавшими свою эффективность в длительной защите от кардиоэмболических инсультов и профилактике рекуррентных венозных тромбозов и эмболий, были препараты группы монокумаринов, а в России варфарин (Nusomed), зарегистрированный в 2002 г. Несмотря на высокую эффективность, прием АВК имеет ряд неудобств. С недавнего времени в арсенале врачей появились новые пероральные антикоагулянты (НПОАК), удобные в применении, имеющие широкое терапевтическое окно и хороший профиль безопасности, сопоставимые и даже превышающие по эффективности варфарин в длительной профилактике кардиоэмболических инсультов, рекуррентных тромбозов глубоких вен и тромбозов легочной артерии. Несмотря на то что дабигатрана этексилат (дабигатран, Pradaxa®, Boehringer Ingelheim), ривароксабан (Xarelto®, Bayer Health Care) и апиксабан (ЭЛИКВИС®, Bristol-Myers Squibb Company, Pfizer Inc.) начали применяться в России с 2009 года, сведений о динамике маркеров активации свертывания не накоплено.

Цель настоящей работы — определить влияние приема варфарина и НПОАК на маркеры активации свертывания крови у амбулаторных больных с сердечно-сосудистыми

заболеваниями и оценить связь результатов измерений с клиническими исходами.

Материалы и методы

В исследование включены 200 больных, из которых 132 с фибрилляцией предсердий неклапанной этиологии и 68 больных с ТГВ и (или) ТЭЛА. 64 больных получали варфарин, 70 — дабигатран (Pradaxa®) в дозе 110 мг два раза в сутки или 150 мг два раза в сутки, 66 больных получали ривароксабан (Xarelto®) в дозе 15 мг один раз в сутки или 20 мг один раз в сутки. Все больные были поделены на группы в зависимости от уровня D-димера. Группы пациентов сопоставимы по гендерному и возрастному составу (табл. 1). Выбор дозы НПОАК осуществляли по состоянию почечной функции в соответствии с инструкцией к препарату. Всем больным определены протромбиновое время (ПВ), протромбин в процентах по Квику (далее — протромбин), рассчитано международное нормализованное отношение (МНО), измерены активированное парциальное тромбопластиновое время (АПТВ), тромбиновое время (ТВ), фибриноген, D-димер, активность фактора VIII, антиген фактора Виллебранда. Период наблюдения за пациентами, принимавшими варфарин от трех месяцев до трех лет, НПО-

АК — от шести месяцев до 1,5 лет. Исследования проводились в венозной крови, забранной стандартным образом утром натощак до приема препарата, и выполнялись на автоматическом коагулометре STA-R Evolution (Roche, Швейцария) ре-агентами Stago (Франция). Всего проанализированы 653 точки исследования. Результаты исследования обрабатывались с помощью программы Statistica 10. Сравнение двух независимых групп осуществляли с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Данные представлены в виде медианы и 25% и 75% процентиля (Me [25%; 75%]). Критический уровень значимости считали при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В оценке результатов проведенного исследования учитывались особенности использованных фармакологических препаратов. Варфарин блокирует витамин К-эпоксид редуктазу — фермент, участвующий в обмене витамина К и процессах активации факторов II, VII, IX, X свертывания крови, а также естественных антикоагулянтов — протеинов С и S. При исследовании маркеров активации свертывания крови у больных, получающих варфарин, обращает на себя внимание статистически достоверное снижение концентрации D-димера (точка

Таблица 1
Гендерный и возрастной состав групп больных, Ме [25%;75%]

Препарат, принимаемый больным	Возраст	Пол
Варфарин	60 [49; 71]	мужчин 17, женщин 47
Дабигатран	73 [65; 78]	мужчин 31, женщин 39
Ривароксабан	72 [65; 76]	мужчин 30, женщин 36

Таблица 2
Результаты исследования у больных, принимающих варфарин, Ме [25%;75%]

Показатель	D-димер < 0,5	D-димер > 0,5
МНО	2,06 [1,57; 2,69]	1,64 [1,00; 2,12] *
АПТВ, с	34, 2 [31,4; 36,8]	33,2 [30,5; 35,3]
Тромбиновое время, с	16,8 [16,1; 17,5]	17,0 [16,5; 17,7]
Фибриноген, г/л	3,3 [2,9; 4,0]	3,9 [3,4; 4,4] *
Антиген фактора Виллебранда,%	153 [126; 182]	193 [155; 225] *
Активность фактора VIII,%	157 [129; 183]	190 [153; 214] *

Примечание: * — достоверность различия между группами.

Таблица 3
 Результаты исследования у больных, принимающих дабигатран. Ме [25%;75%]

Показатель	D-димер < 0,5	D-димер > 0,5
МНО	1,23 [1,16; 1,34]	1,21 [1,12; 1,32]
АПТВ, с	41,7 [38,2; 47,7]	40,9 [33,3; 53,5]
Тромбиновое время, с	158,9 [106,7; 218,0]	102,8 [56,4; 198,3] *
Фибриноген, г/л	3,41 [3,1; 3,76]	3,63 [3,2; 4,0]
Антиген фактора Виллебранда, %	143 [113; 165]	167 [138; 215] *
Активность фактора VIII, %	133 [102; 151]	145 [127; 189] *
СКФ, мл/мин./1,73 м ²	62,9 [52,7; 74,5]	61,7 [54,2; 70,0]

Примечание: * — достоверность различия между группами.

cut-off 0,5 мкг/мл) при достижении адекватного уровня гипокоагуляции (табл. 2). Наши данные согласуются с результатами других исследователей [8] и подтверждают возможность использования данного показателя в качестве дополнительного лабораторного критерия эффективности антитромботической терапии.

В ряде зарубежных исследований было отмечено ухудшение прогноза течения ССЗ с развитием тромботических осложнений (артериальных и [или] венозных) при повышении уровня антигена фактора Виллебранда [9, 10, 11]. В ходе работы нами было выявлено статистически достоверное снижение антигена фактора Виллебранда при значении D-димера ниже точки cut-off. Зарубежными авторами было сделано заключение, что повышение уровня фактора VIII в плазме крови пациентов, принимающих антикоагулянтную терапию, носит компенсаторный характер при снижении концентрации витаминов К-зависимых факторов [12]. Однако в нашей работе мы отметили достоверное снижение активности фактора VIII при приеме варфарина. Снижение маркеров активации свертывания (D-димера, фибриногена, антигена фактора Виллебранда, активности фактора VIII) при приеме АВК, вероятно, связано с механизмом действия препарата, а именно воздействием на ключевые прокоагулянты — факторы II, VII, IX, X.

Дабигатран — прямой ингибитор тромбина. Удлинение тромбинового времени имело место у 88 % больных, колеблясь в широких пределах (от 16 до 240 с и более

измеряемой величины). Медиана ТВ составила 157,5 [98,8; 213,6]. Удлинение ТВ не коррелировало с дозой препарата, состоянием почечной функции, а также не отмечено корреляции с уровнем АПТВ или протромбином в целом по группе. В то же время в десяти случаях при наличии короткого ТВ отмечены и нормальные значения АПТВ, что ставит под сомнение приверженность больного к терапии или, возможно, указывает на отсутствие терапевтического влияния дабигатрана на свертывание крови.

Наши данные подтвердили мнение других авторов о высокой чувствительности ТВ к присутствию дабигатрана с непредсказуемой степенью удлинения и широким разбросом результатов [13]. ТВ, также как АПТВ, может свидетельствовать лишь о наличии дабигатрана в плазме крови, но не отражает его концентрацию и поэтому не может быть использовано для подбора дозы или прогнозирования осложнений терапии. Однако нами была выявлена закономерность: в группе с уровнем D-димера ниже точки cut-off ТВ достоверно длиннее (табл. 3).

В ходе динамического наблюдения за больными на фоне терапии дабигатраном в течение месяца отмечена тенденция к снижению концентрации D-димера ($с\ 0,75 \pm 0,74$ мкг/мл до $0,49 \pm 0,24$ мкг/мл, $p > 0,05$); статистически значимого изменения концентрации других маркеров активации свертывания крови не наблюдалось, что подтверждается и другими исследователями [14]. Однако нами было выявлено достоверное снижение ан-

тигена фактора Виллебранда, активности фактора VIII в группе больных с D-димером менее 0,5 мкг/мл (табл. 3). Измерение фибриногена методом Клаусса дало стабильные результаты.

В процессе наблюдения за маркерами активации свертывания крови были выявлены три случая снижения активности VIII фактора. Все пациенты принимали дабигатран в дозировке 110 мг два раза в сутки. В одном случае активность фактора VIII составила 26 %, а при повторном измерении через месяц без коррекции терапии 90 %. Показатели креатинина, СКФ, активности фактора VIII до начала приема дабигатрана неизвестны. Во втором случае до начала терапии активность фактора VIII составила 82 %, через месяц после начала терапии — 43 % (СКФ 63,3 мл/мин./1,73 м²), при повторном измерении без коррекции лечения — 60 %. В третьем случае через месяц после начала терапии у пациента наравне со снижением активности фактора VIII до 23 % и значением СКФ 35,8 мл/мин./1,73 м² были отмечены многократные спонтанные десневые кровотечения. Пациент был переведен на прием другого перорального антикоагулянта с восстановлением активности фактора VIII. У всех пациентов было отмечено удлинение тромбинового времени более 240 с. Описанные наблюдения демонстрируют проблему трактовки результатов клоттинговых тестов, которые могут зависеть от технологии выполнения исследования либо отражают риск кровотечения.

Ривароксабан — прямой ингибитор фактора Ха, действует на более «высоком» уровне в каскаде свертывания крови, что определяет некоторые особенности препарата и его отличие от прямых ингибиторов тромбина. Протромбин имел общую тенденцию к уменьшению значений, составил в среднем 68 [53; 85]. Расчет МНО в соответствии с индексом чувствительности реагентов к АВК препаратам в настоящее время не рекомендуется. По результатам исследования, АПТВ реагировало на присутствие препарата в 40 % случаев, варьировало в пределах 32,8 [30,5; 36,7]. Однако

Таблица 4

Результаты исследования у больных, принимающих ривароксабан, Me [25%;75%]

Показатель	D-димер < 0,5	D-димер > 0,5
МНО	1,26 [1,11; 1,48]	1,26 [1,09; 1,55]
АПТВ, с	33,2 [30,9; 37,1]	31,7 [29,6; 34,0] *
Тромбиновое время, с	16,9 [16,3; 17,5]	16,6 [16,4; 17,1]
Фибриноген, г/л	3,43 [3,01; 3,76]	3,54 [2,99; 4,10]
Антиген фактора Виллебранда, %	155 [120; 206]	182 [147; 227] *
Активность фактора VIII, %	161 [136; 200]	179 [148; 235] *
СКФ, мл/мин./1,73 м ²	65 [55,9; 78,9]	64,7 [53,8; 76,1]

Примечание: * — достоверность различия между группами.

нами было показано, что в группе больных с удлинением АПТВ уровень D-димера статистически ниже (табл. 4).

В ходе динамического наблюдения за больными на фоне терапии ривароксабаном отмечены незначительные изменения маркеров активации свертывания крови, что согласуется с данными другими исследователями [14]. Однако в группе пациентов с уровнем D-димера ниже 0,5 мкг/мл уровень активности фактора VIII, антигена фактора Виллебранда статистически достоверно ниже (табл. 4). Вероятно, отсутствие статистически достоверного снижения маркеров активации свертывания при приеме НПОАК связано с механизмом точечного воздействия препаратов на Па- или Ха-фактор.

Все больные, принимающие антикоагулянтную терапию, были клинически оценены с использованием шкалы риска тромбоземболии (CHA₂DS₂-VASc). У десяти пациентов молодого возраста с венозным тромбоземболизмом был отмечен низкий риск, у всех остальных пациентов количество баллов варьировало от двух до девяти (высокий риск развития ТЭО). В ходе динамического наблюдения за пациентами были отмечены пять ТЭО: два события на фоне нерегулярного приема дабигатрана, одно событие на фоне приема ривароксабана пациенткой с тяжелой сопутствующей патологией, одно событие на фоне МНО менее 2,0 при приеме варфарина и одно событие (ишемический инсульт) у пациентки при МНО = 3,74, D-димере 0,39 мкг/мл, антигене фактора Виллебранда 145 %, активности фактора VIII 130 %. Необходимо отметить, что ТЭО имели место у больных с высоким риском осложнений по шкале CHA₂DS₂-VASc.

Выводы

1. Достижение целевого значения МНО при приеме варфарина ведет к снижению уровня D-димера ниже точки cut-off.
2. В группе больных с D-димером < 0,5 мкг/мл при приеме дабигатрана наблюдается достоверно

более удлиненное тромбиновое время, а при приеме ривароксабана — АПТВ.

3. Достоверных изменений маркеров активации свертывания в течение 18 месяцев приема НПОАК в ходе динамического наблюдения не отмечено.
4. Вне зависимости от принимаемого препарата (варфарин, дабигатран, ривароксабан) в группе больных с уровнем D-димера ниже 0,5 мкг/мл отмечается достоверное снижение уровня активности фактора VIII, антигена фактора Виллебранда, при приеме варфарина — и уровня фибриногена.
5. Необходимо продолжение наблюдений в клинической практике и накопление данных о маркерах активации свертывания крови для прогнозирования риска ТЭО.

Список литературы

1. Голицын С. П., Панченко Е. П., Попова С. В. и др. Рекомендации РКО, ВНОА и АССХ по диагностике и лечению фибрилляции предсердий. // Москва, 2012.
2. Савельев В. С., Чазов Е. И., Гусев Е. И. и др. Российские клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике венозных тромбоземболических осложнений. // Флебология 1. — 2010. № 4 (2). С. 4–5.
3. Hemker H. C., Al Dieri R., Beguin S. // *Curr. Opin. Haematol.* — 2004. — № 11. — P. 170–175.
4. Bauer K. A., Rosenberg R. D. The pathophysiology of the prethrombotic state in humans: insights gained from studies using markers of hemostatic system activation // *Blood.* — 1987. — № 70. — P. 343–350.
5. Alonso A., Tang W., Agarwal S. K. et al. Hemostatic markers are associated with the risk and prognosis of atrial fibrillation: the ARIC study. // *Int. J. Cardiol.* — 2012. — № 155 (2). — P. 217–222.
6. Hylek E. M., Go A. S., Chang Y. et al. Effect of intensity of oral anticoagulation on stroke severity and mortality in atrial fibrillation. // *N. Engl. J. Med.* — 2003. — № 349 (11). — P. 1019–1026.
7. Prandoni P., Noventa F., Ghirarduzzi A et al. The risk of recurrent venous thromboembolism after discontinuing anticoagulation in patients with acute proximal deep vein thrombosis or pulmonary embolism. A prospective cohort study in 1,626 patients // *Haematologica.* — 2007. № 92 (2). — P. 199–205.
8. Вавилова Т. В., Мнускина М. М., Крупоткина И. Г. и др. Клиническое значение и особенности определения D-димера у амбулаторных больных. // *Клиническая лабораторная диагностика.* — 2009. — № 11. — С. 42–46.
9. van Schie M. C., van Loon J. E., de Maat M. P. et al. Genetic determinants of von Willebrand factor levels and activity in relation to the risk of cardiovascular disease: a review. // *J. Thromb. Haemost.* — 2011. — № 9 (5). — P. 899–908.
10. Wiman B., Andersson T., Hallqvist J. et al. Plasma levels of tissue plasminogen activator/plasminogen activator inhibitor-1 complex and von Willebrand factor are significant risk markers for recurrent myocardial infarction in the Stockholm Heart Epidemiology Program (SHEEP) study. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2000. — № 20 (8). — P. 2019–2023.
11. Tsai AW., Cushman M., Rosamond W. D. et al. Coagulation factors, inflammation markers, and venous thromboembolism: the longitudinal investigation of thromboembolism etiology (LITE). // *Am. J. Med.* 2002. — № 113 (8). — P. 636–642.
12. Passamonti S. M., Bucciarelli P., Bader R. et al. Influence of anticoagulant therapy with vitamin K antagonists on plasma levels of coagulation factor VIII. // *Thromb. Res.* 2010. — № 126 (3). — P. 243–245.
13. Douxfils J., Mullier F., Robert S. et al. Impact of dabigatran on a large panel of routine or specific coagulation assays. Laboratory recommendations for monitoring of dabigatran etexilate. // *Thromb Haemost* 2012. — № 107 (5). — P. 985–997.
14. Baglin T. The role of the laboratory in treatment with new oral anticoagulants. // *Thromb Haemost* 2013. — № 11. — P. 122–128.



Высокое качество теста по определению гемоглобина HbA1C компании Roche

Для диагностики и мониторинга сахарного диабета.

Распространенность сахарного диабета имеет черты неинфекционной эпидемии, а лечение этого заболевания и его осложнений составляет значительную долю затрат системы здравоохранения. Доказано, что гликированный гемоглобин является не только ключевым показателем гликемии и риска развития диабетических осложнений у пациентов с сахарным диабетом, но также рекомендован Американской диабетической ассоциацией для диагностики сахарного диабета 2 типа¹.

Российская ассоциация эндокринологов определила, что значение гликированного гемоглобина является основным лабораторным тестом при выборе индивидуальной стратегии лечения и показателем достижения терапевтической цели у пациентов с сахарным диабетом 2 типа².

Характеристики наборов для определения гликированного гемоглобина:

- Высокая точность определения уровня HbA1C
- Доказанное отсутствие интерференции с другими фракциями гемоглобина³
- Реагенты готовы к использованию
- Отсутствие ручной пробоподготовки образца



Методы для определения HbA1C сертифицированы IFCC/ NGSP

на правах рекламы

1. DIABETES CARE, 2009, 32 (7), p.1327-1334. 2. САХАРНЫЙ ДИАБЕТ, 2011, 4, с. 6-16. 3. [HTTP://WWW.NGSPORG/INTERFASP](http://www.ngsp.org/interfasp)

COBAS, COBAS INTEGRA и LIFE NEEDS ANSWERS являются товарными знаками компании Рош. © Рош, 2014



ООО «Рош Диагностика Рус»:
Россия, 115114, г. Москва, ул. Летниковская, д. 2, стр. 3,
Бизнес-центр «Вивальди Плаза»
Тел.: (495) 229-69-99
www.roche.ru www.rochediagnostics.ru

cobas[®]
Life needs answers

Основные требования к методу определения гликированного гемоглобина

М. Г. Морозова, к.б.н., зав. межрайонной клинико-диагностической лабораторией¹

В. С. Берестовская, к.м.н., доцент кафедры клинической лабораторной диагностики²

Е. С. Ларичева, ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики²



М.Г. Морозова



В.С. Берестовская



Е.С. Ларичева

¹СПб ГБУЗ «Городская поликлиника № 87 Невского района», г. Санкт-Петербург

²ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» (СЗГМУ), г. Санкт-Петербург

The main requirements for the method measurement HbA_{1c}

M.G. Morozova, V.S. Berestovskaya, E.S. Laricheva

Резюме

Обсуждается медицинская и экономическая целесообразность оценки уровня гликемии у пациентов СД второго типа на основе измерения гликированного гемоглобина (HbA_{1c}). Подчеркивается, что с 2002 года международные диабетологические организации одобрили стандартизацию методов HbA_{1c} по рекомендации IFCC. В то же время рекомендации Российской ассоциации эндокринологов содержат значения HbA_{1c} в соответствии с системой NGSP. Указано, что методы исследования HbA_{1c} основаны на двух принципах: разделение форм гемоглобина на основе разницы зарядов (ВЭЖХ, электрофорез) или определение молекулярной структуры (иммуноанализ, боронатная аффинная хроматография, масс-спектрометрия). Отмечается, что визуальная оценка результатов гликированного гемоглобина, полученного методами ВЭЖХ, не исключает ошибочного результата в присутствии атипичных вариантов гемоглобина, имеющих заряд аналогичный HbA_{1c}.

Ключевые слова: гликированный гемоглобин (HbA_{1c}), стандартизация HbA_{1c} по IFCC, интерференция атипичных форм гемоглобина.

Summary

There is a discussion on medical and economical benefits of using glycated hemoglobin (HbA_{1c}) for glycaemic control of patients with diabetes type 2. It is underlined that since 2002 standardisation of HbA_{1c} methods was approved according to the IFCC recommendation. At the same time, Guidelines of Russian Endocrinological Association contains value HbA_{1c} according to NGSP system. Haemoglobin A1c assays can be divided into principles: molecular charge (cation-exchange high-performance liquid chromatogram, electrophoresis) or molecular structure (immunoassays, boronate affinity chromatography, mass spectrometry). Cation-exchange highperformance liquid chromatogram affected by haemoglobin variants co-eluting with HbA and/or HbA_{1c} due to charge similarity. In these cases visual detection can be erroneous.

Key words: glycated hemoglobin (HbA_{1c}), IFCC standardisation HbA_{1c}, interference haemoglobin variants.

Глобальный скачок заболеваемости сахарным диабетом (СД) второго типа, особенно среди людей трудоспособного возраста, обусловлен сложным взаимодействием генетических, социальных и экологических факторов. Сегодня признаётся, что СД является смертельной болезнью, сопоставимой по масштабам с ВИЧ / СПИД [1]. Официальные данные подтверждают ежегодное увеличение численности больных СД в нашей стране. Так, по обращаемости на 01.01.2013 их число составило 3 779 423 пациента, однако, по мнению экспертов, реальная цифра превышает зарегистрированный

уровень и приближается к значению 10–12 млн человек (около 7–8% жителей России) [2].

Высокая смертность и инвалидизация, сопровождающие СД второго типа, чреватые серьезными экономическими последствиями. Потеря конечностей, резкое снижение зрения и необходимость проведения заместительной почечной терапии (гемодиализа) — все эти факторы приводят к увеличению общего экономического бремени. Прямые расходы в системе здравоохранения на СД занимают 2,5–15% ежегодного бюджета систем медицинской помощи во всем мире [3].

Результаты некоторых исследований показали, что улучшение гликемического контроля при СД второго типа может приводить к снижению расходов и экономии ресурсов системы здравоохранения. В частности, Oglesby и соавт. установили, что у пациентов с хорошим контролем гликемии (уровень гликированного гемоглобина [HbA_{1c}] ≤ 7%) прямые затраты, связанные с диабетом, ниже, чем у пациентов с уровнем HbA_{1c} > 7% и ≤ 9%, а также неудовлетворительным контролем при HbA_{1c} > 9%, на 16 и 20% соответственно. При этом в данном исследовании учитывались

только расходы, связанные с лекарственным обеспечением пациентов, и не оценивались затраты на компенсацию осложнений СД [4].

Считается, что среди достижений лабораторной медицины последних четырёх десятилетий измерение HbA_{1c} является одним из самых значимых [5]. С 2011 года Российская ассоциация эндокринологов определила, что значение гликированного гемоглобина является основным лабораторным тестом при выборе индивидуальной стратегии лечения и показателем достижения терапевтической цели у пациентов с СД второго типа [6].

В «Консенсусе совета экспертов Российской ассоциации эндокринологов (РАЭ) по инициации и интенсификации сахароснижающей терапии сахарного диабета второго типа» указывается, что приоритетом при выборе тактики ведения пациентов с сахарным диабетом является обеспечение безопасности пациента. Стоит напомнить, что осложнения при сахарном диабете отражают неадекватный гликемический контроль и могут быть вызваны не только длительной гипергликемией, но и избыточной интенсификацией терапии и агрессивным лечением. В отличие от глюкозы, на содержание которой оказывают значительное влияние преаналитические факторы, значение гликированного гемоглобина является объективным показателем уровня гликемии и позволяет перейти к персонализированному лечению.

Обеспечить эффективное и безопасное лечение пациентов с СД второго типа призваны следующие положения Консенсуса:

1. целевое значение контроля гликемии устанавливается по уровню HbA_{1c} с учётом медицинских и социальных факторов;
2. мониторинг эффективности сахароснижающей терапии по уровню HbA_{1c} рекомендуется осуществлять каждые 3 месяца;
3. изменение сахароснижающей терапии (при отсутствии достижения индивидуальных целей по уровню HbA_{1c}) должно быть выполнено не позднее, чем через 6 месяцев;

4. при исходном уровне HbA_{1c} 6,5–7,5% критерием достижения индивидуальной цели считается снижение содержания гликированного гемоглобина на $\geq 0,5\%$;
5. при исходном уровне HbA_{1c} 7,6–9,0% критерием достижения индивидуальной цели считается снижение содержания гликированного гемоглобина на $\geq 1,0\%$;
6. при исходном уровне HbA_{1c} более 9,0% критерием достижения индивидуальной цели считается снижение содержания гликированного гемоглобина на $\geq 1,5\%$ [6].

Кроме того, HbA_{1c} предлагается использовать в диагностике СД второго типа при непереносимости глюкозы и невозможности проведения перорального теста толерантности к глюкозе [7]. Таким образом, клиническая значимость теста предъявляет высокие требования к методу оценки гликированного гемоглобина, а аналитические особенности системы для определения HbA_{1c} сегодня должны рассматриваться с точки зрения ориентированности на пациента и учитывать прямые или косвенные отрицательные последствия, связанные с исследованием [8].

Взгляд в прошлое

Впервые неоднородность гемоглобина человека была продемонстрирована в 1958 году Allen D. W. и соавт. при использовании метода катионообменной хроматографии. Эксперименты показали элюирование небольших пиков гемоглобина (названных «быстрыми гемоглобинами» или HbA_1) перед основной фракцией HbA . В зависимости от порядка хроматографической элюции этим пикам были присвоены обозначения от HbA_{1a} до HbA_{1c} . Ранее считалось, что они являются главным образом генетически обусловленными фракциями, хотя их образование из HbA предполагалось еще в 1966 году. В итоге выяснилось, что эти фракции Hb возникают в результате связывания различных соединений с HbA , что приводит к изменениям физико-химических

свойств молекул (например, электрического заряда) и позволяет выделить данные фракции. Глюкоза была однозначно определена как источник наиболее распространенной фракции HbA_1 — HbA_{1c} . В течение многих лет не удавалось четко продемонстрировать неферментативный характер реакции гликирования. Возможно, по этой причине для описания данного процесса и образующихся соединений вместо «гликирования» или «гликированный гемоглобин» использовались неправильные термины «гликозилирование» или «гликозилированный гемоглобин» [5].

Необходимость стандартизации

Интерес к HbA_{1c} стремительно возрос в 1968 году, когда Rahbar S. описал повышенный процент этой фракции гемоглобина у пациентов с сахарным диабетом. Тем не менее научно обоснованные доказательства значимости измерения HbA_{1c} были получены только в 1990-х по окончании крупномасштабных эпидемиологических исследований: Исследования по контролю диабета и его осложнений (DCCT — Diabetes Control and Complications Trial) по СД первого типа и перспективного исследования диабета в Соединенном Королевстве (UKPDS — United Kingdom Prospective Diabetes Study) по СД второго типа. Эти исследования ясно продемонстрировали взаимосвязь между значениями HbA_{1c} как индикатора уровня гликемии и долгосрочными осложнениями сахарного диабета [5].

В то же время выяснилось, что результаты измерений HbA_{1c} , полученные в лабораториях разных стран, были несопоставимы, а межлабораторный коэффициент вариаций достигал 11,2–20,1% [7]. Во-первых, это объяснялось использованием методик с различными аналитическими характеристиками, а во-вторых, отсутствием стандартизации международного уровня. Сопоставимость результатов на основе общей калибровки впервые предложена в 1984 году Peterson C. M. и соавт. [9], однако

лишь в 1993 году после публикации результатов DCCT профессиональное сообщество осознало важность международной стандартизации методов определения HbA_{1c}.

До недавнего времени наиболее широко была признана национальная программа стандартизации гликогемоглобина (NGSP — National Glycohemoglobin Standardization Program), в которой используется методика, применявшаяся для согласования результатов измерения HbA_{1c} в рамках DCCT. К сожалению, референсная система, поддерживающая стандартизацию NGSP и основанная на методе катионообменной хроматографии, была недостаточно специфичной, чтобы стать надежной опорой для международной стандартизации анализа в долгосрочной перспективе [5].

Система NGSP отличается двумя основными недостатками: представляемые результаты являются не истинными значениями HbA_{1c}, а скорее, наилучшими оценками, которые могут выдать технологии анализаторов HbA_{1c}, начиная с 1980-х годов (когда были спланированы DCCT и UKPDS), и отсутствие первичного референсного материала. Поэтому возникла необходимость установления «истинной» концентрации HbA_{1c} путем определения более точных средств его измерения с использованием «референсного метода» анализа [7].

В течение долгого времени методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) использовались в качестве референсных для стандартизации повседневных измерений, однако они не совсем специфичны для HbA_{1c} и, в зависимости от условий, эти методики позволяют измерять различные присоединяющиеся к гемоглобину вещества. По этой причине в середине 1990-х была создана рабочая группа по HbA_{1c} под эгидой Международной федерации клинической химии и лабораторной медицины (IFCC — International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine), предложившая первичный референсный материал, состоящий из очищенного

бета-N-концевого гликированного (HbA_{1c}) и негликированного (HbA₀) HbA, который и был применен для создания референсного метода IFCC для измерения HbA_{1c}. Данный метод основывается на выделении и количественном определении N-концевых гексапептидов HbA₀ и HbA_{1c}, полученных ферментативным расщеплением с помощью эндопротеиназы Glu-C. Затем пептиды можно отделить методом ВЭЖХ с обращенной фазой и количественно определить методом масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением (вариант А) или капиллярным электрофорезом (вариант В). По итогам голосования всех национальных организаций-членов IFCC данная процедура измерения была опубликована в 2002 году в качестве референсного метода, утвержденного IFCC [5, 7].

Ввиду того, что внедрение новой стандартизации породило многочисленные вопросы, совещание экспертов IFCC, Американской ассоциации диабетологов, Европейской ассоциации по исследованию диабета и Международной федерации диабета в 2007 году утвердило новую референсную систему IFCC в качестве единственной основы для проведения стандартизации измерений. Кроме того, было рекомендовано представлять результаты измерений в ммоль/моль без десятичных знаков (единица IFCC) и процентах с одним десятичным знаком (производных единицах NGSP) [10]. В сотрудничестве с диабетологическими организациями данные рекомендации уже внедрены во многих странах, но Российская ассоциация эндокринологов рекомендует опираться на значения HbA_{1c} в соответствии со стандартизацией NGSP [6, 11].

Отсутствие интерференции со стороны атипичных форм гемоглобина

Наряду с признанием HbA_{1c} «золотым стандартом» диабетологических исследований были выявлены ограничения в его применении, обусловленные потенциальными

интерференциями, встречающимися в различных клинических ситуациях.

За последние десятилетия было описано немало способов определения HbA_{1c}. Исследования HbA_{1c} можно разделить на методы, которые оценивают молекулярный заряд, в том числе катионообменная ВЭЖХ и электрофорез, или молекулярную структуру, к которым относятся иммуноанализ, боронатная аффинная хроматография и масс-спектрометрия. Согласно IFCC, наиболее надёжным методом признаётся масс-спектрометрия, которая, как правило, не зависит от присутствия генетической или химической модификации молекул HbA и/или HbA_{1c}, но стоимостные и технические требования исследования не позволяют широко использовать его в обычных лабораториях [12]. Информация о влиянии атипичных форм на различные методы определения HbA_{1c} регулярно размещается на сайтах NGSP [www.ngsp.org] и IFCC [www.ifcc-hba1c.net]. Значимость этой информации возрастает в связи с тем, что влияние атипичных вариантов гемоглобина на методы, основанные на принципах разделения, таких как ВЭЖХ или электрофорез, выше, чем на аффинные или иммунологические методы.

Серьёзной проблемой является то, что визуальная оценка результата метода разделения, например, хроматограммы не позволяет выявить патологические варианты гемоглобина, которые вследствие изменения заряда идентифицируются как HbA_{1c}. Показателен пример, приведённый Chen D. и соавт., когда у пациента при использовании метода ВЭЖХ (Bio-Rad Variant™) было получено значение HbA_{1c} 46%. Исследование этого образца иммунологическим методом установило, что содержание HbA_{1c} составляет только 3,8%. В данном случае причиной приведённых результатов явилось наличие у пациента атипичного гемоглобина Raleigh [13].

Более распространённой интерференцией является карбамиллированный гемоглобин, который образуется у пациентов с почечной

недостаточностью. Карбамелированный гемоглобин имеет заряд, схожий с HbA_{1c} и идентифицируется как HbA_{1c}, что является главной проблемой для определения гликированного гемоглобина методами электрофореза или ВЭЖХ [14]. Chen D. и соавт. отмечают, что методы ВЭЖХ и электрофореза удобны при необходимости обнаружения гемоглобина F и гемоглобина S, однако в ситуации, когда требуется установить точное содержание HbA_{1c}, необходимо использовать альтернативные методы определения гликированного гемоглобина, такие как иммунологический анализ на основе антител, специфических для гликированного N-терминальных остатков β-цепи [13]. Воспроизводимость иммунологического метода, в частности, коэффициент вариации HbA_{1c} на биохимическом анализаторе cobas c501 (Roche Diagnostics), позволяет использовать метод и для оценки изменений, возникающих под воздействием проводимой терапии [15].

Опасность атипичных вариантов гемоглобина связана с тем, что их присутствие может показывать как ложно завышенный, так и ложно заниженный результат HbA_{1c}. В большинстве случаев обнаружение парадоксально высокого уровня HbA_{1c} приведет к тому, что лаборатория начнет расследование, в то время как обратная ситуация остаётся незамеченной до ухудшения состояния пациента [13].

Lo V. M. H. и соавт. приводят пример получения ложно заниженного результата HbA_{1c} на системе VARIANT-II (Bio-Rad) у пациента с СД второго типа, поступившего для обследования в кардиологический центр. При лабораторном исследовании концентрация глюкозы натощак составила 9,6 ммоль/л, в то же время HbA_{1c} был 4,7%, что свидетельствовало о хорошем гликемическом контроле. При осмотре у пациента присутствовали изменения на коже нижних конечностей, которые соответствовали диабетической дермопатии. Неоднократные результаты HbA_{1c}, характерные для компенсированного СД, нормохром-

ные нормоцитарные эритроциты и отсутствие патологических находок в мазке периферической крови в течение предшествовавшего года наблюдения не создавали условий для сомнений в достоверности результата. Только развившееся осложнение СД потребовало провести дополнительные исследования, а прямое секвенирование гена β-глобина показало, что пациент был гетерозиготным по HbG Taiping, присутствие которого в образце и привело к неадекватной оценке состояния пациента [12].

Заключение

Рост заболеваемости сахарным диабетом второго типа, длительное бессимптомное течение и инвалидирующие осложнения позволяют отнести это страдание к неинфекционным эпидемиям XXI века. Расширенное использование HbA_{1c} для диагностики и контроля проводимой терапии при СД обеспечивают блестящее будущее для этого параметра. Поскольку обеспечение хорошего контроля гликемии зависит от точных и надежных средства лабораторного контроля, внедрение стандартизированных и минимально подверженных интерференции методов определения HbA_{1c} позволит использовать данный инструмент для улучшения гликемического контроля.

Список литературы

1. Guariguata L., Whiting D. et al. The International Diabetes Federation diabetes atlas methodology for estimating global and national prevalence of diabetes in adults. *Diabetes Res Clin Pract*, 2011; 94: 322–32.
2. Липатов Д. В., Александрова В. К. и соавт. Эпидемиология и регистр диабетической ретинопатии в Российской Федерации. *Сахарный диабет*, 2014, 1: 4–7.
3. Медицинская лабораторная диагностика: программы и алгоритмы. Под редакцией профессора Карпищенко А. И. Руководство для врачей. 3-е издание, переработанное и дополненное. Москва. Гозтар, 2014.
4. Oglesby A. K., Secnik K. et al. The association between diabetes related medical costs and glycemic control: a retrospective analysis. *Cost Eff. Resour. Alloc.*, 2006, 4: 1. doi: 10.1186/1478-7547-4-1.

5. Gillery Ph. A history of HbA_{1c} through Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clin Chem. Lab. Med.*, 2013; 51 (1): 65–74.
6. Дедов И. И., Шестакова М. В. и др. Консенсус совета экспертов Российской ассоциации эндокринологов (РАЭ) по инициации и интенсификации сахароснижающей терапии сахарного диабета второго типа. *Сахарный диабет*, 2011, 4: 6–16.
7. John G., English E. IFCC standardised HbA_{1c}: should the world be as one? *Clin. Chem. Lab. Med.* 2012; 50 (7): 1243–1248.
8. Plebani M. Exploring the iceberg of errors in laboratory medicine. *Clinica Chimica Acta*, 2009, 404: 16–23.
9. Peterson C. M., Jovanovic L. et al. A comparative evaluation of glycosylated haemoglobin assays: feasibility of references and standards. *Diabetologia*, 1984, 26: 214–7.
10. Consensus Committee. The American Diabetes Association, European Association for the Study of Diabetes, International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, and the International Diabetes Federation. Consensus statement on the worldwide standardization of the hemoglobin A_{1c} measurement. *Diabetes Care*, 2007, 30: 2399–2400.
11. Дедов И. И., Краснополский В. И., Сухих Г. Т. Российский национальный консенсус «Гестационный сахарный диабет: диагностика, лечение, послеродовое наблюдение». *Сахарный диабет*, 2012, 4: 4–10.
12. Lo V. M. H., Shiu K. M. E. et al. A spuriously «normal» haemoglobin A_{1c} result. *Ann. Clin. Biochem.* 2012, 49: 408–411 (408).
13. Chen D., Crimmins D. L. et al Hemoglobin Raleigh as the cause of a falsely increased hemoglobin A_{1c} in an automated ion-exchange HPLC method. *Clinical Chemistry*, 1996, 44 (6): 1296–1301.
14. Jaisson S., Pietrement C., Gillery P. Carbamylation derived products (CDPs): bioactive compounds and potential biomarkers in chronic renal failure and atherosclerosis. *Clin. Chem.* 2011; 57: 1499–1505.
15. Критерии выбора метода определения гликированного гемоглобина. Берестовская В. С., Ивашкина Т. М., Пашкова В. П. Справочник заведующего КДЛ. 2012, 10: 3–8.



К вопросу о применении коммерческих транспортных сред для взятия патологического материала при обследовании на дифтерию



О.Ю. Борисова



И.А. Чагина



Н.Т. Гадуа

О.Ю. Борисова, д.м.н., рук. лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций

И.А. Чагина, м.н.с. лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций

Н.Т. Гадуа, к.м.н., с.н.с. лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций

ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (МНИИЭМ Роспотребнадзора), г. Москва, Россия

Use of commercial transport media for the pathological material sample for examination of diphtheria

O. Y. Borisova, I. A. Chagina, N. T. Gadua

Institute for Epidemiology and Microbiology n.a. G. N. Gabrichevsky, Moscow, Russia

Резюме

Основной задачей лабораторной диагностики дифтерийной инфекции является идентификация возбудителя дифтерии с помощью минимального количества диагностических тестов, необходимых, достаточных и специфичных для получения достоверного ответа в максимально сжатые сроки (3–4 дня с момента обследования). Одним из важнейших этапов исследования является преаналитический этап — взятие и доставка патологического материала, от которого зависит эффективность проведения и своевременность выдачи окончательного ответа. В настоящей работе проведены сравнительные экспериментальные исследования, позволяющие прогнозировать эффективность бактериологической диагностики дифтерийной инфекции при их применении. Показано, что использование коммерческих транспортных сред, предназначенных для исследования на микрофлору ротоглотки и носа, приводит к потере патологического материала при обследовании на дифтерию.

Ключевые слова: лабораторная диагностика, дифтерия, взятие материала, тампоны.

Summary

The main objective of laboratory diagnostics of a diphtheria infection is identification of the causative agent of diphtheria by means of the minimum quantity of the troubleshooting tests necessary, sufficient and specific to obtaining the authentic answer in most short time (3–4 days from the moment of inspection). One of the major investigation phases is the preanalytic stage — a capture and delivery of a pathological material on which efficiency of carrying out and timeliness of issue of the final answer depends. In the present work the comparative pilot researches, allowing to predict efficiency of bacteriological diagnostics of a diphtheria infection at their application are conducted. It is shown that use of the commercial transport environments intended for research on microflora, leads to loss of a pathological material at inspection on diphtheriae.

Key words: laboratory diagnostics, diphtheriae, material capture, tampons.

Введение

Дифтерия до конца 1950-х годов представляла серьезную проблему для здравоохранения. Массовая иммунизация населения позволила обеспечить значительное снижение заболеваемости и смертности от этой инфекции. По данным Якимовой Т. Н., Максимовой Н. М. и Маркиной С. С. [1], в последней трети ушедшего века отмечены два эпидемических периода дифтерии в России. За последние 11 лет регистрируется спорадическая заболеваемость дифтерией, и показатели снизились в 63 раза с 0,63 до 0,0035 на 100 тыс. населения.

Однако, несмотря на очевидные успехи проводимой в течение 50 лет массовой иммунизации населения, актуальность проблемы дифтерии в условиях спорадической заболеваемости сохраняется. Поддержание эпидпроцесса обусловлено наличием скрытых источников инфекции и коргорты лиц, восприимчивых к инфекции, заболеваемостью среди привитых, продолжающейся регистрацией тяжелых форм, в ряде случаев заканчивающихся летальным исходом, а также бактерионосительством.

Система бактериологической диагностики дифтерии, используемая на территории Российской Федера-

ции, создавалась и разрабатывалась на протяжении многих лет несколькими поколениями исследователей и практических микробиологов, среди которых ведущая роль принадлежит сотрудникам МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского. Бактериологическое исследование проводят с целью лабораторной диагностики дифтерии, выявления источников инфекции, подтверждения эпидемиологических связей и наблюдения за распространением токсигенных коринебактерий дифтерии [2]. Основной задачей является идентификация возбудителя дифтерии с помощью минимального количества

диагностических тестов, необходимых, достаточных и специфичных для получения достоверного ответа в максимально сжатые сроки (3–4 дня с момента обследования), что имеет еще большее значение в условиях спорадической заболеваемости.

Одним из важнейших этапов бактериологического исследования, от которого зависит эффективность проведения и своевременность выдачи окончательного ответа, является преаналитический этап исследования: взятие и доставка патологического материала. Поэтому целью исследования была оценка возможности использования коммерческих транспортных сред для взятия патологического материала в экспериментальных условиях.

Материалы и методы

Экспериментальные исследования проводили на токсигенном штамме *Corynebacterium diphtheriae* (*C. diphtheriae*) биовара *gravis* № 665, полученном из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», который регламентирован действующими методическими указаниями по лабораторной диагностике дифтерийной инфекции (МУК 4.2.3065–13 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции») в качестве контрольного штамма при проверке качества питательных сред для первичного посева патологического материала. Бактериальную культуру *C. diphtheriae* выращивали на кровяном агаре (в качестве основы использовали сухой питательный агар производства «Микроген», г. Махачкала) при 37 °С в течение 24 часов. Далее делали линейки десятикратных разведений путем последовательного разведения бактериальной культуры в стерильном физиологическом растворе в соответствии со стандартным образцом 10 ед. мутности (ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России). В эксперименте готовили три параллельные линейки разведений. В работе использовали разведения бактериальной культуры в трех концентрациях — 5×10^4 , 5×10^3 и 10^3 м. т./мл, два по-

следних из которых применяются при проведении контроля качества питательных сред для первичного посева патологического материала. Все разведения контролировали путем высева по 100 мкл из каждого разведения на кровяно-теллуритовую среду, используемую для первичного посева патологического материала. Модельные эксперименты проводили на искусственно инфицированных образцах, которые готовили путем пулирования тампонов приготовленными разведениями трех концентраций бактериальной культуры в количестве 100 мкл. Каждую концентрацию бактериальной культуры пулировали на три тампона. В качестве коммерческих тампонов использовали сухие коммерческие тампоны и коммерческие тампоны с транспортной средой Стюарта и Эймса. В качестве питательных сред для сравнительных исследований использовали ГРМ-бульон (ГНЦПМБ, Оболенск) и бульон ВНИ (HiMedia, Индия).

Результаты

По данным аналитических материалов по организации исследований на дифтерию, для взятия патологического материала в некоторых регионах страны стали использовать коммерческие транспортные среды Стюарта и Эймса импортного производства, в состав которых входят солевые буферы, что может приводить к потере патологического материала уже на преаналитическом этапе исследования. Поэтому нами проведены сравнительные экспериментальные исследования, позволяющие прогнозировать эффективность бактериологической диагностики дифтерийной инфекции при их применении.

В эксперименте «имитировали» условия работы лечебно-профилактических организаций по хранению тампонов с патологическим материалом на дифтерию до их транспортировки в бактериологическую лабораторию: на столе при комнатной температуре (6 и 20 часов), в холодильнике (6 и 20 часов), в термостате (6 часов) и в термостате до утра (20 часов). После пулирования бактериальной взвеси первую партию тампонов помещали в ГРМ-бульон, в ВНИ-бульон, в тубу с транспортной средой Эйм-

са и в тубу с транспортной средой Стюарта и оставляли на столе при комнатной температуре до вечера (6 часов); вторую часть тампонов помещали в ГРМ-бульон, в ВНИ-бульон, в тубу с транспортной средой Эймса и в тубу с транспортной средой Стюарта и оставляли на столе при комнатной температуре до утра (20 часов); третью партию тампонов помещали в ГРМ-бульон, в ВНИ-бульон, в тубу с транспортной средой Эймса и в тубу с транспортной средой Стюарта и оставляли в холодильнике до вечера (6 часов); четвертую партию тампонов помещали в ГРМ-бульон, в ВНИ-бульон, в тубу с транспортной средой Эймса и в тубу с транспортной средой Стюарта и оставляли в холодильнике до утра (20 часов); пятую партию тампонов помещали в ГРМ-бульон, в ВНИ-бульон, в тубу с транспортной средой Эймса и в тубу с транспортной средой Стюарта и оставляли в термостате при 37 °С до вечера (6 часов); шестую партию тампонов помещали в ГРМ-бульон, в ВНИ-бульон, в тубу с транспортной средой Эймса и в тубу с транспортной средой Стюарта и оставляли в термостате при 37 °С до утра (20 часов). После инкубации все тампоны засевали на кровяно-теллуритовую среду для первичного посева патологического материала. Учет культурально-морфологических свойств выросших колоний учитывали через 24 и 48 часов роста, согласно МУК 4.2.3065–13 раздела контроля качества питательных сред для первичного посева патологического материала, где питательная среда считается пригодной для использования при наличии роста колоний из концентрации 5×10^3 и единичных колоний из концентрации 10^3 .

Проведенные исследования показали (табл. 1), что сохранение патологического материала на тампоне в ГРМ- и ВНИ-бульонах при комнатной температуре или в холодильнике 6 часов, то есть в условиях транспортировки материала вечером, приводило к снижению высеваемости возбудителя дифтерии в 19–11,8 и 15,0–10,4 раз соответственно, в концентрации 5×10^3 и позволяло выделить единичные колонии возбудителя дифтерии в концентрации 10^3 , в то время как помещение патологического мате-

Таблица 1

Результаты эффективности высеваемости трех концентраций бактериальной культуры на различных питательных средах

Концентрация бактериальной культуры	При комнатной температуре 6 часов			
	ГРМ-бульон	ВНИ-бульон	Среда Эймса	Среда Стюарта
5×10^4	38,4 / 38,9	148,3 / 149,8	1,0 / 1,1	1,0 / 1,2
5×10^3	8,7 / 8,9	14,2 / 14,3	0 / 0	0 / 0
10^3	2,0 / 2,1	7,0 / 7,2	0 / 0	0 / 0
	При комнатной температуре 20 часов			
	ГРМ-бульон	ВНИ-бульон	Среда Эймса	Среда Стюарта
5×10^4	43,3 / 45,6	150,1 / 150,2	1,0 / 1,1	1,0 / 1,1
5×10^3	7,7 / 7,8	18,1 / 18,3	0 / 0	0 / 0
10^3	1,8 / 2,0	6,0 / 6,2	0 / 0	0 / 0
	В холодильнике при 4 °С 6 часов			
	ГРМ-бульон	ВНИ-бульон	Среда Эймса	Среда Стюарта
5×10^4	50,4 / 50,8	101,3 / 101,7	1,0 / 1,0	1,0 / 1,1
5×10^3	11,1 / 11,9	16,1 / 16,2	0 / 0	0 / 0
10^3	2,0 / 2,0	5,8 / 6,1	0 / 0	0 / 0
	В холодильнике при 4 °С 20 часов			
	ГРМ-бульон	ВНИ-бульон	Среда Эймса	Среда Стюарта
5×10^4	17,2 / 17,8	40,2 / 40,7	1,0 / 1,0	1,0 / 1,1
5×10^3	4,8 / 4,9	10,2 / 10,3	0 / 0	0 / 0
10^3	2,0 / 2,0	5,7 / 6,2	0 / 0	0 / 0
	В термостате при 37 °С 6 часов			
	ГРМ-бульон	ВНИ-бульон	Среда Эймса	Среда Стюарта
5×10^4	364,2 / 366,1	340,2 / 342,1	23,2 / 23,4	15,1 / 15,8
5×10^3	62,4 / 62,8	58,3 / 60,1	1,0 / 1,0	0 / 0
10^3	8,2 / 8,4	7,9 / 8,1	0 / 0	0 / 0
	В термостате при 37 °С 20 часов			
	ГРМ-бульон	ВНИ-бульон	Среда Эймса	Среда Стюарта
5×10^4	Сплошной рост	Сплошной рост	38,1 / 40,1	30,3 / 31,2
5×10^3	87,2 / 87,8	88,3 / 89,1	12,1 / 12,2	10,2 / 10,4
10^3	15,2 / 15,4	16,9 / 17,1	0 / 0	0 / 0
Контрольные высевы на кровяно-теллуритовую среду				
5×10^3	168,2 / 170,5			
10^3	18,5 / 24,4			

Примечание: результаты представлены после роста через 24 и 48 часов.

Заключение

Следовательно, при взятии патологического материала на дифтерию во второй половине дня необходимо его помещение в транспортную среду, приготовленную только в лабораторных условиях на основе ГРМ- или ВНИ-бульонов и его подращивание в условиях термостата. Использование коммерческих транспортных сред, предназначенных для исследования на микрофлору ротоглотки и носа, приводит к потере патологического материала при обследовании на дифтерию.

Список литературы

1. Якимова Т. Н., Маркина С. С., Максимова Н. М. Дифтерия сегодня. // Здоровье населения и среда обитания. — 2013. — № 12 (249). — С. 18–19.
2. Методические указания. МУК 4.2.3065–13 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции». // Е. Б. Ежлова, А. А. Мельникова, Н. А. Кошкина, М. В. Зароченцев, И. В. Новокшонова, И. К. Мазурова, О. Ю. Борисова, С. Ю. Комбарова, В. Г. Мельников, Н. М. Максимова, Т. Н. Якимова, Н. Я. Салова, И. П. Требуных. // Москва: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. — 2013. — 63 с. — 200 экз. — ISBN 978–5–7508–1195–3.



«Эпидбиомед-диагностика»



- Национальный дистрибьютор Российских препаратов.
- Работает с более чем 2 500 клиентов.
- Логистическое обеспечение.
- Минимальные сроки поставки.
- Доставка в любую точку мира.
- Более 10 тысяч наименований продукции.

***Высокое качество обслуживания
и доступные цены***

**Широкий ассортимент товаров на складе
следующих производителей:**

ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава РФ

ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора РФ п. Оболенск

ФГУП НИИВС ФМБА, г. Санкт-Петербург

БИОКОМПАС, г. Углич

НИЦФ, г. Санкт-Петербург

К Вашим услугам:

Единая справочная служба.

Доставка любыми видами транспорта.

Автоматическое формирование заказа.

Эпидбиомед-диагностика предлагает:

ИФА тест системы

Оборудование

Биохимию

***Диагностируйте на диагностике
от «Эпидбиомед-диагностика»***

ООО «Эпидбиомед-диагностика»

111672, г. Москва, ул. Салтыковская, д. 26, стр. 1,

Тел.: (495) 7-999-000, E-mail: zakaz@epidbiomed-d.ru

www.epidbiomed-d.ru



Опыт применения анализатора мочи UF-1000i Sysmex с технологией проточной цитофлюорометрии: быстрое получение результата, повышение клинической значимости анализа и существенный экономический эффект

Л. И. Станкевич, к.м.н., медицинский директор

Научно-методический центр клинической лабораторной диагностики «СИТИЛАБ», г. Москва

Experience of using UF-1000i Sysmex urine analyzer with a method of flow cytometry: improving the clinical significance of results, faster diagnosis and significant economic effect

L.I. Stankevich

Scientific and Methodological Center of Clinical Laboratory Diagnostics CITILAB, Moscow, Russia

Резюме

Анализ целого ряда клинических случаев (пациенты с острым циститом, с пиелонефритом, грибковыми и вирусными инфекциями, заболеваниями почек, аутоиммунными заболеваниями) демонстрирует значительный потенциал анализа мочи методом проточной цитофлюорометрии для более быстрой и точной диагностики по сравнению с ранее применявшимися методами. Использование анализатора UF-1000i Sysmex с технологией проточной цитофлюорометрии для исследования элементов осадка мочи дает целый ряд преимуществ: 1) нет необходимости накапливать, центрифугировать и обрабатывать образцы мочи перед исследованием, что значительно улучшает преаналитический этап; 2) результат с полной информацией об элементах осадка мочи уже через одну минуту позволяет принять решение о выдаче результата либо о необходимости дальнейшей работы с образцом (микроскопия, посев мочи); результаты анализа мочи передаются в ЛИС и могут быть выведены на печать либо отправлены лечащему врачу очень быстро (в течение нескольких минут); 3) более точная информация о лейкоцитах в моче: точный подсчет и выявление не только нейтрофилов, но и лимфоцитов; 4) быстрая количественная дифференцировка гематурии: выявление и подсчет нативных и измененных эритроцитов; 5) нет необходимости дополнительных анализов для подсчета форменных элементов в камере; 6) бактериурия теперь становится аналитическим параметром, количественный результат счета бактерий уже в скрининговом анализе мочи. Точный отбор образцов с признаками инфекций мочевыводящих путей, которые необходимо отправить на посев в бактериологическую лабораторию; 7) применение данных технологий приводит к значительному экономическому эффекту.

Ключевые слова: анализ мочи, лейкоцитурia, гематурия, бактериурия, UF-1000i.

Summary

Analysis of a number of clinical cases (patients with cystitis, pyelonephritis, fungal and viral infections, kidney disease and systemic autoimmune diseases) demonstrate the great potential of flow cytometry urine analysis comparison with the previously used methods. The use of UF-1000i Sysmex analyzer for urine screening has the following advantages: 1) there is no need to store and centrifuge samples before analysis — the best pre-analytical stage; 2) information about urine sediment for 1 minute, therefore fast and accurate decision about the need for further work with the samples; all urine sediment results are in the LIS and may be transmitted to physicians very fast; 3) identify the leucocytes in the urine more precisely: not only neutrophils, but also lymphocytes; accurate count of the number (all this is not possible with the other techniques); 4) fast and reliable differentiation of hematuria: changed and native erythrocytes in the urine; accurate count of the number (all this is not possible with the other techniques); 5) no need for additional analyzes to counts in the chamber; 6) never before the count of bacteriuria in the urine was so simple, fast and accurate. Now we can sort the samples for the urine culture very accurately (all this is not possible with the other techniques); 7) the use of the UF-1000i Sysmex machine results in a significant cost savings.

Key words: urine analysis, leucocytes in the urine, hematuria, bacteriuria, UF-1000i.

Введение

Анализ мочи является, пожалуй, одним из самых старых диагностических тестов в истории медицины, но до сих пор это исследование не потеряло своей актуальности. Простота получения биоматериала для анализа и его информативность обуславливают значимость исследования мочи не только для диагностики заболеваний почек [1] и мочевыводящих

путей [3–5], но и для целого ряда системных заболеваний [6–9] а также в оценке общего состояния организма и у взрослых и у детей [10].

Эволюция методов анализа мочи значительно отставала от технического прогресса в других отделах лабораторной медицины. И хотя до настоящего времени исследование мочи с помощью тест-полосок, микроскопия осадка мочи и подсчет

форменных элементов осадка мочи по методу Нечипоренко составляют основу большинства диагностических выводов [11], предложенный новый метод проточной цитофлюорометрии для анализа осадка мочи привел к значительному прогрессу в этой области [12].

Автоматизированные проточные цитофлюориметры UF-1000i и UX-2000 (Sysmex) предоставля-

ют результаты анализа мочи в течение минуты и определяют все необходимые параметры осадка мочи: лейкоциты (WBC), эритроциты (RBC), клетки плоского эпителия (EC), другие малые округлые клетки (SRC) (почечный эпителий, переходный эпителий мочевого пузыря и другие клетки), цилиндры гиалиновые (CAST), цилиндры патологические (Path.CAST), бактерии (BACT), дрожжевые клетки (YLC), кристаллы (X'TAL), сперматозоиды (SPERM), слизь (MUCUS) [13]. Автоматическая станция анализа мочи UX-2000 Sysmex, помимо прочего, объединяет на одной платформе анализ методом сухой химии (тест-полоски) и анализ осадка мочи с помощью цитометрии. Использование данных анализаторов позволяет дифференцировать гематурию, выявить бактериурию и воспаление (подозрение на инфекции мочевыводящих путей [ИМП]), разделить бактериальную и микотическую инфекцию уже на этапе обычного скрининга образцов мочи. Кроме этого, появление аппаратуры такого класса делает анализ мочи строго количественным и полностью отменяет необходимость считать форменные элементы вручную в камере. Результаты выдаются в количестве элементов осадка на единицу объема мочи. Этот факт привел к значительным изменениям референсных значений для анализа мочи [12] и требует времени и определенных усилий для пересмысливания критериев основных мочевых синдромов и стандартов диагностики.

Цель работы

Исследовать диагностические возможности автоматизированного анализатора UF-1000i Sysmex в качестве инструмента для общего анализа мочи и на примере конкретных клинических случаев оценить преимущества использования технологии проточной цитофлюорометрии для исследования мочевого осадка.

Материалы и методы

В работе проанализированы характерные клинические случаи за период последних пяти лет, для которых анализ мочи был значимым на первичном этапе диагностики. Образцы мочи от взрослых и детей поступали в лабораторию по направлению лечащих врачей с кратким анамнезом.

Учитывая высокую чувствительность проточных цитофлюориметров, особое внимание уделяли правилам преаналитики. Для получения клинически значимых результатов критически важны правильная подготовка пациента к анализу мочи, строгое соблюдение правил гигиены при сборе образца, а также хранение и транспортировка мочи [8, 14–17]. В соответствии с международными рекомендациями [18–20], все пациенты перед сбором мочи получали письменную инструкцию с иллюстрациями. В ней подробно и доступно излагались правила подготовки к анализу, процедура сбора средней порции мочи, правила хранения и транспортировки образца. В случае детей инструкции получали

родители или лица, ответственные за сбор материала на анализ. Мочу собирали и доставляли в лабораторию в одноразовых контейнерах для мочи. Для детей раннего возраста при невозможности собрать порцию мочи в контейнер допускалось использование специальных педиатрических систем сбора мочи [21, 22]. При поступлении в лабораторию с помощью специального переходника 10 мл мочи переносили в вакуумные пробирки для мочи BD Vacutainer без добавок. Хранение и транспортировка образцов мочи крайне важны для стабильности форменных элементов осадка [23], поэтому в работе рассматриваются только результаты образцов, анализ которых производили не позднее двух часов после взятия образца мочи.

При интерпретации количественных результатов форменных элементов использовались классические референсные интервалы для точного подсчета лейкоцитов, эритроцитов и цилиндров по зарубежным данным: для эритроцитов: менее 5 кл/мкл [24]; для лейкоцитов: менее 10 кл/мкл [24]; цилиндры: менее 1 шт/мкл [25, 26].

Результаты и обсуждение

Пациенты с синдромом гематурии

Клинический случай № 1

Пациент 1: ребенок пяти лет, пол женский. Обратились амбулаторно с симптомами общего недомогания. Результаты тест-полоски: все показатели в норме, повышен уровень уробилиногена (68 мкмоль/л при норме 0–17 мкмоль/л), обнаружен билирубин (50 мкмоль/л, в норме не обнаруживается). В результатах с анализатора UF-1000i Sysmex (рис. 1): незначительная гематурия, кристаллы в значительном количестве. При подробном анализе характера выявленных эритроцитов (рис. 2) очевидно, что 92,8% эритроцитов в образце не измененные (Large-RBC). Это позволило исключить подозрение на заболевание почек. В анализе крови: повышены уровни билирубина, ферментов АСТ и АЛТ, иммуногло-

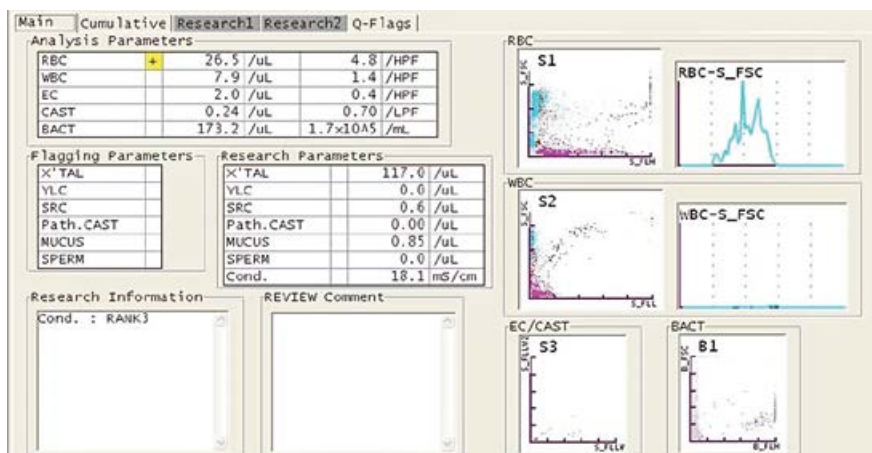


Рисунок 1. Пациент 1, результаты с UF-1000i.

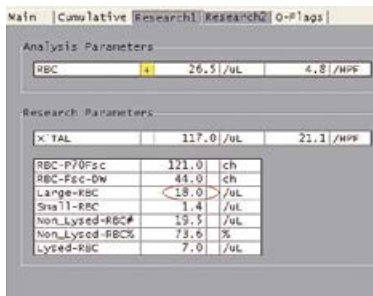


Рисунок 2. Пациент 1, результаты с UF-1000i: параметры эритроцитов (RBC).

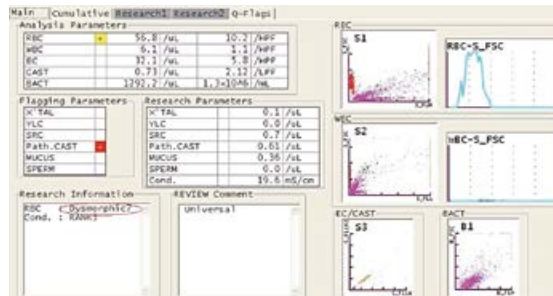


Рисунок 3. Пациент 2, результаты с UF-1000i: параметры эритроцитов (RBC).

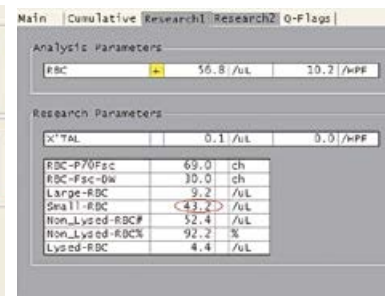


Рисунок 4. Пациент 2, результаты с UF-1000i: параметры эритроцитов (RBC).

булина IgM. Окончательный диагноз: острый вирусный гепатит А. Таким образом, в данном случае мы имеем сопутствующую острому вирусному заболеванию гематурию. Наблюдаемые в моче кристаллы — это кристаллы билирубина.

Клинический случай № 2

Пациент 2: женщина 47 лет. Направлена участковым терапевтом на анализ мочи в рамках общего обследования. Результаты тест-полоски: эритроциты 50 эр./мкл, лейкоциты — отрицательно, белок — отрицательно. В результатах с анализатора UF-1000i Sysmex (рис. 3): гематурия, обнаружены цилиндры гиалиновые и с наложениями, бактериурия (1,3 млн бакт./мл). Счет лейкоцитов в норме. В специальном меню появилось предупреждающее сообщение о том, что в образце присутствуют дисморфные эритроциты (рис. 3). При подробном анализе характера выявленных эритроцитов (рис. 4) становится ясным, что 82,5% эритроцитов в образце дисморфные (Small-RBC). Несмотря на отрицательную реакцию на белок по данным сухой химии, счет цилиндров на анализаторе указывал на их наличие. Микроскопия осадка при тщательном просмотре позволила найти и подтвердить наличие единичных гиалиновых цилиндров в препарате (рис. 5). Данный случай мог быть классифицирован как случай инфекции с синдромом гематурии и цилиндрурии, однако точное определение характера эритроцитов в образце и выявление цилиндров позволило сделать заключение, что ведущими в данном случае являются гематурия (эритроциты почечно-го происхождения) и протеинурия

(несмотря на данные тест-полоски) и рассматривать бактериурию, как вторичный синдром. Пациентка была направлена к нефрологу для дальнейшего обследования.

Клинический случай № 3

Пациент 3: ребенок четырех месяцев, пол мужской. При осмотре педиатром — заключение, что ребенок здоров. Однако мама настаивала, что при мочеиспускании ребенок проявляет беспокойство. Педиатр не был уверен, рассматривать ли это как симптом какой-либо патологии, и для правильного решения был назначен анализ мочи. Резуль-

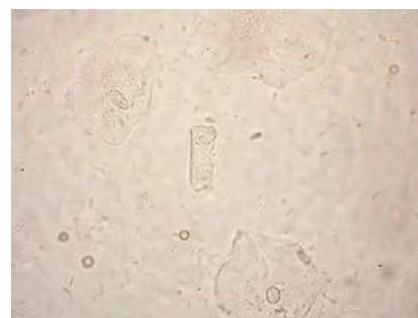


Рисунок 5. Пациент 2, микроскопия осадка мочи (×400).

таты тест-полоски: все показатели в норме. В результатах с анализатора UF-1000i Sysmex (рис. 6): незначительная гематурия (эритроциты не измененные) и бактериурия, которая верифицирована только благодаря точному количественному счету бактерий и сравнению с точным референсным интервалом для детей ($1,2 \times 10^4$ /мл) [27]. Счет лейкоцитов в норме. В данном случае был сделан вывод об ИМП. Наблюдаемая гематурия — сопутствующая инфекции. Посев мочи на плотные питательные среды дал рост E. Coli (10^6 КОЕ/мл). Ребенку подтвержден диагноз: ИМП, и назначена адекватная терапия.

Таким образом, анализатор UF-1000i Sysmex дает возможность быстрой количественной дифференцировки гематурии: выявление и подсчет нативных (неизмененных, внепочечного происхождения) и сморщенных эритроцитов (измененных, почечного происхождения), что невозможно при применении других технологий. Нет необходимости дополнительных анализов для подсчета эритроцитов в камере.

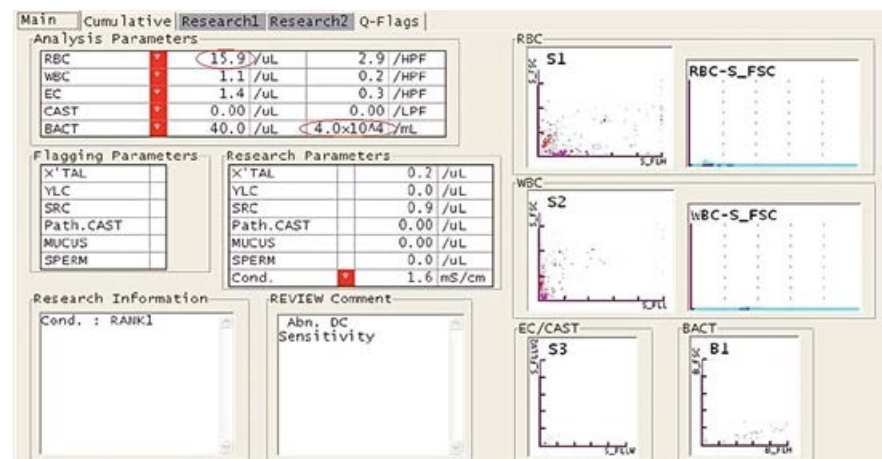


Рисунок 6. Пациент 3, результаты с UF-1000i.

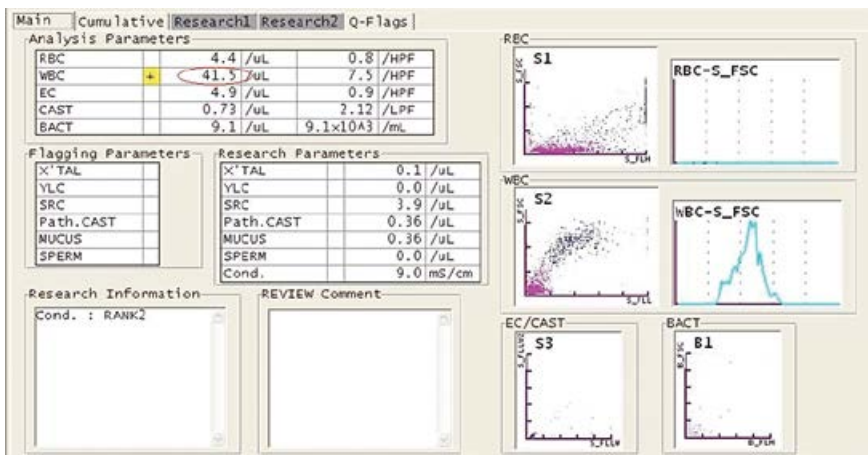


Рисунок 7. Пациент 4, результаты с UF-1000i.

Пациенты с синдромом лейкоцитурии, не связанной с ИМП

Клинический случай № 4

Пациент 4: мужчина 18 лет. Заболевание началось остро: общее недомогание, слабость, поднялась температура выше 38 °С. Первые семь дней заболевания он находился под наблюдением участкового терапевта с подозрением на ОРВИ. Однако состояние пациента не улучшилось, температура не снижалась. Лечащий врач начинает подозревать пиелонефрит и назначает анализ мочи. Результаты тест-полоски: все показатели в норме. В результатах с анализатора UF-1000i Sysmex (рис. 7): лейкоцитурия 41,5 кл/мкл. Бактериурии нет (за критерий бактериурии у взрослых принимали количество бактерий в образце более 10⁵/мл). Разница данных по лейкоцитам с тест-полоски (эстеразная реакция)

и точного счета лейкоцитов методом цитометрии, подтверждающая их наличие, объясняется тем, что в образце присутствовали лимфоциты. По результатам окрашенного мазка лимфоциты составляли 80% лейкоцитов в образце. Полученный результат позволял лечащему врачу исключить ИМП и продолжить диагностический поиск. Однако в этот момент пациент был госпитализирован из-за ухудшающегося состояния, и полученными на анализаторе UF-1000i данными пренебрегли. В лечебном учреждении был сделан анализ мочи по Нечипоренко, по результатам которого (лейкоциты 10 500/мл при норме до 2 000/мл; эритроциты 1 500/мл при норме до 1 000/мл) «подтвердили» подозрение на пиелонефрит, и начали проводить антибиотикотерапию. Пациенту в течение трех недель были проведены три разных курса антибиотикотерапии без какого-либо кли-

нического эффекта. Все показатели общего анализа мочи оставались без динамики в этот период, однако резко нарастали креатинин в крови и С-реактивный белок (до уровней выше 100 мг/л). Только после этого был снят первоначальный диагноз, и назначен курс преднизолона. После начала гормональной терапии наблюдалось резкое улучшение состояния пациента и нормализация показателей крови. Окончательный диагноз: серонегативное системное аутоиммунное заболевание. Данный случай демонстрирует, что объективный факт отсутствия бактериурии (по данным проточной цитометрии) давал возможность сразу принять правильное решение и снять подозрение на ИМП. Применение методов, которые не дают такой информации (традиционный общий анализ мочи и анализ мочи по Нечипоренко), привело к ошибочному диагнозу и неправильному лечению пациента.

Таким образом, анализатор UF-1000i Sysmex дает более точную информацию о лейкоцитах в моче: количественный подсчет и выявление не только нейтрофилов, но и лимфоцитов. Нет необходимости дополнительных анализов для подсчета лейкоцитов в камере.

Пациенты с подозрением на ИМП

Клинический случай № 5

Пациент 5: женщина 80 лет с подозрением на ИМП. Результаты тест-полоски: реакция на лейкоциты (нейтрофилы) положительная — 500 кл/мкл, реакция на эритроциты положительная — 500 кл/мкл, реакция на белок положительная — 0,25 г/л, тест на нитриты отрицательный. В результатах с анализатора UF-1000i Sysmex (рис. 8): массивная лейкоцитурия (более 800 кл/мкл) и значительная бактериурия (10⁸ бакт./мл). Гематурия незначительная (не измененные эритроциты), обнаружены цилиндры (в основном гиалиновые). В специальном меню появилось предупреждающее сообщение о том, что в образце признаки ИМП (UTI?) (рис. 8). Врач получил подтверждение диагноза ИМП сразу же в этот день и на сутки ранее начал проводить адекватную

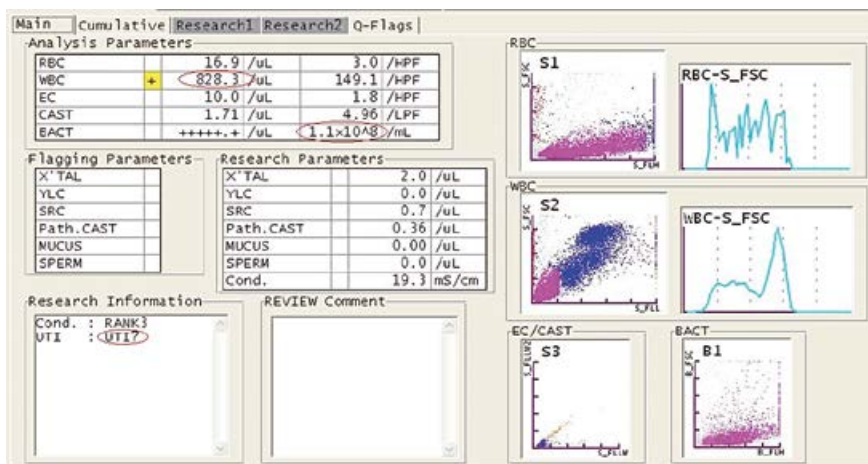


Рисунок 8. Пациент 5, результаты с UF-1000i.



Рисунок 9. Пациент 5, рост *Proteus* на хромагаре (уриселект).

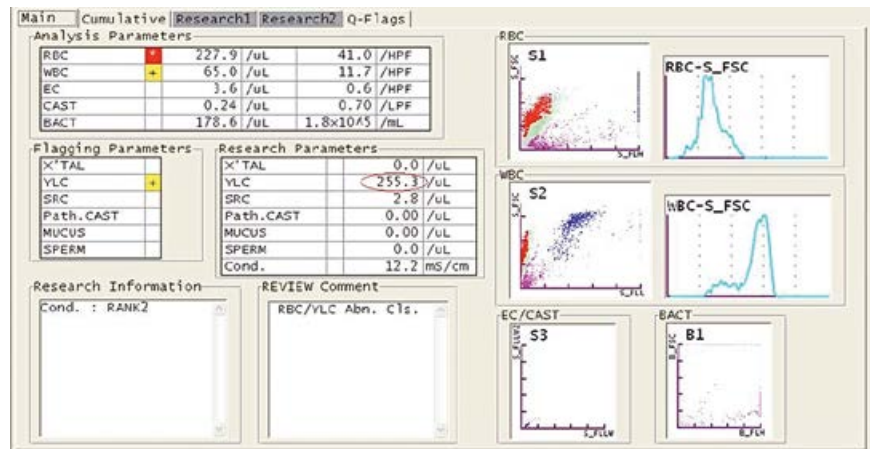


Рисунок 10. Пациент 6, результаты с UF-1000i.

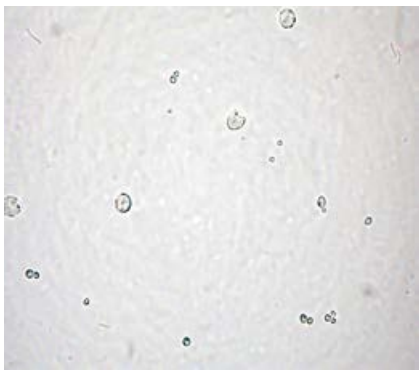


Рисунок 11. Пациент 6, микроскопия осадка мочи (x400).

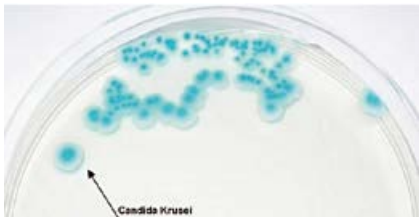


Рисунок 12. Пациент 6, рост колоний *Candida krusei* на хромагаре (кандиселект).

ненные). Обнаружены цилиндры (гиалиновые) и малые круглые клетки (переходный эпителий). Значимой бактериурии не обнаружено. В образце обнаружены грибковые дрожжеподобные клетки (YLC) (рис. 10), которые также выявлены в значительном количестве при микроскопии (рис. 11). Врач получил клинически значимую информацию в этот же день, что позволило быстро выбрать правильную терапию (назначение противогрибковых препаратов, а не антибиотиков). Пациентка была направлена к гинекологу, в посеве мазка из влагалища получен рост *Candida krusei* (10^3 КОЕ/мл) (рис. 12).

Клинический случай № 7

Пациент 7: мужчина 38 лет с симптомами дизурии. Направлен на анализ мочи урологом, которому нужно было быстро определиться с дифференциальным диагнозом (ИМП? Инфекции, передающиеся



Рисунок 14. Пациент 7, микроскопия осадка мочи (x400)

половым путем? Острый простатит?). Результаты тест-полоски: реакция на эритроциты отрицательная, на лейкоциты положительная, тест на нитриты отрицательный. В результатах с анализатора UF-1000i Sysmex (рис. 13): лейкоцитурия, гематурия (эритроциты не измененные). Обнаружены цилиндры (в основном гиалиновые) и малые круглые клетки (переходный эпителий). Значение бактериурии погра-

терапию. Образец был направлен в бактериологическую лабораторию на посев, получен рост *Proteus* (10^7 КОЕ/мл) (рис. 9). Гематурия и протеинурия (цилиндрурия) в данном случае — сопутствующие инфекции.

Клинический случай № 6

Пациент 6: женщина 33 лет с подозрением на ИМП. Результаты тест-полоски: реакция на лейкоциты и эритроциты положительная, тест на нитриты отрицательный. В результатах с анализатора UF-1000i Sysmex (рис. 10): лейкоцитурия, гематурия (эритроциты не изме-

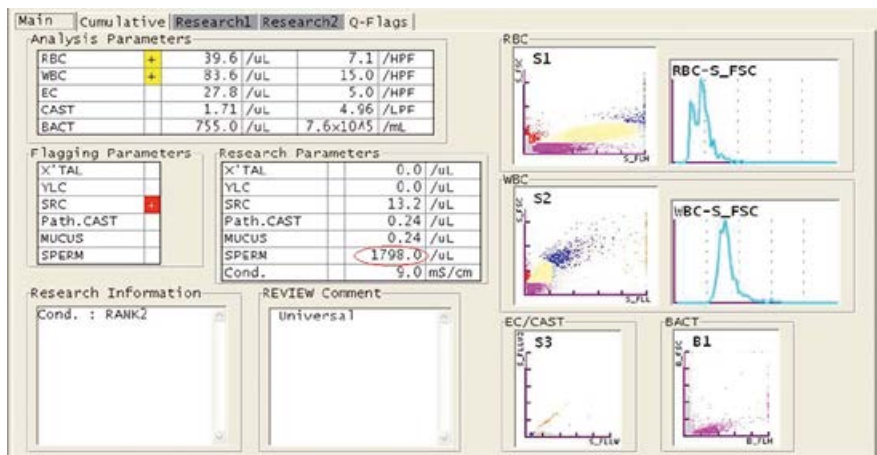


Рисунок 13. Пациент 7, результаты с UF-1000i.

ническое ($7,6 \times 10^5$ бакт/мл). В образце обнаружены в большом количестве сперматозоиды (рис. 13), которые также выявлены в значительном количестве при микроскопии (рис. 14). Пациент был направлена к урологу для дальнейшей диагностики, в результате которой выяснилось, что полученная картина наблюдалась на фоне восходящей хламидийной инфекции.

Становится очевидным, что никакие другие технологии не дают возможности точного количественного подсчета бактерий в моче на этапе скрининга. С анализатором UF-1000i Sysmex бактериурия становится аналитическим параметром: возможно получить количественный результат, сравнить его с референсным значением и сделать вывод о наличии бактериурии. Становится возможным точный отбор образцов с признаками ИМП, которые необходимо отправить на посев в бактериологическую лабораторию.

Выводы

1. Применение анализатора мочи UF-1000i Sysmex на этапе скрининга в качестве альтернативы традиционной микроскопии осадка мочи позволяет решить проблемы преаналитического этапа при исследовании мочи.
2. Результаты, получаемые на анализаторе UF-1000i Sysmex, более быстрые и более информативные.
3. Результаты анализа мочи на анализаторе UF-1000i Sysmex имеют высокую клиническую диагностическую значимость.
4. Применение технологий проточной цитометрии для анализа элементов осадка мочи приводит к значительному экономическому эффекту: снижению количества единиц персонала, необходимого для анализа мочи, уменьшению количества расходных материалов, снижению необоснованных назначений посевов мочи.

Список литературы

1. Horowitz Gary L., Chairholder M.D. CLSI C28-A3. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory. // Approved guideline. 3rd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute. — 2008. — Nov, 01.
2. Тареева И. Е. Новые данные о механизмах прогрессирования гломерулонефрита. // *Materia Medica.* — 1995. — № 2. — С. 5–19.
3. Kouri T., Fogazzi G., Gant V., Hallander H., Hofmann W., Guder W. European Urinalysis Guidelines. // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* — 2000. — № 60. — С. 1–96.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. Urinalysis and collection, transportation, and preservation of urine specimens. // Approved guideline GP16-A3. 3rd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. — 2009.
5. Лоран О.Б. Эпидемиологические аспекты инфекций мочевыводящих путей. // *Материалы международного симпозиума «Инфекции мочевыводящих путей у амбулаторных больных».* Москва. 1999. С. 5–8.
6. Kouri T., Fogazzi G., Hallander H., Hofmann W., Guder W. European urinalysis guidelines. // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* — 2000. — № 60. — С. 1–96.
7. Manoni F., Caleffi A., Gessoni G., et al. L. esame delle Urine Chimico Morfologico e Culturale: Proposta di Linee Guida per una Procedura Standardizzata della Fase Per-Analitica. // *Biochim. Clin.* — 2011. — № 35. — С. 131–139.
8. Caleffi A., Manoni F., Alessio M.G., Ottorano C., Lippi G. Quality in extra-analytical phases of urinalysis. // *Biochem. Med.* — 2010. — № 20. — С. 179–183.
9. Caleffi A., Manoni F., Alessio M.G., Ottorano C., Lippi G. Quality in extra-analytical phases of urinalysis. // *Biochem Med.* — 2010. — № 20. — С. 179–183.
10. Лабораторные и инструментальные исследования в диагностике: справочник. // Пер. с англ. В.Ю. Халатова; под ред. В.Н. Титова. Москва: ГЭОТАР-МЕД. 2004. 960 с.
11. Лабораторные методы исследования в клинике: справочник. // Под ред. проф. В.В. Меньшикова. Москва: «Медицина», 1987. 368 с.
12. Manoni F., Gessoni G., Alessio M.G. et al. Gender, s equality in evaluation of urine particles: Results of a multicenter study of the Italian Urinalysis Group. // *Clinical Chimica Acta.* — 2014. — Vol. 427. — С. 1–5.
13. Terajima Sh., Yokomizo H., Yagi A. et al. Evaluation Study for Reference Intervals of Urine Sediments Using UF-1000i in Medical Checkup Population. // *Sysmex Journal Intern.* — 2009. — Vol. 19, № 1.
14. Coppens A., Speeckaert M., Delanghe J. The pre-analytical challenges of routine urinalysis. // *Acta Clin. Belg.* — 2010. — № 65. — С. 182–188.
15. Veljkovic K., Rodrigues-Capote K., Bhayana V., Pickersgill R., Bettie J., Clark L. et al. Assessment of a four hour delay for urine samples stored without preservatives at room temperature for urinalysis. // *Clin. Biochem.* — 2012. — № 45. — С. 856–858.
16. Roelofs-Thijssen M.A., Schreuder M.F., Hogeveen M., van Herwaarden A.E. Reliable laboratory urinalysis results using a new standardised urine collection device. // *Clin. Biochem.* — 2013. — № 46. — С. 1252–1256.
17. Kouri T., Vuotari L., Pohjavaara S., Laippala P. Preservation of urine for flow cytometry and visual microscopic testing. // *Clin Chem.* — 2002. — № 48. — С. 900–905.
18. Manoni F., Gessoni G., Alessio M.G. et al. Mid-stream vs. first-voided urine collection by using automated analyzers for particle examination in healthy subjects: an Italian multicenter studi. // *Clin. Chem. Lab. Med.* — 2011. — № 20. — С. 679–684.
19. Whiting P., Westwood M., Bojke L., Palmer S., Richardson G., Cooper J. et al. Clinical effectiveness and cost-effectiveness of tests for the diagnosis and investigation of urinary tract infection in children: a systematic review and economic model. // *Health Technol. Assess.* — 2006. — № 10. — С. 1–154.
20. Manoni F., Gessoni G., Alessio M.G. et al. Pediatric reference values for urine particle quantification by using automated flow cytometer: Results of a multicenter study of Italian urinalysis group. // *Clinical Biochemistry.* — 2013. — Vol. 46. — С. 1820–1824.
21. Rao S., Houghton C., Macfarlane P.I. A new urine collection method: pad and moisture sensitive alarm. // *Arch. Dis. Child.* — 2003. — № 88. — С. 836.
22. Rao S., Bhatt J., Houghton C., Macfarlane P. An improved urine collection pad method: a randomised clinical trial. // *Arch. Dis. Child.* — 2004. — № 89. — С. 773–775.
23. Manoni F., Valverde S., Caleffi A., Alessio M.G., Silvestri M.G., De Rosa R. et al. Stability of common analytes and urine particles stored at room temperature before automated analysis. // *RIMel-IJLM.* — 2008. — № 4. — С. 192–198.
24. Хейль В., Коберштейн П., Цавта Б. Референтные пределы у взрослых и детей. Преаналитические предосторожности. // *Лабпресс.* — 2001.
25. Manoni F., Tinello A., Fornasiero L. et al. Urine particle evaluation: a comparison between the UF-1000i and quantitative microscopy. // *Clin. Chem. Lab. Med.* — 2010. — № 48. — С. 1107–1111.
26. Zaman Z., Fogazzi G.B., Garigali G., Croci M.D., Bayer G., Kranicz T. Urine sediment analysis: analytical and diagnostic performance of sediMAX — a new automated microscopy image-based urine sediment analyser. // *Clin. Chim. Acta.* — 2010. — № 411. — С. 147–154.
27. Маянский Н. А., Мотузова О. В., Калакуцкая А. Н., Семикина Е. Л., Катосова Л. К. Скрининг бактериурии у детей с помощью автоматизированной проточной цитометрии на анализаторе Sysmex UF-1000i. // *Вопросы диагностики в педиатрии.* — 2011. — Том 3, № 3.



Проточная цитофлуориметрия для анализа мочи

Скрининг бактериурии быстрее, чем посев

Технология проточной цитофлуориметрии новый шаг в подсчете бактерий

- Специфическое окрашивание бактерий и возможность подсчета до 65 000 частиц позволяет получить высокую аналитическую чувствительность метода
- Возможность обнаружение инфекций, вызванных как бактериями, так и дрожжеподобными клетками
- Результат анализа доступен через 1 минуту, это позволяет увеличить пропускную способность Вашей лаборатории
- Исключение микробиологических посевов мочи для отрицательных образцов по бактериурии



Sysmex Europe GmbH
Bornbarch 1, 22848 Norderstedt, Germany
Phone +49 (40) 52726-0 · Fax +49 (40) 52726-100
info@sysmex-europe.com
www.sysmex-europe.com

ООО «Сисмекс РУС»
123290, Россия, Москва,
1-й Магистральный тупик, д. 11, стр. 10
БЦ «Ярд», офис 1020
Тел. / факс +7 (495) 781-67-72



sysmex



М.С. Макаров



В.Б. Хватов



Н.В. Боровкова

Оценка клеточного компонента биотрансплантатов с помощью витального окрашивания

М.С. Макаров, научный сотрудник
В.Б. Хватов, проф., д.м.н., зав. отделением
О.И. Конюшко, к.б.н., с.н.с.
М.В. Сторожева, научный сотрудник
Н.В. Боровкова, д.м.н., зав. отделением
И.Н. Пономарев, научный сотрудник

ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского» департамента здравоохранения г. Москвы

Evaluation cellular component biotransplantat using vital staining

M.S. Makarov, V.B. Khvatov, O.I. Konyushko, M.V. Storozheva, N.V. Borovkova, I.N. Ponomarev

Резюме

Разработан оригинальный метод морфофункционального анализа клеток в составе биотрансплантатов, основанный на использовании витальных флуорохромных красителей. Витальное окрашивание позволяет оценить динамику заселения трансплантата клетками, их пролиферативную активность и структурную целостность.

Ключевые слова: биотрансплантат, витальное окрашивание, яркость поля зрения, целостность клеточных мембран.

Summary

We present original morphofunctional method of cell components' analysis in biotransplants, based on vital fluorochrome dyes use. Vital staining allows us to assess the dynamics of settling cells in the graft, their proliferative activity and structural integrity.

Key word: biotransplant, vital staining, brightness view field, cell membrane integrity.

В настоящее время клеточная и тканевая трансплантология рассматриваются как одно из перспективных направлений в лечении широкого спектра патологий [1, 2, 4]. Развитие клеточных технологий в области регенеративной медицины приводит к созданию новых композиционных материалов, совместимых с клетками, производству трехмерных тканеподобных структур, разработке новых биологически активных материалов на основе тканей человека и животных, созданию композиционных биотрансплантатов с различными носителями, включающими живые клетки [4]. При этом неизбежно возникает проблема объективного контроля количества и качества клеток в составе комбинированного биотрансплантата. В настоящее время наиболее адекватным подходом к оценке биологической полноценности прикрепленных клеток в составе биотрансплантатов представляется использование методов флуоресцентной и конфокальной микро-

скопии, позволяющих выявить клетки как на поверхности, так и внутри исследуемого трансплантата [6, 8–12]. Большинство таких методов основано на изучении флуоресценции фиксированных препаратов, что создает определенные трудности в анализе клеточного компонента биотрансплантата в динамике, не позволяет достоверно оценить функциональную пригодность клеток. Эту проблему можно решить путем использования витальных (прижизненных) флуорохромных красителей, которые позволяют оценить структурную целостность и функциональную активность клеток в составе исследуемого трансплантата без предварительной фиксации.

В 2012–2013 годах в НИИ СП им. Н.В. Склифосовского был разработан способ оценки клеточного компонента биотрансплантатов [5] с помощью витального окрашивания культивируемых клеток флуорохромами трипафлавином и родамином С. Трипафлавин обладает высокой проникаю-

щей способностью и в небольших концентрациях не вызывает нарушений компонентов клеточного ядра. Родамин С интенсивно окрашивает мембранные структуры клеток и также не взаимодействует с ядрами клеток [7]. Кроме того, оба этих красителя обладают способностью в течение длительного времени (до семи суток) сохранять свечение в составе окрашенных клеток [3, 5]. Растворы трипафлавина и родамина С готовят на 0,15 М фосфатном буфере в соотношении 1:2000–1:5000, затем оба красителя смешивают в соотношении 1:1 и разводят в десять раз 0,15 М фосфатным буфером для длительных исследований (более трех суток) или 0,9-процентным раствором NaCl для краткосрочных исследований. Для окраски 1 см² биотрансплантата с клетками требуется 2–10 мкл рабочего раствора красителя. Оценка витально окрашенной культуры клеток в биотрансплантате проводят с помощью флуоресцентного микроскопа в полуавтоматическом режиме. Для

Таблица 1
Действие витального красителя на основе трипафлавина и родамина С на биологическую полноценность культивируемых клеток разных типов

Тип культуры	Наличие витального красителя в культуре клеток	Количество клеток в культуре (тысяч) на 1 чашку Петри	Индекс пролиферации	Время, образования монослоя (суток)	Содержание мертвых клеток в культуре на разных сроках пассирования, (%)	
Фибробласты линии M22	Отсутствует	156	2,86	5	0,1	0,5
	Присутствует	150	2,75	5	0,2	0,5
Фибробласты кожи донора тканей	Отсутствует	120	1,9	7	1,1	5,0
	Присутствует	125	1,7	7	1,5	6,0
Мезенхимальные стволовые клетки костного мозга человека	Отсутствует	35	2,10	19	0,2	0,7
	Присутствует	28	1,94	20	0,3	1,0
Хондробласты человека	Отсутствует	180	2,95	4	0,1	0,2
	Присутствует	190	2,90	4	0,1	0,5
Фибробласты кожи крысы	Отсутствует	140	2,3	7	0,5	2,0
	Присутствует	150	2,2	7	0,5	2,5

получения флуоресцентного изображения используют зеленый светофильтр (λ возбуждения 510–560 нм, λ эмиссии от 590 нм). С помощью фотокамеры при экспозиции 1–4 секунд получают цифровые изображения клеток, которые переносят в компьютер. Единичей анализа является одно поле зрения микроскопа, которое составляет 5 мм² площади культуры клеток или матрикса. Для морфометрического исследования клеток, оценки яркости свечения одного поля зрения используют программу Adobe Photoshop. В экспериментах установлено, что окрашенные витальным красителем трипафлавином и родамином С клетки культуры сохраняют свои пролиферативные свойства и жизнеспособность (табл. 1, рис. 1); индекс пролиферации, время формирования монослоя, соотношение живых и мертвых клеток в культуре и на биотрансплантатах в группе без и после окрашивания витальными флуорохромными красителями были идентичными (табл. 1). Результаты этих исследований обосновывают адекватность проведения предложенной морфофункциональной оценки различных клеточных культур с помощью прижизненного окрашивания трипафлавином и родамином С.

В ходе анализа определяют следующие параметры

1. Количество прикрепленных клеток на единицу площади биотрансплантата (тыс./см²)

Количество прикрепленных клеток (КПК) на единицу площади оценивают по интенсивности свечения

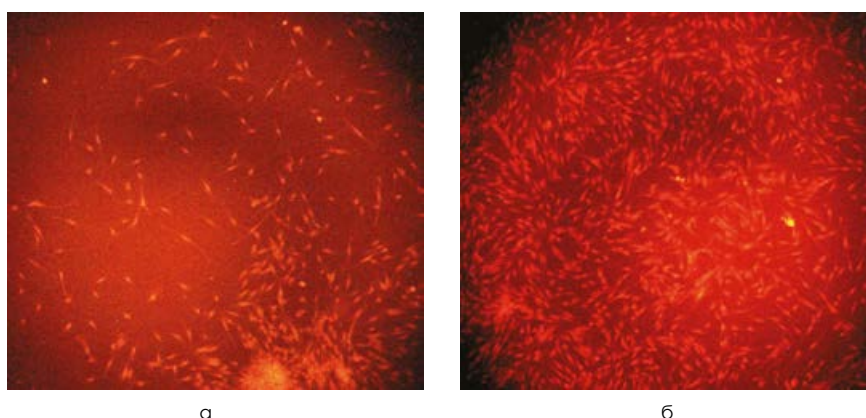


Рисунок 1. Флуоресцентная микроскопия витально окрашенных клеток (фибробласты человека линии M22) на коллагеновой повязке через а) одни сутки и б) трое суток культивирования. Увеличение $\times 60$.

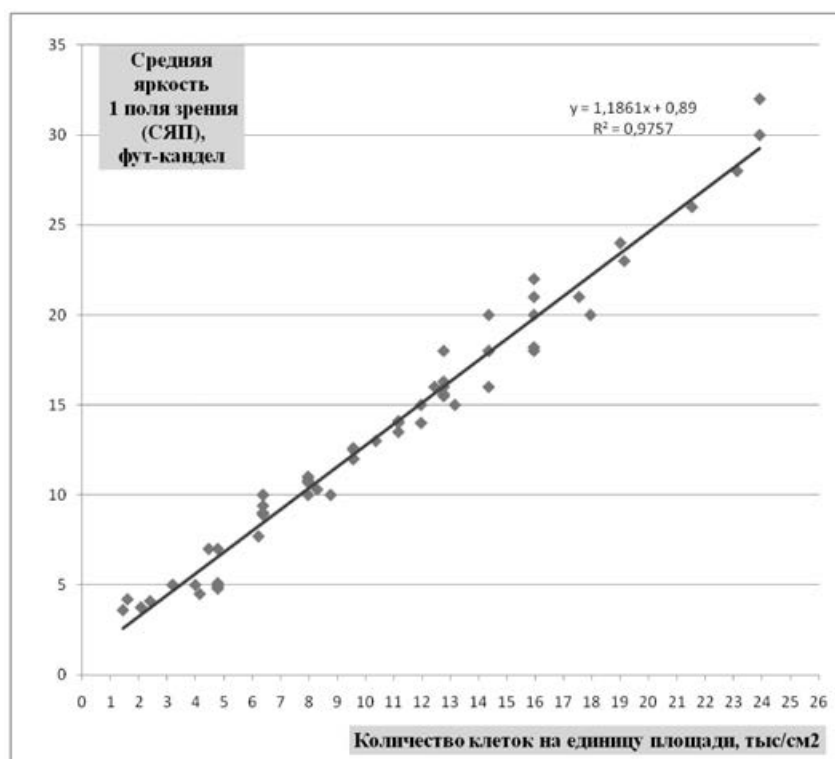


Рисунок 2. Общая калибровочная кривая зависимости средней яркости поля зрения (СЯПЗ) от количества прикрепленных клеток (тыс./см²).

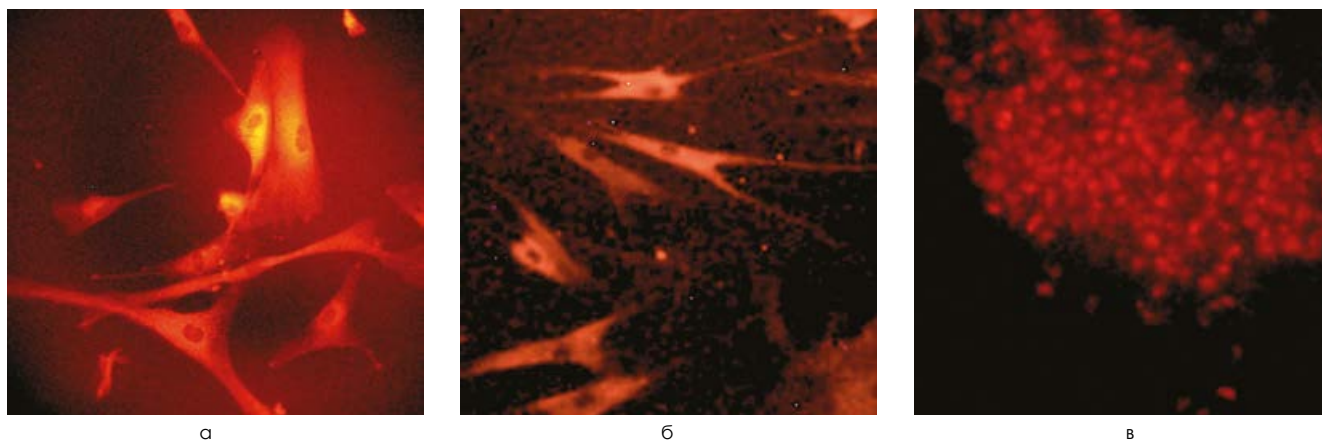


Рисунок 3. Флуоресцентная микроскопия витально окрашенных клеток человека разных типов на коллагеновой повязке: а) фибробласты линии М-22, б) мезенхимальные стволовые клетки костного мозга человека, в) тромбоциты человека. Увеличение $\times 800$.

(яркости) стандартного (5 мм^2) поля зрения микроскопа с клетками, витально окрашенными трипафлавином и родамином С. Между интенсивностью свечения стандартного поля зрения (в фут-канделах) и количеством клеток в стандартном поле зрения флуоресцентного микроскопа выявлена тесная корреляционная связь, подтвержденная уравнением $y = 1,1861x + 0,89$ (рис. 1, где ось ОХ — количество клеток на единицу площади, тыс./ см^2 , ось ОУ — средняя яркость одного поля зрения, фут-кандел). КПК определяют с помощью калибровочной кривой (рис. 2), отражающей зависимость количества клеток на единицу площади дна культурального флакона, чашки Петри или биотрансплантата от интенсивности свечения поля зрения микроскопа (5 мм^2). Для многих типов клеточных культур человека калибровочные кривые имеют сходный вид, поэтому для оценки КПК можно изначально использовать стандартную калибровочную кривую (рис. 2); в тех случаях, когда размер клеток сильно отличается от размера фибробластов, например, тромбоциты (рис. 3 в) и клетки-предшественники буккального эпителия, необходимо построение специальной калибровочной кривой.

Для построения калибровочной кривой определяют количество клеток в 1 мл анализируемой клеточной суспензии с помощью счетной камеры Фукс-Розенталя или проточного цитометра. В несколько чашек Петри (от 4 до 7) диаметром 4 см, содержащих культуральную среду, вносят суспензию с известным числом биологически полноценных клеток, например, 50, 75, 100, 125, 150 и 200 тысяч. После

этого чашки Петри помещают в термостат при 37°C на 24 часа для полного оседания и распластывания клеток. Затем чашки Петри вынимают из термостата, удаляют из них культуральную среду, окрашивают культуру клеток с помощью трипафлавина и родамина С, из расчета 2–10 мкл на 1 см^2 площади поверхности. На внешней стороне дна чашки Петри с помощью маркера вписывают квадрат, разделенный на девять одинаковых квадратов, общая площадь которых составляет не менее 70% от площади дна чашки. Чашку помещают на предметный столик флуоресцентного микроскопа. Регистрируют (объектив $\times 4$) изображение по трем полям зрения микроскопа в каждом из девяти квадратов. Далее изображение переносят в компьютер и с помощью программы Adobe Photoshop оценивают яркость каждого поля зрения (в фут-канделах), рассчитывают среднюю яркость свечения одного стандартного (5 мм^2) поля зрения микроскопа по формуле, выражают в фут-канделах. Среднюю яркость поля зрения (СЯПЗ) определяют как отношение суммарной яркости свечения обследованных полей зрения к числу обследованных полей зрения. На основании известного числа биологически полноценных клеток в каждой чашке и значений СЯПЗ строят калибровочные кривые для различных типов клеток, показывающие связь между КПК и СЯПЗ.

2. Индекс пролиферации клеточной культуры на биотрансплантате

Индекс пролиферации (ИП) отражает ростовую активность популяции клеток в культуре, показывая

во сколько раз общее количество прикрепленных клеток (ОКПК) на данный день пассирования превышает число клеток на первый день пассирования. ИП зависит от типа клеток и от сроков их культивирования.

На основании данных ОКПК, полученных в ходе длительного наблюдения культуры клеток (например, в динамике в течение семи суток), можно рассчитать индекс пролиферации клеточной культуры в чашке Петри или на биотрансплантате.

Индекс пролиферации рассчитывают по формуле:

$$\text{ИП} = \frac{\text{ОКПК}_{\text{анализируемый}}}{\text{ОКПК}_{\text{исходный}}}$$

3. Целостность клеточных мембран (в баллах)

Целостность клеточных мембран (ЦКМ) отражает жизнеспособность и биологическую полноценность клеток, находящихся в составе биотрансплантата. ЦКМ оценивают по интенсивности свечения культивируемых клеток. Для этого во флуоресцентном микроскопе анализируют 100–150 витально окрашенных флуорохромами трипафлавином и родамином С клеток на исследуемой поверхности. Полученное цифровое изображение переносят в компьютер. С помощью программы Adobe Photoshop оценивают интенсивность свечения (яркость) каждой клетки; параллельно можно провести анализ общей морфологии исследуемых клеток: их формы, размера, внутреннего содержимого (рис. 3). Определяют среднюю яркость одной клетки в фут-канделах. ЦКМ оценивают в баллах, где 1 балл соответствует 1 фут-канделе. В разных клеточных культурах ЦКМ

Таблица 2

Оценка клеточного компонента в составе биотрансплантатов на разных сроках культивирования

	СЯПЗ, фут-кандел	КПК, клеток/см ²	ОКПК (общее число клеток)	ИП	ЦКМ, баллы	Заключение
Коллагеновая повязка с фибробластами М-22 через 3-е суток культивирования	11,8	9 198	1 324 542	1,9	35	Клеточная культура в норме. Биотрансплантат рекомендуется для клинического использования
Коллагеновая повязка с фибробластами М-22 и сыворотки крови человека через 3-е суток культивирования	21,0	16 954	2 441 480	3,5	35	Клеточная культура в норме. Биотрансплантат рекомендуется для клинического использования
Дермальный матрикс кожи человека с фибробластами М-22 через 3-е суток культивирования	7,2	5 320	766 080	1,4	30	Количество клеток недостаточно. Рекомендуется дополнительное культивирование
Биотрансплантат на основе полимера гиалуроновой кислоты с фибробластами через 3-е суток культивирования	0,5	Клетки не прикрепились	Клетки не прикрепились	–	–	Клетки не адгезировали на носителе. Технология изготовления биотрансплантата неэффективна
Коллагеновая повязка с фибробластами М-22 через 6 суток культивирования	5,6	4 081	587 664	0,4	20	Массовая гибель клеток. Биотрансплантат не рекомендуется для клинического использования
Коллагеновая повязка с тромбоцитами человека через 1 сутки при 37 °С	6,6	112 000	14 400 000	–	19	Все тромбоциты в составе трансплантата инактивированы
Коллагеновая повязка с тромбоцитами человека через 1 сутки при 37 °С в присутствии тикагрелора	6,5	104 000	14 000 000	–	39	Тромбоциты сохраняют свою структурную целостность в составе трансплантата

варьируют от 25 до 50 баллов в зависимости от типа и размера клеток; при ЦКМ выше 50 баллов можно говорить о резком повышении секреторной активности клеток и их жизнедеятельности (гиперактивные клетки); напротив, у мертвых и разрушающихся клеток параметры ЦКМ имеют очень низкие значения (5–15 баллов).

В табл. 2 приводится пример подробного анализа клеток (фибробласты линии М-22 и тромбоциты человека) в составе биотрансплантатов на разных сроках культивирования. Видно, что динамика роста числа фибробластов М-22 и их биологическая полноценность сильно варьируют в зависимости от типа субстрата и условий культивирования. Необходимо особо подчеркнуть, что адгезия тромбоцитов на адгезивных субстратах сопровождается их массовой активацией и выбросом гранул, заметным снижением параметра ЦКМ тромбоцитов и приводит к резкому падению биологического потенциала этого клеточного компонента в составе биотрансплантата уже через 1 сутки. Вместе с тем, использование тикагрелора в качестве блокатора поздних стадий активации тромбоцитов позволяет стабилизировать (закрепить) биологически полноценные

тромбоциты на трансплантате без их необратимой активации — ЦКМ адгезированных тромбоцитов в присутствии тикагрелора соответствует нормальному исходному значению.

Разработанный метод позволяет оценить взаимодействие клеток с субстратами самых разных типов, независимо от структуры поверхности и оптической плотности исследуемого субстрата. Применение витальных флуорохромных красителей позволяет проводить длительные исследования клеток как в ручном, так и в автоматическом режиме. Этот метод перспективен для одновременного анализа большого числа препаратов помощью современных цитометров и биостанций.

Список литературы

1. Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии: Сборник тезисов четвертого всероссийского симпозиума с международным участием. // Под редакцией: акад. Миронова С. П. — СПб.: Изд-во «Человек и его здоровье», 2010. 334 с.
2. Грудянов А. И., Ерохин А. И., Миронова Л. Л., Конюшко О. И. Лабораторное исследование активности фибробластов в сочетании с различными видами подсадных материалов *in vitro*. // Цитология. — 2001. — Т. 43, № 9. — С. 854.
3. Макаров М. С., Сторожева М. В., Конюшко О. И., Боровкова Н. В., Хватов В. Б. Влияние концентрации тромбоцитарного фактора роста на пролиферативную

активность фибробластов человека // Клеточные технологии в биологии и медицине. — 2013. — № 2. — С. 111–115.

4. Материалы конгресса «I Национальный конгресс по регенеративной медицине» 4–6 декабря 2013 года, г. Москва — М., 2013. 325 с.
5. Патент РФ на изобретение № 2484472 от 10.06.2010, авторы: Макаров М. С., Хватов В. Б., Конюшко О. И., Сторожева М. В., Боровкова Н. В., Пономарев И. Н.
6. Пустовалова О. Л., Агапов И. И., Мойсенович М. М., Еремин П. С., Казюлина А. А., Архипова А. Ю., Рамонова А. А., Богуш В. Г., Севастьянов В. И., Кирпичников М. П. Использование метода конфокальной микроскопии для изучения биологических свойств матрикса из рекомбинантной паутины. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. — 2009. — Т. 11, № 2. — С. 54–59.
7. Ромейс Б. Микроскопическая техника. — М.: Издательство иностранной литературы, 1954. — С. 171–172.
8. Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, Yamada KM. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. // Science. — 2001. — № 294. — P. 1708–1712.
9. Grinnell F. Fibroblast motility in three-dimensional collagen matrices. // Trends Cell Biol. — 2003. — № 13. — P. 264–269.
10. Hein B., Willig K. I., Hell S. W. Stimulated emission depletion (STED) nanoscopy of a fluorescent protein-labeled organelle inside a living cell. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2008. — Vol. 105, № 38. — P. 14271–1427.
11. Pollard M. D., Eamshaw W. C. Cell Biology. — NY: Elsevier Science, 2007. — 928 с.
12. Shroff H., Galbraith C. G., Galbraith J. A., Betzig E. Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics. // Nat. Methods. — 2008. — Vol. 5. — P. 417–423.



Как измерить преаналитическое качество: алгоритм оценки и мониторинга

Е. В. Тиванова, врач высшей категории, руководитель отдела аналитического планирования Центра молекулярной диагностики ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора

Preanalytical Quality: how to measure? Practical recommendation

E. V. Tivanova



Е.В. Тиванова

Резюме

Статья посвящена оценке индекса гемолиза, как одного из индикаторов качества внелабораторной части преаналитического этапа с использованием алгоритма рабочей группы WG-LEPS IFCC. Алгоритм адаптирован для использования в централизованных лабораториях. Показано, что на основе предложенного алгоритма каждая лаборатория может разработать план по повышению преаналитического качества.

Ключевые слова: индекс гемолиза, преаналитический этап, индикатор качества, преаналитическое качество, стандартизация измерений.

Summary

The article is concentrated on using hemolysis index (HI) as a quality indicator of pre-preanalytical phase. The study based on WG-LEPS IFCC algorithm and adopted to use in community medical laboratories. It was noted that the each such laboratory is able to create a plan for continually improvement of preanalytical phase.

Key words: Hemolysis index, preanalytical phase, quality indicator, standardization of measurement.

Введение

Преаналитический этап — важная часть лабораторного исследования, которая может оказывать непосредственное влияние на результат. Тенденция развития лабораторной диагностики последнего десятилетия — организация крупных лабораторных комплексов по принципу «сети — центральная лаборатория» и большое количество филиалов — процедурных кабинетов. В таких условиях важное значение имеет стандартизация процедур взятия, первичной подготовки, хранения и транспортировки проб, так называемый пре-преаналитический этап. С этой целью Международная федерация клинической химии (IFCC) создала в 2009 году рабочую группу «Лабораторные ошибки и безопасность пациента» (Laboratory Errors and Patient Safety [WG-LEPS]). В 2011 году группой был опубликован отчет «Показатели качества в лабораторной медицине: от теории к практике» (Quality Indicators in Laboratory Medicine: from theory to practice), в котором было предложено использовать различные индикаторы качества на каждом этапе лабораторного исследования. Для преаналитического этапа наиболее доступным в исполнении нам

показался индикатор 10b — доля проб с индексом гемолиза более 50, что соответствует концентрации свободного гемоглобина более 5 г/л (500 мг/дл).

Материалы и методы

Определение индексов интерференции — гемолиза, иктеричности, липемии — в каждой пробе сыворотки крови, поступающей в клинико-диагностическую лабораторию Центра молекулярной диагностики ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора (ЦМД) проводится на автоматическом биохимическом анализаторе Architect c8000 (Abbott Diagnostics, США) с 2010 года. Эти три составляющие могут оказать влияние на результат измерения многих биохимических показателей. Результат измерения представлен относительной величиной, соответствующей определенной концентрации исследуемого интерферента. Обобщенные данные представлены в специальном руководстве для пользователей *Knowledge at Your Fingertip* (рис. 1). Использование в лаборатории программного обеспечения класса Middleware LabOnline (Omnilab, Италия) позволяет в зависимости от полученного значения автоматически заблокировать выполнение теста, для которого

измеренный индекс интерференции превышает критическое значение, указанное производителем в инструкциях к реагентам. Также программа дает возможность выполнить статистический анализ для установления доли гемолизированных проб в различные периоды времени как для всего пула проб в целом, так и для различных контрагентов.

Основываясь на стандарте ГОСТ Р ИСО 15189 и используя статистический анализ данных, в январе 2014 года была предпринята попытка проанализировать получаемые данные и решить следующие задачи:

1. установить уровень преаналитического качества в КДЛ ЦМД относительно европейских рекомендаций;
2. на основе полученных данных разработать программу мониторинга с целью повышения качества преаналитического этапа.

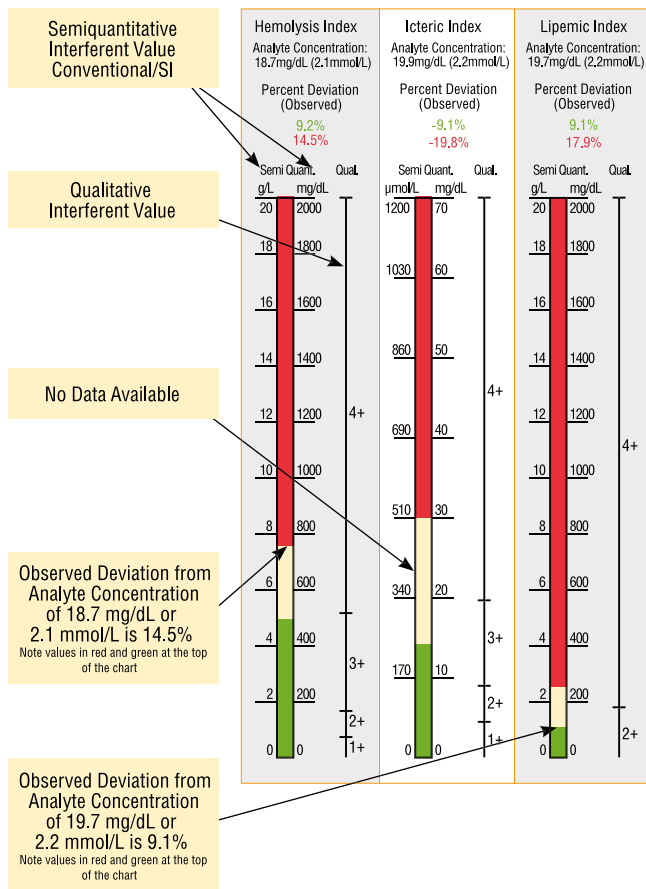
В соответствии с критериями качества преаналитического этапа, установленными WG-LEPS, образец относили к категории неприемлемых, если индекс гемолиза превышал 50. Установление уровня преаналитического качества проводилось в соответствии с рекомендациями WG-LEPS. Для получения первичных данных

Introducing the Sample Interference/ HIL Quick Reference Guide

Serum and plasma samples may contain constituents that can alter assay results. These constituents, commonly referred to as “interferents,” may alter results by two mechanisms:

- 1) chemical (i.e. the addition of analyte to a sample due to hemolysis)
- 2) spectral (i.e. the spectrum of the interferent adds to or subtracts from the absorbance due to the analyte).

Understanding the effect of interferents on an assay provides essential information regarding the validity of results. Abbott's Package Inserts contain quantitative data that indicate the assay's performance in the presence of common interfering substances: hemolysis, icterus and lipemia. The Sample Interference/ HIL Quick Reference is designed to provide your laboratory with this information in an easy to use graphical format. Here is a brief instruction on how to read the guide:

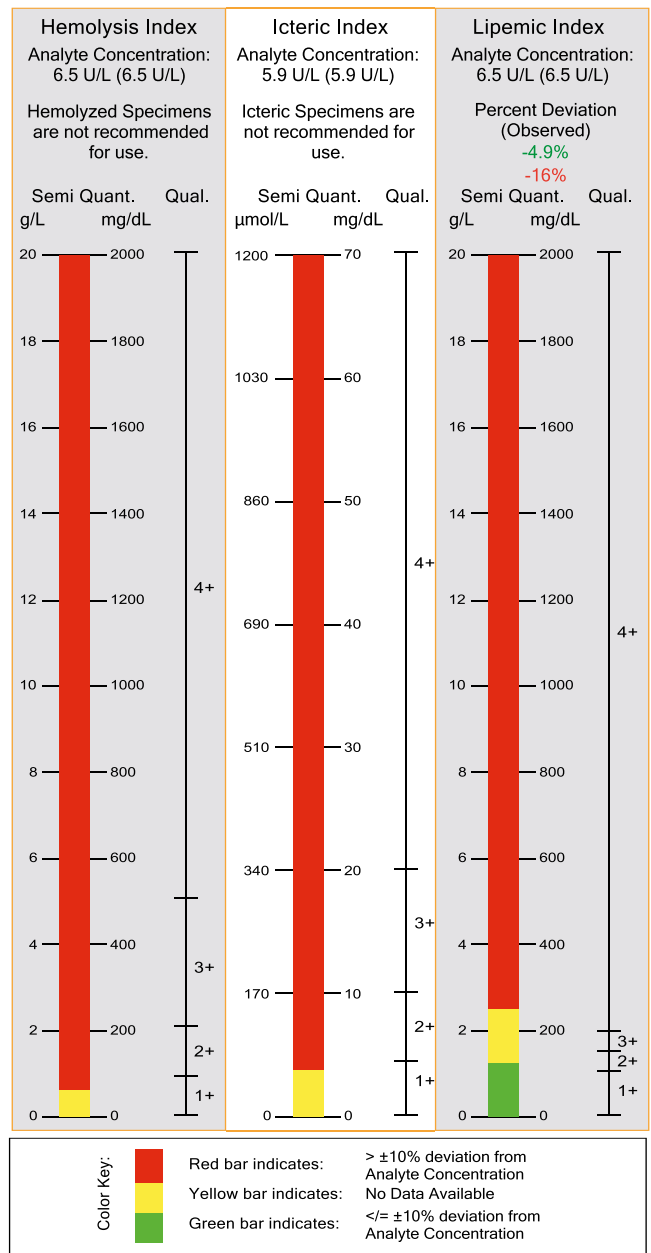


www.abbottdiagnostics.com
98-1484/R1-2.5 June 2008 Printed in USA

Clinical Chemistry Intro

BACK FOR ASSAY INFORMATION

Acid Phosphatase



See package insert for human triglyceride results.
General Chemistry
Abbott Clinical Chemistry Quick Reference Guide

www.abbottdiagnostics.com
98-1484/R1 / AE2611A

Рисунок 1.

был проанализированы результаты измерения гемоллиза в 8784 пробах сыворотки. Взятие крови производилось в пробирки для получения сыворотки с активатором свертывания и разделительным гелем после формирования сгустка и центрифугирования. Доля проб с индексом гемоллиза более 50 составила 2,73%.

В соответствии с алгоритмом, предложенным IFCC, за приемлемый уровень преаналитического качества рекомендовано принимать

медиану. Оптимальный и минимальный уровни устанавливаются на 25% ниже и выше медианы соответственно. Полученные данные представлены в табл. 1.

В связи с тем, что образцы поступают в лабораторию из различных медицинских учреждений — собственных процедурных кабинетов, процедурных кабинетов, открытых по программе франчайзинга и лечебно-профилактических учреждений (ЛПУ) различной формы

собственности, а время доставки не всегда удается контролировать, была предпринята попытка оценить долю проб с индексом гемоллиза более 50 у различных контрагентов. Анализ данных показал, что различия в доле гемоллизированных проб у разных контрагентов очень велики: от 0,01 до 33% (табл. 2).

Все ЛПУ были ранжированы по уровню преаналитического качества с использованием алгоритма WG-LEPS. (табл. 3).

Таблица 1
Установление уровня преаналитического качества на основе алгоритма WG-LEPS

Уровень преаналитического качества	Расчет интервала	Значение ЦМД	Значения WG-LEPS
Оптимальный	Более чем на 25 % ниже медианы	Менее 1,7	Менее 1,2
Приемлемый (желаемый)	На 25 % ниже медианы — медиана	1,7–2,2	1,2–1,6
Минимальный	Медиана — на 25 % выше медианы	2,2–2,7	1,6–2,0
Неприемлемый	Более чем на 25 % выше медианы	Более 2,7	Более 2,0

Таблица 2
Доля гемолизированных проб в различных ЛПУ

№ ЛПУ	Общее количество проб	Количество проб с H > 0,5 (HI > 50)	%
1	40	1	2,50
2	15	1	6,67
4	39	2	5,13
5	149	12	8,05
6	140	0	0,00
7	291	25	8,59
8	130	4	3,08
9	139	4	2,88
10	305	1	0,33
11	235	0	0,01
12	212	5	2,36
13	145	2	1,38
14	55	1	1,82
15	96	32	33,33
16	284	8	2,82
17	111	8	7,21
18	2155	12	0,56

Таблица 3
Ранжирование ЛПУ по уровню преаналитического качества

Уровень требований	Значение	Доля ЛПУ, %
Оптимальный	Менее 1,7	56
Приемлемый (желаемый)	1,7–2,2	16
Минимальный	2,2–2,7	8
Неприемлемый	Более 2,7	20

Таблица 4
Динамика долей ЛПУ, входящих в различные группы преаналитического качества после проведения дополнительного обучения

Уровень требований	Значение	Доля ЛПУ (%) до обучения	Доля ЛПУ (%) после обучения
Оптимальный	Менее 1,7	56	59
Приемлемый (желаемый)	1,7–2,2	16	22
Минимальный	2,2–2,7	8	7
Неприемлемый	Более 2,7	20	12

В каждом ЛПУ, входящем в группы минимального и неприемлемого качества, был проведен аудит на соответствие внутренним документам ЦМД «Руководство по преаналитическому этапу» и «Инструкция по отбору и хранению первичных проб» (приложение № 2 к договору), во время которого во всех ЛПУ были выявлены нарушения процедур, описанных в указанных документах. Во время аудита были выявлены различные нарушения преаналитического этапа: взятие крови персоналом, не прошедшим обучение в ЦМД; использование расходных материалов, не поставленных исполнителем; нарушение стандартной операционной процедуры взятия крови и т.д. В некоторых ЛПУ были зафиксированы два или более вида нарушений. По результатам аудита во всех ЛПУ было проведено дополнительное обучение, а затем повторный аудит. Анализ 23 583 образцов, полученных за последующий период, показал положительную динамику: как общее снижение доли гемолизированных проб с 2,73 до 2,19%, так и увеличение доли ЛПУ, входящих в состав групп оптимального и приемлемого качества преаналитического этапа (табл. 4).

Обсуждение

При сравнении данных, полученных WG-LEPS и ЦМД, создается впечатление, что уровень преаналитического качества в ЦМД не соответствует европейским критериям. Однако WG-LEPS отмечает, что в исследовании принимали участие всего восемь лабораторий, а результат измерения гемолиза не был стандартизован — использовалось не только различное оборудование, но и в части лабораторий измерение производилось визуально. Также из исследования WG-LEPS были исключены педиатрические образцы, а общее количество образцов вообще не указано. В нашем исследовании были проанализированы более 33 000 образцов, и мы не имели возможности исключить педиатрические образцы. Также измерение индекса гемолиза было стандартизовано. Все это дает нам основание использовать полученный в нашем исследовании

результат, как один из основных критериев оценки качества преаналитического этапа в конкретной лаборатории и инструмент для мониторинга и улучшения преаналитических процедур.

Заключение

Для определения уровня преаналитического качества лаборатория может использовать алгоритм, предложенный WG-LEPS. Однако целевые значения, установленные WG-LEPS, должны использоваться только как ориентировочные. Каждая лаборатория должна установить собственный первичный, базовый уровень преаналитического качества. Измерение гемолиза желательно стандартизовать, то есть использовать постоянно один и тот же метод, желательно инструменталь-

ный. Единственным методом контроля качества на преаналитическом этапе являются постоянные аудиты. Использование этого алгоритма в динамике позволяет разработать программу мониторинга и управления преаналитическим качеством на внелабораторном этапе.

Список литературы

1. Мошкин А. В. Оценка степени гемолиза на биохимическом анализаторе VITROS 5.1FS — возможный индикатор качества взятия и транспортировки проб. *Лаборатория*, 2011, № 3, с. 18-19.
2. Мошкин А. В. Индекс гемолиза как индикатор внелабораторной части преаналитического этапа лабораторного исследования.
3. Lippi G., Chance J. J., Church S., Dazzi P., Fontana R., Giavarina D., Grankvist K. et al. Preanalytical quality improvement: from dream to reality. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2011; 49 (7): 1118-1119.
4. Plebani M. The detection and prevention of errors in laboratory medicine. *Ann. Clin. Biochem* 2010; 47: 101-110.
5. Sciacovelli L. et al. Quality Indicators in Laboratory Medicine: from theory to practice. Preliminary data from the IFCC Working Group Project Laboratory Errors and Patient Safety. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49 (5): 835-844.
6. Клименкова О.А, Желтякова О.В, Берестовская В.С, Ларичева Е.С. Визуальная оценка гемолиза — взгляд на вершину айсберга. *Лаборатория*, 2013, № 3, стр. 43-47.
7. Lippi G., Cervellini G., Favaloro E. J., Plebani M. In Vitro and In Vivo Hemolysis. *De Gruyter*, 2012.
8. Plebani M. Harmonization of Quality Indicators in Laboratory Medicine. A preliminary consensus. *Clin. Chem. Lab. Med.*, De Gruyter, 2014.
9. Клименкова О.А, Желтякова О.В, Берестовская В.С, Гудимова И.В, Ларичева Е.С. Ошибки, которые совершать нельзя. К вопросу о преаналитическом качестве в педиатрической практике. *Медицинский Алфавит. Современная лаборатория № 4*, 2013 стр. 16-19.



Эффективность работы и перспективы развития диагностических служб регионов России обсудили на пресс-завтраке ассоциации IMEDA

Performance and prospects for the development of diagnostic services in the Russian regions were discussed at Association IMEDA press luncheon

22 июля 2014 года в Москве состоялся тематический пресс-завтрак ассоциации IMEDA на тему «Современная диагностика и (не) здоровье россиян».



Поводом к событию стал выпуск статистического отчета «Об оснащенности и эффективности работы диагностических служб медицинских организаций регионов РФ», подготовленного ассоциацией IMEDA совместно с отраслевым экспертом (консалтинговая группа «Эвентус»), д.м.н. М. А. Свещинским. IMEDA специально подготовила аналитику, отражающую основные тенденции развития диагностических служб в регионах страны за последние пять лет; эту информацию представил сам автор, М. А. Свещинский, а приглашенными спикерами на мероприятии стали главный врач Иркутского диагностического центра И. В. Ушаков и генеральный директор компании BD (Бектон, Дикинсон энд компани) в России и СНГ Елена Чиркова. Модератором выступила исполнительный директор ассоциации IMEDA Александра Третьякова.

В отчет IMEDA объединены данные официальной статистики Минздрава России по ресурсной обеспеченности и оснащенности региональных диагностических служб за последние пять лет (2009–2013); авторы проанализировали эти цифры на предмет того, насколько быстро и эффективно развивается диагностическая служба в стране; является ли установка современного оборудования единственно важным фактором улучшения качества услуг; какое место занимает Россия в мировых рейтингах эффективности диагностических служб.

М. А. Свещинский во время своего выступления отметил: «Последние модернизационные проекты осуществлялись из абсолютно приоритетных соображений повышения качества и доступности медицинской помощи. По итогам программ модернизации мы зачастую видим либо низкую загрузку оборудования, либо неполное использование возможностей современных технологий. Это нужно и можно исправлять за счет образования специалистов».

И. В. Ушаков, утверждает, что эффективность работы диагностической службы напрямую зависит от эффективности управления ею: «Без качественного менеджмента невозможно качественное оказание медицинской помощи».

Только качественное взаимодействие всех участников процесса — руководителей здравоохранения, главных врачей, клиницистов, страховых компаний и индустрии в сочетании с грамотным менеджментом способно дать результат. Поскольку данные отчета могут быть интересны и экспертам и пациентам, мы сделали эту аналитику публичной. Наши выводы позволяют видеть изменения, произошедшие с диагностической службой России за последние 5 лет, — и эти изменения позитивны.



Выявление антинуклеарных антител: международные рекомендации и собственный опыт

С. В. Лапин¹, А. В. Мазинг¹, Т. В. Булгакова¹, О. С. Напалкова¹, М. Ю. Первакова¹,
И. С. Холопова¹, А. Л. Маслянский², А. А. Тотолян³

¹ГБОУ ВПО ПСПбГМУ им. И. П. Павлова Минздрава России, Научно-методический центр по молекулярной медицине Минздрава РФ, Санкт-Петербург

²Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург

³НИИ Эпидемиологии и Микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

Сокращенное название статьи: Диагностический алгоритм СЗСТ

Detection of antinuclear antibodies: international recommendations and own experience

S. V. Lapin, A. V. Mazing, T. V. Bulgakova, O. S. Napalkova, M. Yu Pervakova, I. S. Kholopova, A. L. Maslyansky, A. A. Totolyan

Резюме

Термином антинуклеарные антитела (АНА) называют семейство аутоантител к компонентам клетки, которые реагируют с нуклеиновыми кислотами ядра клетки и ассоциированными с ними белками. Для исследования АНА в клинической лаборатории может быть использовано множество диагностических тестов, основанных на разных принципах. Несмотря на важность выявления АНА, до недавнего времени не существовало международных рекомендаций, регламентирующих методы выявления АНА в клинической лабораторной диагностике. Международные рекомендации по выявлению АНА были опубликованы недавно (*Ann Rheum Dis.* 2014;73:17–23). Статье обсуждаются рекомендации и анализируется собственный опыт разработки лабораторных алгоритмов по выявлению АНА.

Ключевые слова: системные заболевания соединительной ткани, антинуклеарный фактор, антитела к экстрагируемому нуклеарному антигену, антитела к двуспиральной ДНК, диагностический алгоритм.

Summary

The term antinuclear antibodies (ANA) is a family of autoantibodies to components of cells that react with nucleic acids of the cell nucleus and their associated proteins. For the study ANA in a clinical laboratory can be used a plurality of diagnostic tests based on different principles. Despite the importance of identifying the ANA, until recently, there was no international guidelines governing the methods for detection of ANA in clinical laboratory diagnostics. International recommendations on the identification of ANA were published recently (*Ann Rheum Dis.* 2014, 73: 17, 23). Recommendations are discussed and analyzed by their own experience in the development of laboratory algorithms to detect ANA.

Key words: systemic connective tissue disease, antinuclear factor, antibodies to extractable nuclear antigen, antibodies to double-stranded DNA, the diagnostic algorithm.

Иммунологическим признаком системных заболеваний соединительной ткани (СЗСТ) является возникновение клеточных и гуморальных реакций, направленных против антигенов собственных клеток и тканей организма, которое сопровождается появлением антинуклеарных антител (АНА) [2, 5, 23, 24]. Выявление АНА имеет большое значение в диагностике и дифференциальной диагностике системной красной волчанки (СКВ), системного склероза (СС), синдрома Шегрена, других СЗСТ а также аутоиммунных заболеваний печени и артритов. [4, 5, 17, 19]

Термином АНА называют семейство аутоантител к компонентам клетки, которые реагируют с нуклеиновыми кислотами ядра клетки и ассоциированными с ними белками, а также с рядом рибонуклеопротеиновых антигенов нуклеолеммы и цитоплазмы клетки [14]. Поэтому ряд авторов рекомендуют новое название АНА — «антицеллюлярные антитела» [8].

Терминология лабораторных методов выявления АНА до сих пор не устоялась даже в международной литературе [8], поэтому присутствует путаница в названиях, которые описывают антитела, их разновидности, скрининговые и подтверждающие лабораторные тесты для их выявления. Ниже даны определения основным понятиям лабораторного определения АНА, которые мы используем в данной статье.

В семейство АНА входят определенные разновидности или «специфичности» АНА. Под термином специфичность АНА понимают выявление связывания аутоантител с охарактеризованной молекулой антигена, которое может быть выявлено с помощью лабораторного теста. В настоящее время описано около 100 специфичностей АНА (т.е. аутоантигенов с которым антитела реагируют), но в клинических лабораториях обычно выявляют около 20-30 наиболее распространенных из них [20]. В качестве аутоантигенов АНА могут выступать нуклеиновые

кислоты, отдельные белки, рибонуклеопротеиновые комплексы (например нуклеосомы) и органеллы клетки (компоненты рибосом и др.). В то же время, антигены многих АНА до сих пор не охарактеризованы, поскольку могут представлять конформационные, нестабильные или комплексные белковые или рибонуклеопротеиновые структуры. В таком случае АНА выявляются только с помощью тестов, основанных на непрямой иммунофлуоресценции, что позволяет выявлять реакции антител с нестойкими или конформационными антигенами. Такое связывание обычно не выявляется иммунометрическими тестами для выявления конкретных специфичностей [13]. Если в одной сыворотке могут быть обнаружены АНА к нескольким антигенным мишеням, в таком случае принято говорить о спектре АНА, выявляющегося у данного человека. Определение конкретной специфичности АНА, например антител к двуспиральной ДНК (дсДНК) или антигену Scl-70,

Основные лабораторные методы и оборудование для выявления АНА в клинико-диагностических лабораториях

Принцип измерения	Лабораторное оборудование, фирмы-производители
Непрямая иммунофлюоресценция на эпителиоидных клеточных линиях человека Нер-2 и Нер 2000 (НРИФ)	TITERPLANE (Euroimmun AG), AKLIDES (Medipan)
Иммуноферментный метод (ИФА)	ANALYZER (Euroimmun AG), ALEGRIA (Orgentec)
Иммуноблот: лайнблот (LIA), вестерн-блот, дот-блот	EUROBlotOne (Euroimmun AG), BlueDiver (D-TEK)
Хемилюминесценция (CLIA)	LIAISON (DiaSorin)
Проточная цитометрия с иммунореактивными микрочастицами (ALBIA/XMAP)	BIOPLEX 2200 (BioRAD)
Иммуноферментный флюоресцентный метод (FEIA)	PHADIA 250 (Thermo Scientific)

имеет важное клинико-диагностическое значение, поскольку с помощью аутоантител уточняется диагноз СЗСТ, но выявление аутоантител также указывает на риск развития характерных клинических проявлений заболевания. Многообразие серологических реакций в дифференциальной диагностике СЗСТ является причиной повышенного внимания к вопросам иммунологического выявления АНА [2, 4, 19].

Методические особенности выявления АНА

Основной задачей лабораторного тестирования АНА является определение всех разновидностей аутоантител, присутствующих в конкретном образце. Методы выявления АНА делят на скрининговые, которые детектируют присутствие или отсутствие АНА в образце, и подтверждающие, результатом которых является определение спектра специфичностей АНА. Скрининговые тесты для выявления АНА используют для ранней диагностики СЗСТ, а также исключения диагноза СЗСТ в случае неопределенной клинической картины [20]. В тестировании АНА особое значение имеет метод непрямой иммунофлюоресценции (антинуклеарный фактор), в котором антитела выявляются за счет связывания с антигенами внутри клеток или тканевого субстрата [23].

Термин антинуклеарный фактор (АНФ) обобщает тесты для скринингового выявления АНА, основанные на методе непрямой иммунофлюоресценции [3]. Антитела выявляются за счет их связывания с клетками клеточных линий (реже криосрезами тканевой лабораторных животных). Исторически использовался ряд клеточных и тканевых субстратов для выявления АНФ, но в настоящее время, повсеместно используется клеточная линия эпителиоидных клеток аденокарциномы гортани человека Нер2 [16]. Распределение антигенов внутри клетки определяет тип свечения ядра, который позволяет судить о спектре АНА, присутствующих в данной сыворотке. Не всегда при наличии даже высоких титров АНФ можно установить антигенную специфичность АНА, поскольку многие антигены, выявляющиеся с помощью АНФ, относят к конформационным (т.е. нестойким) и до сих пор плохо охарактеризованы.

На отечественном рынке реактивы для определения АНФ представлены рядом производителей, например Euroimmun AG (Германия), Immco (США), BioSystems, (Испания), Medipan AG (Германия). Преимуществами продукции Euroimmun AG является использование клеточной линии Нер-2000, обладающей повышенным числом клеточных делений, а также возможность совместного иммунофлюоресцентного исследования в одном реакционном поле других субстратов, например печени приматов, что повышает выявляемость ряда специфичностей АНА.

Кроме АНФ применяют скрининговые тесты, основанные на выявлении антител к смеси антигенов ядер, очищенных из клеток или полученных методами генной инженерии [10]. До недавнего времени для описания спектра АНА в иммунологических лабораториях, использовался экстрагируемый ядерный антиген (ЭНА), представляющий водно-солевые экстракты ядер клеток. В состав ЭНА входят растворимые клеточные антигены, прежде всего рибонуклеопротеины, однако водонерастворимые антигены, например нуклеиновые кислоты, в составе ЭНА отсутствуют. В настоящее время, под названием антитела к ЭНА обычно подразумевают выявление антител к смеси рекомбинантных антигенов [21].

Проведение дифференциальной диагностики в рамках СЗСТ требует определения отдельных специфичностей АНА [17]. Для определения специфичностей АНА существует широкий спектр методов и принципов детекции аутоантител, причем этот перечень постоянно расширяется. Современные молекулярно-биологи-

ческие методы позволяют получать большой набор очищенных аутоантител, что значительно облегчает разработку новых тестов. Ведущими мировыми производителями создаются автоматизированные полузакрытые и закрытые системы, основанные на различных принципах: методе ИФА, дот- и лайн-блоты, хемилюминесцентный метод, мультиплексный анализ на микрочастицах и др. (табл. 1).

Несмотря на совершенствование методов, лайн-блоты представляют собой сравнительно дешевую, но достаточную надежную альтернативу автоматизированным технологиям для лабораторий с небольшим потоком исследований [18, 22]. Большинство лайнблотов, представленных на отечественном рынке, позволяет выявлять от 9 до 20 различных аутоантител в одном тесте, что обеспечивает значительное преимущество перед другими технологиями по спектру определяемых показателей. Так для диагностики СЗСТ фирма Euroimmun AG (Германия), выпускает линейку иммуноблотов с возможностью выявления до 30 специфичностей АНА. Разработаны продукты как для дифференциальной диагностики всех СЗСТ, так и для дифференциальной диагностики в рамках СКВ, склеродермии, полимиозита.

Возможность денситометрии с помощью оптических систем ряда офисных сканеров обеспечивает возможность количественной и полуколичественной оценки результатов блотов, а также возможность архивации результатов исследований (программа EUROLinScan).

Внедрение современных автоматизированных систем ставит вопрос о целесообразности сохранения АНФ

Таблица 2
Международные рекомендации 2014 года по детекции аутоантител к клеточным компонентам (АНА) [8]

1	Диагноз СЗСТ требует нескольких специализированных лабораторных тестов
2	Выявление АНФ, анти-дсДНК и антитела к ЭНА (специфичностей АНА) следует использовать для диагностики СЗСТ и ряда других аутоиммунных заболеваний
3	Выявление АНФ является первым лабораторным тестом в диагностике СЗСТ
4	Выявление АНФ следует использовать для диагностики, а не мониторинга СЗСТ
5	Непрямая иммунофлуоресценция (АНФ) является референтным методом скринингового выявления АНА. Другие методы выявления АНА могут отличаться по уровню ложных результатов. Если существует клиническое подозрение при отрицательном результате другого метода выявления АНА, следует провести выявление АНФ
6	Диагностические лаборатории должны указывать метод выявления АНА
7	Тесты, основанные на смеси нескольких конкретных ядерных антигенов не должны называться АНА-тестом или АНА-скринингом
8	Лаборатории, которые используют внутрिलाбораторные методы для выявления АНФ, равно как и антитела к дс ДНК и специфическим ЭНА должны стандартизовать эти методы с помощью международных стандартов (ВОЗ или CDC/UIS)
9	Для выявления АНФ следует использовать меченную флуорохромом античеловеческую антисыворотку против IgG
10	Титр АНФ зависит от реактивов, оборудования и других факторов, поэтому разведение для скрининга сыворотки следует определять в лаборатории. Повышенный АНФ следует считать титр выше 95го перцентилей контролей из здоровой популяции. В большинстве случаев разведение сыворотки 1:160 достаточно для выявления АНФ во взрослой популяции
11	В случае положительного результата выявления АНФ в результате лабораторного теста должен быть указан тип свечения клетки и наивысший титр разведения сыворотки
12	Тип АНФ следует указывать в соответствии со стандартной терминологией (см. таб.2)
13	Кроме типов свечения ядра АНФ должны указываться свечения цитоплазмы и делящихся клеток
14	При обнаружении АНФ и клиническом подозрении на СКВ следует рекомендовать выявление антител к дсДНК
15	При выявлении антител к дсДНК наилучшую специфичность имеют радиоиммунный тест (тест Фарр/Фарр) и непрямая иммунофлуоресценция на <i>Crithidia luciliae</i> (CLIFT). Положительные результаты других тестов следует подтверждать этими методами.
16	Метод, используемый для выявления антител к дсДНК, следует указывать в форме результата лабораторного теста
17	Результат выявления антител к дсДНК должен предоставляться в количественном виде
18	При мониторинге СКВ с помощью количественного измерения антител к дсДНК должен использоваться один и тот-же лабораторный метод
19	В случае положительного результата АНФ следует использовать лабораторные тесты для определения специфичности АНА
20	Для выявления антител к ЭНА следует указывать метод выявления. В случае расхождения с результатами АНФ или клинической картиной рекомендуется использование альтернативного метода выявления антител
21	Результаты определения специфичности антител к ЭНА следует указывать отдельно (включая отрицательный результат выявления антител). При интерпретации результатов скрининговых тестов выявления антител достаточно указать какие разновидности ЭНА присутствуют в составе тест-системы.
22	При подозрении на смешанное заболевание соединительной ткани рекомендуется количественное определение антител к RNP
23	В случае подозрения на конкретное СЗСТ следует проводить углубленное исследование конкретной специфичности АНА. Например, антител к Jo-1 при воспалительных миопатиях, антител к рибосомам и SSA антигену при различных формах волчанки и синдроме Шегрена
24	Каждая лаборатория должна верифицировать референтные пределы скрининговых методов выявления АНА с помощью сывороток здоровых лиц известного пола и возраста. Референтные пределы должны быть сопоставлены с 95 перцентилем результатов измерений в сыворотках здоровых лиц.
25	Каждая лаборатория должна верифицировать (подтверждать) референтные значения методов выявления антител к дсДНК и антител к ЭНА. Следует использовать достаточное количество образцов больных с разными аутоиммунными заболеваниями, от заболевших и здоровых доноров. Референтные значения должны устанавливаться с помощью ROC-анализа

Примечания: АНА –антинуклеарные антитела; АНФ — антинуклеарный фактор; дсДНК — двуспиральная ДНК; СЗСТ — системные заболевания соединительной ткани; ЭНА- экстрагируемые нуклеарные антигены; CLIFT — *Crithidia luciliae* immunofluorescence test

в качестве основного метода диагностики АНА. Несмотря на большую аналитическую чувствительность иммунометрических методов по сравнению с непрямой иммунофлуоресценцией на тканевых субстратах, спектр выявляемых АНА с помощью таких методов ограничен. Ограниченный спектр выявляемых специфичностей АНА обуславливает меньшую диагностическую чувствительность иммунометрических мультиплексных тестов по сравнению с АНФ, т.е. при использовании таких методов высока вероятность ложно-отрицательного результата. Наши данные свидетельствуют о том, что при определении АНА, например с помощью лайнблота, теряется до 9% и 50% положительных результатов в высоких и средних титрах АНФ соответственно [1].

Именно поэтому АНФ до сих пор является «золотым стандартом», использование которого обеспечивает наиболее корректные результаты при выявлении АНА [8, 25].

Международные рекомендации 2014 года

Для исследования АНА в клинической лаборатории может быть использовано множество диагностических тестов, основанных на разных принципах. Единой номенклатуры этих тестов не существует, что приводит к определенным затруднениям при назначении и интерпретации обследования [11]. Фирмы-производители реактивов и оборудования для клинической лабораторной диагностики могут предлагать различные методические подходы к скринингу АНА и определения основных специфичностей [15]. При этом выявление АНА постепенно покидает стены высокоспециализированных иммунологических лабораторий, что может привести к снижению качества обследования в угоду большей технологичности и пропускной способности метода.

Несмотря на важность выявления АНА, до недавнего времени не существовало международных рекомендаций, регламентирующих методы выявления АНА в клинической лабораторной диагностике. Международные рекомендации по выявлению АНА были опубликованы недавно [8]. В их подготовке принимали участие две

Таблица 3

Типы свечения ядра и цитоплазмы на клеточной линии Нер-2, аутоантигены и заболевания [8] с изменениями)

Тип свечения	Основной антиген (ы)	Заболевания	
Ядерный	Гомогенный	дсДНК, гистоны, нуклеосомы	СКВ, ЮРА
	Крупногранулярный	RNP, RNP/Sm	СЗ, СКВ, СС
	Мелкогранулярный	SSA, SSB, Торо-1, другие антигены	СКВ, СС, СШ, ВМ, СЗ
	Центромерный	CENT-A, B, C	СС, с-м Рейно
	Ядрышковый	PM/Scl, RNA-Pol	СС, ВМ, с-м Рейно
Цитоплазматический	Диффузный	RibP, Jo-1	СКВ, ВМ
	Гранулярный	Jo-1, PDH/AMA-M2	ПБЦ, ВМ
Редкий ядерный	Периферический/ядерная мембрана Плотный мелкогранулярный Пролиферирующие клетки (PCNA)	Точки в ядре Центросома/центриоли Веретено деления	
Редкий цитоплазматический	Отдельные гранулы Комплекс Гольджи	Цитоскелет клетки	

Примечания: ВМ- воспалительные миопатии, ПБЦ — первичный билиарный цирроз, СЗ — смешанное заболевание соединительной ткани, СКВ — системная красная волчанка, СС- системный склероз, СШ — синдром Шегрена, ЮРА — ювенильный ревматоидный артрит

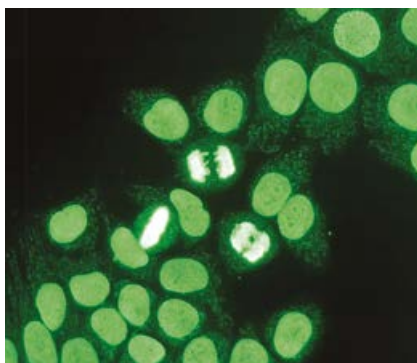


Рисунок 1. АНФ на клеточной линии Нер-2000 (Euroimmun AG, Германия), гомогенный тип свечения, флуоресцентная микроскопия, х400. Отмечается высокая частота клеточных делений.

Лабораторные алгоритмы диагностики СЗСТ

Учитывая разнообразие методов выявления АНА, одновременное назначение всех скрининговых и подтверждающих методов является трудоемким, дорогостоящим и часто неоправданным. Очевидно, что возникает необходимость последовательного тестирования данных АНА, основанном на определенном диагностическом алгоритме [9, 25]. Так как общепринятого алгоритма серологической диагностики АНА у лиц с подозрением на СЗСТ не существует, ряд авторов рекомендуют использовать внутренние алгоритмы, оптимизирующие выявление АНА в рутинной работе [9].

Нами было проведено исследование по разработке и практической оценке алгоритма для диагностики СЗСТ, основанного на результатах

обследования 981 пациента в нашей лаборатории [1]. Для выявления АНФ нами был использован метод непрямой иммунофлюоресценции на клеточной линии Нер-2 и Нер-2000 (Euroimmun AG, Германия). Клеточная линия Нер-2000 обладает повышенной частотой клеточных делений, и клетки делятся в 4–10 раз чаще по сравнению с классической линией Нер-2 (см. рис. 1).

Для определения АНА с помощью лайнблота использовались диагностические наборы фирмы «Euroimmun AG» (Германия). Данная диагностическая система содержит следующие рекомбинантные антигены: Sm, RNP/Sm, SS-A, SS-B, Scl-70, CENP-B, PCNA, дсДНК, нуклеосомы, гистоны, Jo-1, AMA-M2.

Среди исследованных 981 образцов сыворотки крови лиц с подозрением на СЗСТ в 474 образце были выявлены АНА. В данных образцах анализировались результаты выявления АНФ и антител к ЭНА. Хотя оба метода обладают высокой сходимостью, чувствительность определения антител к ЭНА значительно уступает АНФ (20% против 48%). Эта находка подчеркивает необходимость использования АНФ для ранней диагностики СЗСТ.

Антитела к ЭНА у лиц с подозрением на аутоиммунную патологию были обнаружены в 34% образцов совместно с АНФ. Изолированно антитела к ЭНА были обнаружены только у 5,5% (28/507) пациен-

группы экспертов. Наиболее многочисленной действующей группой, которая включала экспертов из 15 Европейских стран, является «Европейская аутоиммунная инициатива по стандартизации» (European Autoimmunity Standardization Initiative — EASI). Под ее эгидой проводится значительное количество конференций и круглых столов по вопросам диагностики аутоиммунных заболеваний (www.easinetwork.com). Другой международной организацией является совместный комитет Международного союза иммунологических обществ (IUIS), Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ/WHO), Фонда артрита (AR), Центра по контролю и предотвращению заболеваемости США (CDC) и Американского колледжа ревматологов (ACR). «Совместный комитет по стандартизации аутоантител при ревматических и близких заболеваниях» (IUIS/WHO/AR/CDC) более тридцати лет разрабатывает и внедряет стандарты и референтные сыворотки для выявления аутоантител (www.autoab.org).

Опубликованные международные методические рекомендации охватывают основные методические вопросы организации лабораторного выявления АНА (см. таб.2).

Данные методические рекомендации разделены на 3 блока вопросов. Первые 13 рекомендаций касаются методов выявления АНФ и регламентируют его использование, следующие 5 затрагивают выявление антител к двуспиральной ДНК и, наконец, последние пять пунктов определяют подходы к выявлению антител к ЭНА и специфичности АНА. Рекомендации подчеркивают важность АНФ как референтного теста для скринингового выявления АНА, а также указывают на важность определения типа свечения ядра клетки (см. таб. 3).

Тип свечения клетки позволяет планировать дальнейшее тестирование, например классический гомогенный тип может быть поводом для выявления антител к двуспиральной ДНК, центромерный тип — для исследования АНА характерных для склеродермии, а гранулярный цитоплазматический тип свечения обычно указывает на наличие антимитохондриальных антител, характерных для первичного билиарного цирроза.

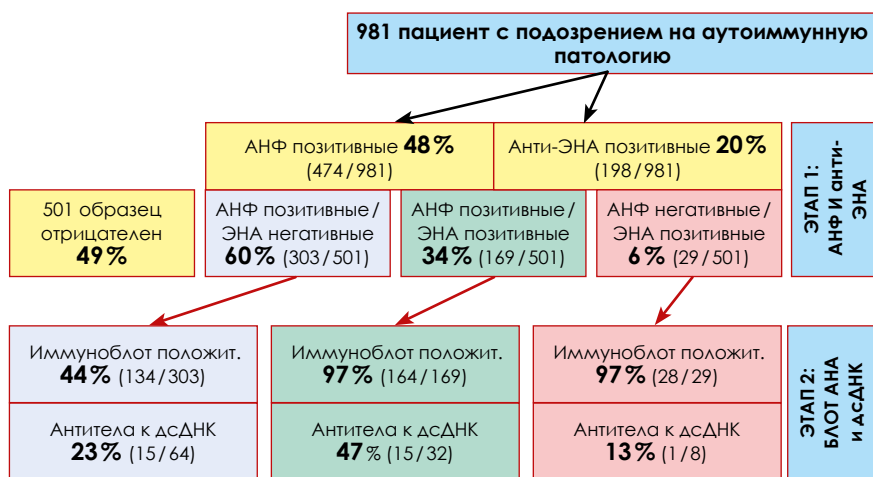


Рисунок 2. Результаты выявления АНА среди у 981 с подозрением на СЗСТ.

Примечания: АНФ- антинуклеарный фактор, ЭНА- экстрагируемые нуклеарный антиген, дсДНК –двуспиральная ДНК.

Таблица 4
Встречаемость положительных результатов лайнблота в зависимости от титров АНФ (n=981) [1]

Титры АНФ	Определены специфичности АНА с помощью лайнблота
Отрицательный (менее 1:80)	6% (28/507)
Низкие титры (1:80–1:160)	37% (55/150)
Средние титры (1:320–1:640)	62% (111/179)
Высокие титры (1:1280–1:5120)	91% (120/132)
Очень высокие титры (>1:10240)	92% (12/13)

тов, что указывает на роль тестов для их выявления в определении тех разновидностей АНА, которые утрачиваются из ядра клетки в ходе фиксации, либо плохо распознаются при микроскопии (см. рис. 2).

Наряду с определением АНФ и антител к ЭНА мы исследовали данные образцы с помощью лайнблота. Частота положительных результатов лайнблота в зависимости от титров АНФ представлена в таблице 4. В образцах, положительных по антителам к ЭНА, но отрицательных по АНФ антителу к растворимым SS-A/SS-B антигенам отмечались в 64% (18/28) случаев, в образцах положительных по АНФ и анти-ЭНА — в 46% (136/298) случаев. Кроме того, в двух образцах, изолированно положительных по антителам к ЭНА были обнаружены антитела к Jo-1 антигену, который располагается в цитоплазме клеток и может быть неразличим при микроскопии. Полученные результаты сопоставимы с данными литературы [12, 18].

Специфичность АНА с помощью метода лайнблота была установлена в 63% образцов, положительных

по АНФ и в 97% образцов, положительных по антителам к ЭНА. Таким образом, специфичность АНА с помощью используемых методов не может быть установлена в 37% АНФ-положительных образцов, что не исключает диагностической ценности выявления АНФ. Лайнблот оказывается отрицательным у большинства пациентов с низкими титрами АНФ, что совпадает с данными, полученными другими авторами. Таким образом, выполнение лайнблота у пациентов с отрицательным или низким результатом АНФ и отсутствием антител к ЭНА нецелесообразно.

Выявление антител к дсДНК обладает высокой сходимостью с результатами определения АНФ и антител к ЭНА. При выявлении АНФ и/или антител к ЭНА вероятность обнаружения антител к дсДНК составляет около 30%, что позволяет рекомендовать антитела к ДНК в качестве теста «второй линии» при обследовании пациентов с системными заболеваниями, после обнаружения АНФ или антител к ЭНА. Чувствительность ИФА тест-систем по определению антител

к дсДНК у различных производителей значительно варьирует, несмотря на то, что для стандартизации данных тестов используется референтная сыворотка Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) Wo80 [4]. По нашим данным, разница в чувствительности тестов составила 56% и 38% в зависимости от производителя. Наряду с методом ИФА в диагностике антител к дсДНК используется метод нРИФ с использованием простейших рода *Crithidia lucilliae*. Несмотря на сравнительно низкую чувствительность данного метода, этот тест по-прежнему рекомендуется в качестве подтверждающего теста, позволяющего объективизировать выявление антител к дсДНК [1, 6].

Полученные нами данные позволяют рекомендовать сочетанное выявление АНФ методом нРИФ и теста для определения антител к смеси ЭНА в качестве серологического лабораторного скрининга системных заболеваний соединительной ткани. Отрицательный результат обоих методов указывает на отсутствие АНА и делает диагноз СЗСТ маловероятным и не требует дальнейшего применения тестов второй линии, к которым может относиться определение АНА методом лайнблота, метод твердофазного ИФА с раздельными антигенами или методами мультиплексного анализа.

При выявлении АНФ или антител к ЭНА рекомендуется использование методов определения специфичности АНА, к которым относится метод лайнблота и определение антител к дсДНК [7].

Проведенный нами финансовый анализ эффективности такого подхода показывает, что использование данного алгоритма сокращает затраты на обследование одного пациента с подозрением на СЗСТ на 33,5%. Кроме того, последовательное назначение тестов повышает диагностическую эффективность, поскольку снижает число ложноположительных результатов обследования (см. рис. 3).

Среди СЗСТ по встречаемости АНА системная склеродермия (ССД) даже опережает СКВ, поскольку АНФ отмечается у 95-100% пациентов с этим заболеванием. К настоящему времени, при ССД описано около 30 антигенных мишеней АНА, причем

выявление ряда специфичностей АНА может определять как особенности поражения внутренних органов, так и прогноз заболевания. В большинстве ИФА и блот-тестов обычно присутствует ограниченный спектр антигенов, представленный Scl-70 и CENT-B антигенами, определяющий предрасположенность к диффузной и лимитированной форме заболевания.

Фирма Euroimmun AG впервые выпустила набор реагентов, основанный на методе лайн-блота для выявления антител к широкому спектру антигенов, характерных для ССД. С помощью него кроме антигенов Scl-70 и CENT-A и B, входят также антигены РНК-полимераз (RP11 и RP155) которые отмечаются при тяжелом течении ССД, антитела к Th/To, встречающимися при мягкой клинической форме ССД. Также в лайнблоте представлены антигены, характеризующие перекрестные синдромы, в частности Ku, антитела против которого отмечаются при СКВ с симптоматикой ССД и антигены РМ-Scl 75кДа и 100 кДа, являющиеся маркером сочетания ССД и полимиозита. Также в состав блота входят ряд антигенов ядрышка (фибрилларин и NOR90), а также антигены PDGFR и Ro-52.

Для выявления АНА нами были обследованы 67 больных ССД проходящих стационарное лечение в условиях специализированного ревматологического отделения. В исследованной группе антинуклеарный фактор (АНФ) был выявлен у 100% (67/67) пациентов, причем преобладали центральный и ядрышковый типы свечения ядра.

Антитела против Scl-70 и/или анти-CENP-B, которые присутствуют в большинстве тест систем для диагностики системных заболеваний, отмечались в 28% (19/67) и 34% (23/67) соответственно, а хотя бы одно из этих антител было обнаружено в 61% случаев. Использование расширенного лайнблота, содержащего 12 аутоантигенов, позволило определить специфичность АНА в 94% (63/67), т.е. позволяет увеличить число положительных серологических находок более чем на треть.

Таким образом, несмотря на тенденции к автоматизации и попыткам упрощения тестов для серологиче-

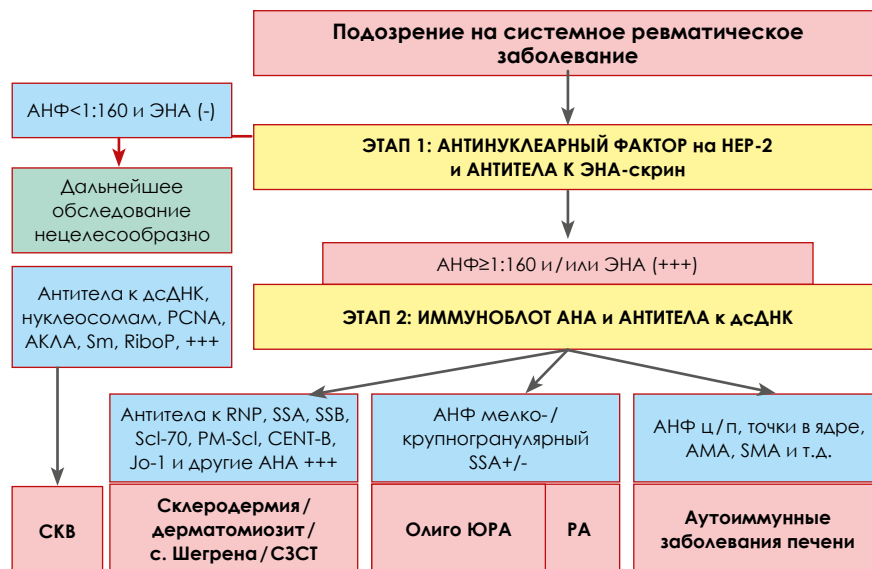


Рисунок 3. Алгоритм диагностики СЗСТ.

Примечания: АНА — антинуклеарные антитела, ЭНА — экстрагируемый ядерный антиген, дсДНК — двуспиральная ДНК, АКЛА — антитела к кардиолипину, СКВ — системная красная волчанка, СЗСТ — смешанное заболевание соединительной ткани, олигоЮРА — олигоартрикулярная форма ювенильного хронического артрита, РА — ревматоидный артрит, АНФ ц/п — цитоплазматический тип антинуклеарного фактора, PCNA, Sm, RiboP, SSA, RNP, SSA, SSB, Scl-70, Pm-Scl, CENT-B, Jo-1, — основные специфичности АНА, АМА — антимитохондриальные антитела, SMA — антитела к гладким мышцам.

ской диагностики СЗСТ на сегодняшний день наилучшей комбинацией лабораторного тестирования для определения АНА является сочетание выявления АНФ и выявления специфичностей АНА с помощью метода лайнблота с максимально широким спектром аутоантигенов.

Список литературы

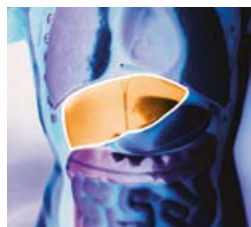
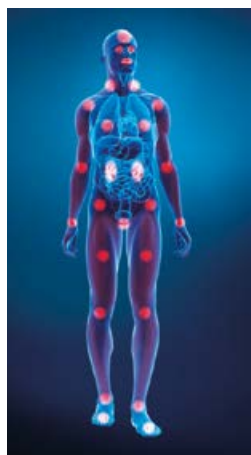
1. Лазарева Н. М., Лапин С. В., Мазинг А. В., Бугакова Т. В., Ивлиanova Е. П., Маслянский А. Л., Тотолян А. А. // *Клин. лаб. диаг.* — 2011. — Vol.12. — P.12-17.
2. Лапин С. В., Тотолян А. А. // *Мед. иммунология.* — 2001. — Vol.3, N1. — P.35-50.
3. Лапин С. В., Тотолян А. А. *Иммунологическая лабораторная диагностика аутоиммунных заболеваний* / — Санкт-Петербург. — Человек 2010. — 272 р.
4. Лапин С. В., Тотолян А. А. *Иммунологическая лабораторная диагностика ревматических заболеваний* / — Санкт-Петербург. — Человек 2007. — 128 р.
5. Насонов Е. Л., Александрова Е. Н. // *Тер. архив.* — 2010. — Vol.85, N5. — P.5-9.
6. Созина А. В., Ивлиanova Е. П., Шульман А. М., Шульман М. А., Шемеровская Т. Г., Лапин С. В., Тотолян А. А. // *Клин. лаб. диаг.* — 2008. — Vol.5. — P.44-47.
7. Созина А. В., Неустровева Ю. А., Тихомирова Т. А., Лапин С. В. // *Мед. иммунология.* — 2007. — Vol.9, N1. — P.69-76.
8. N. Agmon-Levin, J. Damoiseaux, C. Kallenberg, U. Sack, T. Witte, et al. // *Ann Rheum Dis.* — 2014. — Vol.73, N1. — P.17-23.
9. C. Bonaguri, A. Melegari, P. Dall'Aglio, A. Ballabio, P. Terenzi, et al. // *Ann N Y Acad Sci.* — 2009. — Vol.1173. — P.124-129.

10. X. Bossuyt, A. Hendrickx, J. Frans // *Arthritis Rheum.* — 2005. — Vol.53, N6. — P.987-988.
11. X. Bossuyt, C. Louche, A. Wiik // *Ann Rheum Dis.* — 2008. — Vol.67, N8. — P.1061-1063.
12. X. Bossuyt, A. Luyckx // *Clin Chem.* — 2005. — Vol.51, N12. — P.2426-2427.
13. J. G. Damoiseaux, J. W. Tervaert // *Autoimmun Rev.* — 2006. — Vol.5, N1. — P.10-17.
14. W. Egner // *J Clin Pathol.* — 2000. — Vol.53, N6. — P.424-432.
15. M. Fenger, A. Wiik, M. Hoier-Madsen, J. J. Lykkegaard, T. Rozenfeld, et al. // *Clin Chem.* — 2004. — Vol.50, N11. — P.2141-2147.
16. A. L. Hepburn, P. J. Charles // *Rheumatology (Oxford).* — 2002. — Vol.41, N3. — P.343-345.
17. M. C. Hochberg // *Arthritis Rheum.* — 1997. — Vol.40, N9. — P.1725.
18. I. E. Hoffman, I. Peene, E. M. Veys, F. De Keyser // *Clin Chem.* — 2002. — Vol.48, N12. — P.2171-2176.
19. Y. Kumar, A. Bhatia, R. W. Minz // *Diagn Pathol.* — 2009. — Vol.4. — P.1.
20. P. L. Meroni, P. H. Schur // *Ann Rheum Dis.* — 2010. — Vol.69, N8. — P.1420-1422.
21. S. M. Orton, A. Peace-Brewer, J. L. Schmitz, K. Freeman, W. C. Miller, et al. // *Clin Diagn Lab Immunol.* — 2004. — Vol.11, N2. — P.297-301.
22. I. Peene, L. Meheus, E. M. Veys, F. De Keyser // *Ann Rheum Dis.* — 2001. — Vol.60, N12. — P.1131-1136.
23. U. Sack, K. Conrad, E. Csernok, I. Frank, F. Hiepe, et al. // *Ann N Y Acad Sci.* — 2009. — Vol.1173. — P.166-173.
24. E. M. Tan, A. S. Cohen, J. F. Fries, A. T. Masi, D. J. McShane, et al. // *Arthritis Rheum.* — 1982. — Vol.25, N11. — P.1271-1277.
25. A. Wiik, R. Cervera, M. Haass, C. Kallenberg, M. Khamashta, et al. // *Lupus.* — 2006. — Vol.15, N7. — P.391-396.

Полуавтоматический анализатор BlueDiver для диагностики аутоиммунных заболеваний методом иммунодота



- Простая система сканирования тест-стрипов и автоматического расчета результатов
- Работает с картриджами с готовыми для использования реагентами, никаких шлангов, насосов, приготовления реагентов, разведения образцов и пр.
- Возможность одновременного анализа от 1 до 24 тест-стрипов, один протокол для всех анализов
- Время анализа – 90 минут
- Сканер штрих кодов проверяет правильность загрузки и сроки годности тест-стрипов и картриджей, что полностью исключает возможность ошибки
- Уникальная скрининговая панель BlueDiver Quantrix для количественного определения IgG антител к 25 различным ядерным антигенам на одном тест-стрипе



ВАРИАНТЫ ПАНЕЛЕЙ

Ревматология

- Blue Dot ANA12 Screen – Sm, RNP(68kD/A/C), Sm/RNP, SSA(Ro), SSB(La), Jo-1, Scl-70, PM-Scl, Ku, CENP-A/B, PCNA, Mi-2
- Blue Dot APS – Cardiolipin/ β 2-GPI complex, β 2-GPI
- Blue Dot Connectivitis10 – Nucleosome, dsDNA, Histones, Sm, Sm/RNP, SSA(Ro), TRIM21, SSB(La), Jo-1, Scl-70
- Blue Dot Cytoplasm – M2/nPDC, Jo-1, PL-7, PL-12, SRP, Ribosome P0
- Blue Dot ENA6 – Sm, Sm/RNP, SSA(Ro), SSB(La), Jo-1, Scl-70
- Blue Dot Lupus – Nucleosome, Histones, Sm, Ribosome P0
- Blue Dot Polymyositis/Scleroderma – Jo-1, PL-7, PL-12, SRP, Mi-2, Ku, Pm-Acl, Scl-70

Диагностика васкулитов и синдрома Гудпасчера

- Blue Dot ANCA2 – MPO, PR3
- Blue Dot ANCA+GMB – MPO, PR3, GMB

Аутоиммунные заболевания печени

- Blue Dot Liver10 – M2/nPDC, M2/OGDC-E2, M2/BCOADC-E2, M2/PDC-E2, gp210, sp100, LKM1, LC1, SLA, f-actin

ЗАО «БиоХимМак»

119991, Москва, Ленинские горы, МГУ им. М.В. Ломоносова, дом 1, строение 11
Тел.: (495) 647-2740, 939-1060. Факс: (495) 939-0997. E-mail: info@biochemmack.ru
www.biochemmack.ru

Stago. 65 лет в сердце гемостаза

Технология успеха

- Новый автоматический анализатор гемостаза.
- Предназначен для лабораторий средней производительности (50-100 образцов в день), выполняющих рутинные и специальные тесты для исследований системы гемостаза
- Программное обеспечение на русском языке



STA Compact Max



- Новый автоматический анализатор гемостаза.
- Самый маленький анализатор в линии STA®
- Предназначен для лабораторий небольшой производительности (до 50 образцов в день), выполняющих рутинные и специальные тесты для исследований системы гемостаза

СТА *SATELLITE*

Узнайте больше на www.hemostatica.ru


Stago
В самом сердце гемостаза

ООО «ГЕМОСТАТИКА»

Россия, 126167, Москва,
ул. Викторенко, д. 4, корп. 1
Тел./факс: +7 /499/ 277-01-02,
8 /800/ 770-01-02
e-mail: info@hemostatica.ru
www.hemostatica.ru

Анализ холестерина ЛПНП — 80 лет совершенствования. Итог: клиническое решение зависит от выбора аналитической процедуры?

О. В. Островский, зав. кафедрой

В. Е. Веровский, доцент кафедры

Д. Н. Лучинин, аспирант кафедры

Н. П. Мурзина, заведующая клинико-диагностической лабораторией клиники № 1 ВолгГМУ

Кафедра теоретической биохимии с курсом клинической биохимии, клиника № 1 ГОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» (ВолгГМУ), г. Волгоград

Analysis of LDL-cholesterol — 80 years of cultivation. Bottom line: a clinical decision depends on the choice of the analytical procedure?

O. V. Ostrovskiy, V. E. Verovsky, D. A. Luchinin, N. P. Murzina
Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia



О. В. Островский

Резюме

На примере определения содержания холестерина липопротеинов низкой плотности рассматривается вопрос, как совершенствование аналитических методов влияет на интерпретацию лабораторных данных. Обсуждаются преимущества и недостатки отдельных аналитических методик. Прямые методы обладают рядом технологических преимуществ, но могут привести к ошибочной классификации пациентов в группу с низким риском сердечно-сосудистой патологии.

Ключевые слова: иммунохимические методы прямого определения концентрации ЛПНП-ХС, формула Фридляльда, прямые методы определения ХС-ЛПНП, аналитические методики.

Summary

On the example of determination of LDL-cholesterol is considered the question as improved analytical methods affect interpretation of laboratory data. The advantages and limitations of individual analytical methods are discussed. Direct methods have a number of technological advantages, but can lead to misclassification of patients in a group with low risk of cardiovascular diseases.

Key words: immunochemical methods for the direct determination of the concentration of LDL cholesterol, Friedewald formula (FF), direct methods for the determination of LDL cholesterol, analytical techniques.

К истории вопроса

Становление теории атеросклероза — история весьма интригующая и поучительная, в которой ярко отражены основные проблемы современной клинической химии. В развитии теории можно выделить три ключевых этапа. Первый — это удачный выбор Н. Н. Аничковым экспериментальных животных — кроликов. Результаты этих экспериментов указывали на возможную взаимосвязь между холестерином и риском развития патологии [1]. Наряду с этим именно особенности экспериментов Аничкова, а именно особенности метаболизма холестерина у кроликов и крайне высокие дозы холестерина привели к тому, что эта теория стала реально развиваться лишь в 1940–1950 годах по мере накопления клинических данных [15].

Второй этап становления теории — это открытие липопротеинов сыворотки крови [8], гетерогенных надмолекулярных частиц, которые, как оказалось в дальнейшем, имеют особое значение

в транспорте холестерина. В зависимости от привлекаемого метода эта гетерогенная смесь частиц может быть разделена на некоторое число более или менее гомогенных фракций. Электрофорез на агарозе и ацетате целлюлозы или осаждение солями позволяет разделить эти частицы на 2–3 фракции примерно сходные по составу. Эти фракции получили название α - и β -липопротеинов [4, 12]. Более детальная картина может быть получена путем ультрацентрифугирования сыворотки крови в градиенте плотности. При определенных условиях распределение этих частиц по электрофоретической подвижности в полиакриламидном геле (ПААГ-электрофорез) приводит к результатам, близким к ультрацентрифугированию. Однако как ультрацентрифугирование, так и ПААГ-электрофорез — процедуры, скорее, исследовательские и возможность их внедрения в клиническую практику весьма проблематична даже в настоящее время.

Третий этап был также весьма драматичен и связан с личностью Джона Гофмана. Именно благодаря его личным усилиям и настойчивости были установлены те условия ультрацентрифугирования, при которых уровень холестерина в одной из фракций липопротеинов имел наиболее высокую степень связи с клинической картиной (риском развития атеросклероза) [5]. Данная фракция, исходя из седиментационных свойств, получила название «липопротеинов низкой плотности». Холестерин липопротеинов низкой плотности (ХС-ЛПНП) в настоящее время считается важнейшим фактором риска, а также показателем эффективности гиполипидемической терапии [3, 6].

Из-за особенностей строения этих частиц, оказалось, что именно они представлены, главным образом, в β -фракциях, полученных альтернативными способами: осаждением солями или при электрофорезе в агарозном геле. Простота и доступность данных способов фракционирования послужили

ла основой для создания клинических методов анализа, которые в настоящее время относят к «методам первого поколения» (табл. 1) [11].

Клиническая аппликация

В 1972 году Вильям Фридвальд [7] показал, что существуют условия, при которых измеряемое значение «общего холестерина» — величина аддитивная. То есть, это простая сумма величин, которые могут быть получены при оценке содержания холестерина в липопротеинах высокой (после осаждения фосфоровольфрамовой кислотой) и низкой плотности с постоянной поправкой на содержание триглицеридов. Расчет содержания холестерина в липопротеинах низкой плотности «по Фридвальду» стал основным в клинических исследованиях. И именно для этих величин с высокой степенью доказательности (уровень 1 а) установлена связь с риском развития атеросклероза [3, 6].

Кроме ограничений, установленных еще самим Фридвальдом (табл. 1), отметим также, что априорно подразумевается независимость результатов анализа общего холестерина, липопротеинов высокой плотности и триглицеридов от характера распределения холестерина по фракциям. Среди прочих недостатков также достижимый уровень качества анализа холестерина ЛПНП по Фридвальду. Если лаборатория работает по нормативам, предусмотренным приказом МЗ № 220, то расчётное значение коэффициента вариации составит около 17% даже без учёта ошибки определения холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС-ЛПВП). Столь высокая вариабельность показателя малоприемлема при его применении с целью контроля за гиполлипидемической терапией. Поэтому значительные усилия были направлены на создание более точных методов — методов «прямого» определения холестерина липопротеинов низкой плотности.

Методы второго поколения

В 1994 году появились иммунохимические методы прямого определения концентрации ЛПНП-ХС. Реактив содержит моноклональные антитела к аро-А- I и аро-Е. Они избирательно защищают ЛПНП от действия ферментов, что позволяет удалить из реакционной смеси ЛПВП, ЛПОНП,

Таблица 1
Сравнительная характеристика методов определения ХС-ЛПНП

Наименование метода	Достоинства	Недостатки
Дифференциальное ультрацентрифугирование	Референтный метод при классификации липопротеинов	1. Является трудоемким методом. 2. Необходимо большое количество образца. 3. Относительно неточный
Метод LRC-ультрацентрифугирования (с гепарин-марганцевой преципитацией)	1. Референтный при определении С-РС. 2. Хорошо стандартизован. 3. Позволяет определить состав липопротеинов. 4. Относительно точный	1. Является трудоемким методом. 2. Необходимо большое количество образца
Электрофорез на бумаге, на ацетате целлюлозы, в полиакриламидном геле	1. Легкая интерпретация результатов. 2. Позволяют классифицировать гиперлипидемии по Фредриксону	Только качественное определение
Количественный электрофорез в агарозном геле	1. Обнаружение атипичных форм липопротеинов. 2. Достаточно точное определение концентрации ЛПНП-ХС	1. Для каждого нового анализа требуется свежий образец. 2. Не дифференцируются Lp(a)-С
Электрофорез в агарозном геле с последующим ферментативным определением	1. Прослеживаемость результатов с результатами референтного метода. 2. Относительно точный метод. 3. Позволяет обнаруживать атипичные формы липопротеинов. 4. Возможность хранения гелей до момента документирования	1. Метод невозможно автоматизировать. 2. Требуется хорошо обученного персонала. 3. Некоторая зависимость от вариантов технологии
Расчет по формуле Фридвальда	1. Является недорогим и общедоступным методом определения ЛПНП-ХС. 2. Является общепризнанным методом определения концентрации ЛПНП-ХС. 3. Установлена клиническая связь с риском развития атеросклероза	1. Имеет ряд ограничений: - взятие крови осуществляется только натощак; - отсутствие у пациента гиперлипидемии III; - содержание триглицеридов ниже 4,52 ммоль/л. 2. Относительно неточен

ЛПНП и хиломикроны. На втором этапе происходит ферментативное определение концентрации холестерина ЛПНП [13]. Именно наборы этого поколения наиболее широко представлены на рынке (табл. 2). Данные методы обладают достаточно высокой специфичностью к ЛПНП. Однако они дают значительное смещение содержания холестерина ЛПНП и ЛПОНП. При этом результаты анализа зависят как от процедуры подготовки образца, так и от особенностей липидного обмена [9, 10, 14].

С клинической же точки зрения, оказалось, что значения, полученные с привлечением методов данного поколения, могут приводить к смещению классификации пациентов по группам риска относительно классификации с привлечением «холестерина по Фридвальду» [10].

Подобный анализ с использованием наборов фирмы DiaSys проводился также и нами. Был проведен ретроспек-

тивный анализ результатов измерения показателей липидного спектра 493 пациентов, у которых измерялся также «прямой» ЛПНП-ХС (были включены все выявленные результаты в городах Волгоград и Волжский на трехмесячном интервале!). Первое, что мы обнаружили, это гораздо более низкая сте-

Таблица 2
Доступные наборы реактивов для определения холестерина ЛПНП

Поколение метода	Фирма-производитель
I поколение методов	1. MerckKGaA 2. Genzyme Diagnostics 3. Roche Diagnostics 4. Ольвекс диагностикам
II поколение методов	1. Sigma Diagnostic 2. PLIVA-Lachema Diagnostika 3. DiaSys 4. Genzyme Diagnostics
III поколение методов	1. Kyowa Medex 2. Uanchi Pure Chemicals 3. Wako Pure Chemical Industries 4. Denka Seiken 5. International Reagents Corporation

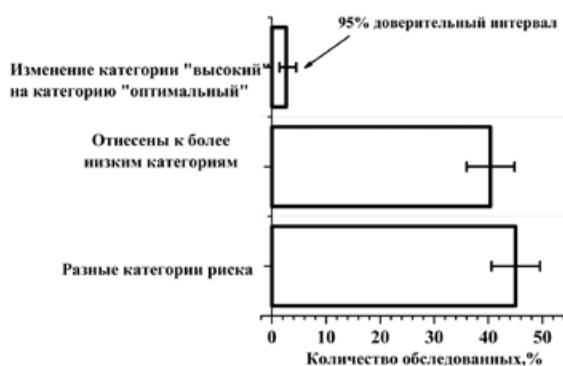


Рисунок 1. Доля пациентов с несовпадающими категориями уровня ЛПНП-ХС [3] при определении прямым методом в сопоставлении с определением по Фридвальду

пять связи между «прямым» ЛПНП-ХС и расчётным показателем ($R^2 = 0,65$), чем это ожидалось с учётом экспериментальной ошибки ($R^2 \sim 0,8$). Второе: по результатам прямого определения примерно в 40% случаев пациенты отнеслись к более низким группам риска по сравнению с классификацией по значению «холестерина по Фридвальду» (рис. 1). То есть, замена показателя Фридвальда на прямое определение предполагает проведение дополнительных эпидемиологических исследований с целью коррекции порогов принятия клинических решений.

Более того, анализ данных с привлечением модели множественной нелинейной регрессии (табл. 3) показал, что одно из ключевых представлений, на котором априорно базируется модель Фридвальда, не вполне корректно. А именно, независимость результатов определения отдельных параметров от содержания холестерина в других компонентах. То есть, полученный по Фридвальду показатель неявным образом отражает особенности распределения холестерина по фракциям, а при прямом определении эта информация не учитывается. Это существенно, по-

скольку уровень ХС-ЛПНП считается важным, но не единственным фактором риска возникновения атеросклероза [3, 6].

Что касается методов третьего поколения («гомогенные методы») [11], то их клинические характеристики нам пока неизвестны. Однако можно предполагать, что с клинической точки зрения возникнет такая же неопределенность, как и в случае методов второго поколения.

Таким образом, в настоящий момент сложилась неоднозначная ситуация. Определение ХС-ЛПНП по Фридвальду не отражает истинного содержания аналита, а также имеет низкую воспроизводимость, что затрудняет мониторинг этого показателя. С другой стороны, прямые методы определения ХС-ЛПНП частично лишены этих недостатков, однако интерпретируемость их результатов не имеет достаточной доказательной базы, что приводит к неопределенности клинических заключений. Это ещё раз позволяет подчеркнуть важнейшую особенность современной клинической химии, а именно, необходимость всестороннего изучения взаимовлияния аналитических процедур и клинической интерпретации результатов лабораторных исследований.

На наш взгляд, замена определения ХС-ЛПНП «по Фридвальду» на «прямые» технологии на данном этапе нецелесообразна до проведения обширных многоцентровых клинических исследований. Более перспективным выглядит путь повышения качества определения ХС-ЛПНП рас-

четным методом Фридвальда от принятого в большинстве КДЛ «минимального» до «оптимального» [2].

Список литературы

1. Аничков Н. Н. Новые данные по вопросу о патологии и этиологии атеросклероза (артериосклероза). // Русский врач. — 1915.8. — с. 184-186; № 9. — с. 207-211.
2. ГОСТ Р 53133.2—2008. Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 2. Оценка аналитической надёжности методов исследования (точность, чувствительность, специфичность). Введён впервые. М. Стандартинформ. 2009.
3. Диагностика и коррекция нарушений липидного обмена с целью профилактики и лечения атеросклероза. Российские рекомендации (IV) пересмотр. М. 2009.
4. Cohn, E.J., Strong, L.E., Hughes, W.L., Mulford, D.J., Ashworth, J.N., Melin M. and Taylor H.L. Preparation and properties of serum and plasma proteins. IV. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. // J. Am. Chem. Soc. — 1946. — vol. 68. — P. 459-475.
5. DeLalla, O.E. and Gofman J. W. Ultracentrifugal analysis of serum lipoproteins. // Meth. biochem. Anal., 1954. — vol. 1. — P. 459-478.
6. Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP). September 2002.
7. Friedewald W. T., Levy R. I., Fredrickson D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without the use of the preparative centrifuge. // Clin. Chem. — 1972. — vol. 18. — P. 499-502.
8. Macheboeuf, M. A. Recherches sur les phosphoaminolipides et les sterides du serum et du plasma sanguins. // Bull. Soc. Chim. biol. (Paris). — 1929. — vol. 11. — P. 268-293.
9. Miller G. W., Gary L. et al. Seven Direct Methods for Measuring HDL and LDL Cholesterol Compared with Ultracentrifugation Reference Measurement Procedures. // Clin. Chem. — 2010. — vol. 56 — P. 977-986.
10. Mora S., Rifai N., Buring J. E., Ridker P. M. Comparison of LDL cholesterol concentrations by Friedewald calculation and direct measurement in relation to cardiovascular events in 27,331 women. // Clin Chem. — 2009. — vol. 55 — P. 888-94.
11. Nauck M., Warnick G. R., Rifai N. Methods for measurement of LDL-cholesterol: a critical assessment of direct measurement by homogeneous assays versus calculation. // Clin. Chem. — 2002. — vol. 48 — P. 236-254.
12. Oncley, J. L., Scatchard, G. and Brown, A. Physical-chemical characteristics of certain of the proteins of normal human plasma. // J. Phys. Chem. — 1947. — vol. 51 — P. 184-198.
13. Pisani T., Gebbski C., Leary E., Warnick G., Ollington J. Accurate direct determination of low-density lipoprotein cholesterol using an immunoseparation reagent and enzymatic cholesterol assay. // Arch. Pathol. Lab. Med. — 1995. — vol. 119 — P. 1127-1135.
14. Schectman G., Patsches M. and Sasse E. A. Variability in cholesterol measurements: comparison of calculated and direct LDL cholesterol determinations. // Clin Chem. — 1996. — vol. 42 — P. 732-737.
15. Wilkinson, C. F. Essential familial hypercholesterolemia: cutaneous, metabolic and hereditary aspects. // Bull. NY Acad. Med. 1950 — vol. 26. — P. 670-685.

Таблица 3

Значимые члены модели зависимости измеренного уровня общего холестерина от уровня холестерина, измеренного в отдельных фракциях. Результаты множественного нелинейного регрессионного анализа

	Значение	Ст. ошибка	P
Смещение	-0,51	0,43	0,23
«Фридвальдовы» компоненты			
1. ХС-ЛПНП (прямой)	1,60	0,21	< 0,0001
2. ХС-ЛПВП	1,48	0,28	< 0,0001
3. Триглицериды (ТГ)	0,45	0,21	0,035
«Нефридвальдовы» нелинейные компоненты!!!			
4. (ХС-ЛПВП) ²	-0,12	0,05	0,020
5. Прямой* ЛПВП	-0,17	0,08	0,046
6. Прямой* ТГ	-0,11	0,05	0,026



Роль микробиологической службы в обеспечении эффективной антибиотикотерапии на современном этапе*

М. С. Поляк, д.м.н., проф.

ЗАО «Научно-исследовательский центр фармакотерапии» (НИЦФ), г. Санкт-Петербург

The role of bacteriological service in providing the effective antibiotic therapy today

M. S. Polyak

Scientific-research centre for Pharmatherapy, St.-Petersburg, Russia

*Настоящая статья является сокращенным вариантом доклада, сделанного автором на Всероссийской конференции «Консолидация науки и практики в лабораторной медицине» (Москва, 2014 г.).

Резюме

Число полирезистентных к антибиотикам штаммов бактерий неуклонно увеличивается. В то же время поиск новых антимикробных препаратов, способных преодолеть устойчивость, сегодня неэффективен. В результате терапия многих инфекций часто является трудной, порой неразрешимой задачей. Микробиологическая служба клинических учреждений способна оказать существенное влияние на преодоление устойчивости возбудителя и повышения эффективности антибиотикотерапии. При исследовании возбудителей тяжелых заболеваний необходимо использовать определение МПК и адекватно интерпретировать их с учетом особенностей фармакокинетики антибиотиков. Важную информацию для терапии септических процессов дает определение МБК (летального действия) препаратов. Широко распространенное сочетанное применение антибиотиков должно базироваться на лабораторных данных. Внедрения специальных методик требуют определение ванкомицинрезистентности энтерококков, образования широко-спектральных бета-лактамаз грамотрицательными бактериями, метициллинрезистентности стафилококков. При лечении тяжелых болезней необходимо непосредственное участие микробиолога в лечебном процессе.

Ключевые слова: антимикробные средства, чувствительность, резистентность, МПК, МБК, бета-лактамазы.

Summary

The number of multi-resistant bacteria increases rapidly. It fails to create the new antimicrobials in recent years. The therapy of infectious diseases is often a difficult task. Bacteriological service is able to remarkably improve the effectiveness of antibiotic therapy. All round testing of pathogen is necessary for this purpose. In this article the need for MIC and MBC determination during therapy of serious diseases and estimation of pathogen sensitivity to combined effect of antibiotics, as well as detection of beta-lactamase production by gram negative bacteria are discussed.

Key words: antimicrobial agents, susceptibility, resistance, MIC, MBC, beta-lactamases.

Одной из главных и наиболее тревожных проблем современной противомикробной терапии является антибиотикорезистентность возбудителей заболеваний человека. Именно она породила поток публикаций, в которых не без оснований утверждается, что человечество сползает в доантибиотическую эру, что все успехи медицины в борьбе с инфекциями бактериальной и грибной природы могут оказаться утрачены [1, 2]. К сожалению, последняя публикация ВОЗ (2014 год) лишь подтверждает реальность этих опасений [3]. Речь идет уже не просто об устойчивости микроорганизмов к отдельным антибиотикам, а о множественной резистентности (полирезистентности и даже панрезистентности), резко ограничивающей круг тех антимикробных препаратов, которые могут быть применены в терапевтических целях, заставляющей зачастую

использовать не самые активные или далеко не безопасные для человека антибиотики [4, 5]. Но сказанное лишь одна сторона проблемы. Не менее тревожен и тот факт, что катастрофически убывает число новых антимикробных соединений с оригинальным механизмом действия на микробную клетку. А ведь именно с их помощью благодаря новым антибиотикам с иным механизмом действия многие десятилетия успешно преодолевали антибиотикоустойчивость бактерий. Сегодня о смене поколений антибиотических препаратов говорить не приходится, фактически их нет.

Возникает закономерный вопрос, что делать в подобной ситуации. Его обсуждают на разных уровнях, в том числе самых высоких, но, к сожалению, сколь-нибудь эффективных решений пока не предложено [6]. Положение продолжает ухудшаться.

Естественно, что выход может быть найден только на основе целенаправленной деятельности многих служб и медицинского, и иного профиля. Однако не будет преувеличением сказать, что значительный вклад может (и должна) внести в решение проблемы антибиотикорезистентности лабораторная микробиологическая служба лечебных учреждений. И сделать это она способна на основе существенной переориентации и расширения сферы своей деятельности. Для этого есть ряд очевидных предпосылок. Не вызывает сомнений, что возникновению и распространению резистентных (полирезистентных в том числе) штаммов бактерий и грибов способствует интенсивное применение антимикробных препаратов. В наше время обширных операций, трансплантации органов, применения цитостатических средств, ради-

оционной терапии и многих других сложных пособий, наконец, старения населения и т. п. потребность в мас-сированной, длительной, повторной антибиотикотерапии существенно возросла, а отсюда и особо благоприятные условия для возникновения устойчивости возбудителя. Недаром с ней, как правило, чаще всего изначально встречаются в отделениях интенсивной терапии, в тех стационарах, где больные с обширными поражениями тканей длительно пребывают на больничной койке. Многократно доказано, что чем точнее выбран для терапевтических целей антимикробный препарат (-ы), чем более чувствителен микроб к назначенному антибиотику, тем более эффективен лечебный процесс, тем менее вероятно возникновение устойчивости микроба. И наоборот, плохо обоснованный, случайный выбор лекарственного средства создает условия для негативного исхода заболевания, длительной противомикробной терапии и, как следствие, резистентности патогена к антибиотикам.

Ответить на вопрос, какой антибиотик или какие антибиотики (их сочетания) наиболее рациональны, какие из них способны в каждом конкретном случае обеспечить максимально возможный лечебный эффект, может только микробиологическая служба лечебного учреждения. Подчеркнем, только лаборатория в состоянии дать объективное обоснование для выбора оптимального антимикробного лекарственного средства. В наше время полирезистентности микроорганизмов к антибиотикам, когда речь идет о лечении тяжелых больных с инфекционной патологией, по сути, полноценное микробиологическое исследование — это решение вопроса о человеческой жизни. Как бы претенциозно это не звучало, но это действительно так.

Однако в свою очередь и микробиологическая служба должна в полной мере отвечать требованиям сегодняшнего дня. Для этого микробиолог должен использовать весь возможный арсенал доступных методических приемов, позволяющий разносторонне, неформально оценить возможность воздействия ан-

тимикробных лекарственных средств на возбудителя заболевания. Когда речь идет о терапии тяжелых больных, определение чувствительности микроба к антибиотикам — это в лучшем случае лишь ориентировочная вводная информация. Фактически она должна быть существенно шире и, что важно, индивидуальна для каждого больного [7, 8, 9].

Установив родовую и видовую принадлежность микроба, возбудителя заболевания, микробиолог сразу может определить круг тех антимикробных препаратов, которые адекватны его конститутивной чувствительности к антибиотикам. Теперь задача состоит в том, чтобы исключить те противомикробные средства, к которым возбудитель вторично (индуцированно) резистентен. В подавляющем большинстве случаев для этой цели используют так называемый диск-диффузионный метод. Это мировая практика. Если инфекционная патология не представляет угрозы для жизни больного, с этим можно согласиться. Та ориентировочная информация (часто запоздалая, ненужная), которую при этом получают, чаще всего достаточна. В этом случае уместно, скорее, ставить вопрос об ограничении сплошь и рядом ненужных микробиологических исследований, препятствующих полноценному выполнению лабораторной службой ее функций. Иное дело, когда объектом изучения является возбудитель тяжелой патологии, когда результат исследования его чувствительности (резистентности) способен самым радикальным образом повлиять на эффективность антибиотикотерапии. В этой связи уместно вспомнить, какова цена исследования, выполненного «методом дисков» [10]. Критерий чувствительности микроба, установленный таким образом, это не более чем эквивалент минимальной подавляющей концентрации (МПК), определенной методом серийных разведений. К тому же это не только вторичный, но и (в отличие от МПК) лишь качественный показатель. Даже в стандартах, регламентирующих установление зависимости между подавляющими концентрациями и диаметрами зон

подавления роста микроба вокруг дисков с антибиотиками, допускается возможность 10% ошибок, в том числе существенных. Специальные исследования показали, что число расхождений между первичным показателем (МПК) и вторичным (диаметром зоны подавления роста микроба) может быть значительно большим: в трети случаев диск-диффузионный метод не обеспечивает получения достоверных данных. В этой связи метод серийных разведений при оценке чувствительности к антибиотикам возбудителей тяжелых заболеваний представляется и более надежным, и более информативным, ведь МПК — это количественный показатель чувствительности. Зная ту концентрацию, которая необходима для подавления репродукции микроба, ее можно сравнить с фармакокинетическими показателями, тем количеством антибиотика, которое достижимо в организме человека при его введении больному в той или иной дозе. Такой возможности в последние годы уделяют особое внимание. Множественная резистентность бактерий к антибиотикам порождает ситуацию, при которой круг противомикробных препаратов, пригодных для лечебных целей, может оказаться крайне узким или включать только малоэффективные средства. Одним из реальных решений в этом случае является применение в больших дозах антибиотиков с ограниченным прямым токсическим действием (антибиотиков широкого дозирования). К их числу принадлежат, прежде всего, пенициллины (бензилпенициллин, ампициллин, пиперациллин и др.). В ряде случаев могут быть использованы в больших дозах цефалоспорины и фосфомицин. Цель очевидна — создать в организме больного такие концентрации антибиотика, которые позволили бы преодолеть резистентность возбудителя. Но подобное решение возможно только при том условии, если степень резистентности микроба к малотоксичным антибиотикам невелика, если соотношение МПК и фармакокинетических показателей это позволяет. К такой практике в наши дни прибегают при терапии инфекций, вызванных метициллинре-

зистентными стафилококками, ванкомициноустойчивыми энтерококками, бактериями сем. *Enterobacteriaceae*, образующими широкоспектральные бета-лактамазы (бета-лактамазы расширенного спектра, AmpC бета-лактамазы и особенно карбапенемазы), а также множественно устойчивыми так называемыми неферментирующими бактериями (родов *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*). Очевидно, что решающую роль в данном случае играет лабораторная служба. Именно она (и только она) способна определить, какие антибиотики в каких дозах способны обеспечить подавляющее действие на возбудителя. Для этого необходимо определить МПК.

Но это лишь первый шаг. Напомним, что речь идет о тяжелых больных, а МПК — это показатель возможного подавления антибиотиком способности микроба к репродукции, но не его жизнеспособности. Современная антимикробная химиотерапия базируется на синергидном действии двух факторов: внешнего, антибиотиков, и защитных сил самого больного, его иммунитета. Если несколько упростить, первый ингибирует физиологические процессы в микробной клетке, а второй оказывает летальное действие. Но у больных с тяжелым инфекционным процессом, при сепсисе, эндокардите, обширных деструктивных процессах в тканях, у пожилых людей, при применении массивной фармакотерапии и во многих других ситуациях иммунитет больного в лучшем случае не оптимален, а часто в значительной степени подавлен. Второй фактор борьбы с микробом возбудителем исключается, он «не работает». А это значит, что микроб, пережив антибиотическую атаку и сохранив жизнеспособность, в состоянии вновь привести к обострению патологического процесса. В немалой степени этому способствует селекция резистентных к антибиотику клеток. Она типична для подобной ситуации. Вот почему при тяжелых заболеваниях функцию подавления уже не репродукции, а жизнеспособности микроба должен реализовать антимикробный препарат. Однако для этого надо иметь

представление о летальном (бактерицидном) действии антибиотика на возбудителя.

Существует достаточно давно установленный критерий бактерицидности препарата. Его обозначают как минимальная бактерицидная концентрация (МБК). По сути, это характеристика чувствительности микроба к антибиотикам, которая позволяет судить о том, реально или не реально, используя антимикробный препарат в допустимой дозе, создать в организме больного такие его концентрации, которые позволили бы убить возбудителя, санировать ткани. Переоценить такую информацию для лечебных целей трудно. Справедливо мнение, что при терапии сепсиса, других тяжелых септических процессов важно установить не МПК, а МБК, ориентироваться при выборе антибиотика на чувствительность возбудителя к его летальному, а не подавляющему действию. Естественно, что подобную информацию можно получить только путем лабораторных исследований. Только микробиолог способен ответить на вопрос о перспективе достижения бактерицидного действия при введении того или иного антибиотика больному и какова та его доза, которая в данном случае необходима. Важно подчеркнуть, что речь не идет о каком-то сложном анализе. Определение МБК — это технически традиционное микробиологическое исследование. Оно включает, как первый этап, определение МПК методом серийных разведений в жидкой питательной среде с последующим, как второй шаг, мерным высевом из пробирок с отсутствующим видимым ростом на плотную питательную среду. Детали исследования стандартизованы и опубликованы, в том числе в отечественных изданиях [8].

Клиническая практика диктует необходимость еще одного микробиологического исследования, целесообразность которого напрямую связана с предупреждением и преодолением полирезистентности возбудителей заболеваний. Речь идет о лабораторном обосновании антибиотикотерапии сочетанием этиотропных препаратов. Применение одновременно двух или даже более

антибиотиков для терапии тяжелой инфекционной патологии является широко распространенным явлением. Более того, сочетанная антибиотикотерапия сегодня — это требование многих стандартов, как зарубежных, так и отечественных, в которых речь идет о лечении сепсиса, эндокардита, ряда гнойных и гнойносептических заболеваний. Если исключить некоторые показания к сочетанной антибиотикотерапии, обоснованность которых сомнительна или не выдержала испытания временем, то основанием могут быть названы эмпирическое назначение антимикробных препаратов при отсутствии данных о возбудителе заболевания, смешанная микрофлора с разной чувствительностью ассоциантов к антибиотикам, применение антимикробных средств для предупреждения резистентности микроба (-ов) и, наконец, как основной довод, достижение синергидного действия, в том числе бактерицидного. Последнее показание к сочетанной антибиотикотерапии обсуждается наиболее широко, с ним связывают и возможность обеспечения клинического эффекта, и преодоление устойчивости возбудителя, особенно при его полирезистентности.

Очевидно, что во всех случаях обоснованная комплексная антибиотикотерапия реальна только при наличии лабораторных данных. Сочетанное действие антибиотических препаратов на микробную популяцию способно привести к весьма разным результатам, как благоприятным для лечебного процесса, так и к неприемлемым [10]. Синергидный (потенцированный) эффект проявляется только при сочетании достаточно узкого круга антибиотиков в определенном диапазоне их концентраций, которые зависимы от чувствительности штамма возбудителя к взятым вместе препаратам. То есть искомое потенцированное действие далеко не обязательно. Сочетанная антибиотикотерапия может ограничиться суммарным (аддитивным) действием на микробную популяцию, что в практическом плане приемлемо. Но оно может быть индифферентным, когда лечебное действие оказывает только один взятый

в сочетании антибиотиков, а другой препарат функционирует лишь как повреждающий (больного) агент. Но и это не самое худшее. Куда более опасен антагонизм в действии двух антибиотиков. Конкурентное действие — это реальность. Оно достаточно хорошо изучено *in vitro* и в эксперименте. Однако его трудно выявить в клинике, впрочем, как и синергидное действие. Лечение тяжелых инфекций, вызванных полирезистентными бактериями, резко осложнило проблему выбора надежных сочетаний антибиотиков, таких, которые бы обеспечивали потенцированное действие, и которые не были бы конкурентны. Традиционная практика назначения бета-лактамов с аминогликозидами сегодня не выдерживает критики в силу достаточно частой и значительной устойчивости бактерий как к той, так и к другой группе антибиотиков. Уместно в этой связи вспомнить о метициллинрезистентных стафилококках, об эшерихиях и других грамотрицательных микроорганизмах сем. *Enterobacteriaceae*, образующих бета-лактамазы расширенного спектра, карбапенемазы и т.д. В такой ситуации только микробиологическая служба способна определить чувствительность микроба к сочетанию антибиотиков, дать прогноз о возможности проявления как синергидного, так и антагонистического действия, рекомендовать дозу каждого из антибиотиков, необходимую для создания их концентраций, способных обеспечить потенцированный эффект.

Микробиологическое обоснование выбора двух антибиотиков для их совместного применения базируется на использовании специальных методик, которые в мировой практике прошли достаточную проверку и вошли в соответствующую методическую документацию. Технически они не сложны, традиционны для бактериологов, не требуют больших временных и материальных затрат. Наиболее применяемы и стандартизованы две методики. Первая получила название «метод шахматной доски». В отечественной литературе ее часто называют перекрестным

титрованием. Суть методики заключается в определении МПК каждого антибиотика в отдельности и их сочетаний, взятых в последовательно убывающих концентрациях то первого, то второго препарата. По несложной формуле определяют индекс сочетанного действия антибиотиков на микробную популяцию (синергидное, индифферентное, антагонистическое) [8].

Другой метод позволяет оценить бактерицидное действие двух антибиотиков, взятых вместе, в сравнении с таким же действием каждого из них. Оно оценивается во времени, поэтому о преимуществе двух антибиотиков судят не только по подавлению жизнеспособности клеток, но и по скорости наступления летального эффекта. Технически проведение исследования не сложно, оно доступно для любой микробиологической группы клинической лаборатории, но требует определенных временных затрат, что связано с необходимостью повторных посевов в течение суток.

Таким образом, терапия тяжелых инфекций может потребовать от микробиологической службы три варианта определения чувствительности возбудителя к антимикробным препаратам:

- подавляющего действия антибиотиков, в том числе с установлением МПК основных лечебных препаратов (которых, как правило, немного — два–три);
- бактерицидного действия основных антибиотиков;
- сочетанного действия совместимых антибиотических лекарственных средств.

Однако это пусть важная, но лишь часть тех исследований, необходимостью в которых диктует множественная устойчивость к антибиотикам возбудителей заболеваний человека. Существующие так называемые фенотипические методы определения чувствительности бактерий к противомикробным препаратам сегодня достаточно часто не обеспечивают выявления резистентности к ним микроба. Ни метод серийных разведений, ни диск-диффузионный метод далеко не всегда позволяют устано-

вить метициллинрезистентность стафилококков, ванкомицинрезистентность энтерококков, устойчивость к бета-лактамам антибиотикам многих грамотрицательных бактерий, в том числе семейства кишечных и так называемых неферментирующих бактерий. И это далеко не полный перечень. Особо следует упомянуть ту устойчивость грамотрицательных бактерий, которая является следствием продукции бета-лактамаз расширенного спектра действия (БЛРС), AmpC бета-лактамаз (AmpC БЛ) и карбапенемаз (КП). Среди последних особо следует упомянуть металло-бета-лактамазы [8, 11]. Внимание к этим трем группам гидролаз не случайно, оно определяется рядом причин. Их синтез микроорганизмами резко ограничивает (БЛРС, AmpC БЛ) или исключает (КП) возможность клинического применения бета-лактамов антибиотиков (пенициллинов, цефалоспоринов, карбапенемов, монобактамов), которые являются основной группой лекарственных средств для лечения многих тяжелых заболеваний, включая сепсис и эндокардит.

Устойчивость грамотрицательных бактерий к этой группе антибиотиков очень часто является отражением множественной резистентности, включающей не только бета-лактамы, но и аминогликозиды, фторхинолоны, тетрациклины, хлорамфеникол и др. Образование перечисленных выше бета-лактамаз, особенно КП, бактериями семейства кишечных и так называемыми неферментирующими бактериями приобретает все большее распространение, число устойчивых штаммов неуклонно растет. Наконец, что особо важно, резистентность микроорганизмов, образующих БЛРС, AmpC БЛ и КП, к антибиотикам, при всей ее специфичности, можно и должно диагностировать. Для этого существуют специальные методики, достаточно простые и доступные любой клинической лаборатории. Диагностика БЛРС вошла в отечественную распорядительную документацию, правда, в редуцированном виде. Методики выявления других бета-лактамаз еще требуют

внедрения в отечественную практику. Методология выявления БЛРС, AmpC БЛ и КП при всей ее простоте тем не менее предполагает специальную подготовку микробиологической службы, стандартизацию и в отдельных случаях определенное материальное обеспечение. Существуют ориентировочные («скрининговые») и подтверждающие методы определения ферментообразования [7, 12]. Первые рекомендуют использовать достаточно широко, когда объектом исследования является штамм, устойчивый к нескольким другим антибиотикам (любой группы, в том числе не принадлежащим к бета-лактамам), а также, если микроб выделен от больного, длительно и повторно леченного бета-лактамами антибиотиками. Показанием могут служить эпидемиологические исследования в данном лечебном учреждении или конкретном регионе, если они свидетельствуют о неблагоприятии с распространением устойчивых к антибиотикам бета-лактаманной структуры микроорганизмов. Значимость «скрининговых» методик установления ферментообразования, необходимость их системного применения споров не вызывают. Определенная дискуссия ведется вокруг того, какие методы использовать для окончательного подтверждения продукции возбудителем БЛРС, AmpC БЛ и особенно карбапенемаз. Существует, по меньшей мере, три варианта методик:

- с применением специфичных ингибиторов каждой из названных групп ферментов;
- выявление бета-лактамаз по подавлению (или его отсутствию) роста микроба-свидетеля, чувствительного к действию того или иного бета-лактаманного препарата;
- и наконец, с помощью биохимического тестирования роста микроба в присутствии антибиотика.

Последний методический прием реализуется с помощью специальных наборов и пока применяется редко. Его эффективность еще требует накопления подтверждающих данных. Зато не вызывает сомнений целесообразность использования в диагно-

стических целях клавулановой кислоты, которая является избирательным ингибитором БЛРС, но не AmpC БЛ и КП. Такими же свойствами обладают тазобактам и сульбактам. Клоксациллин и некоторые соли борониевых кислот селективно подавляют активность AmpC БЛ, но не ингибируют другие группы ферментов. Наличие в молекуле металло-бета-лактамаз цинка (его нет в структуре других бета-лактамаз) определило высокую избирательность как их ингибиторов, хелатообразующих агентов, в первую очередь доступной и высокоактивной натриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты, более известной по аббревиатуре ЭДТК (или, в английской транскрипции, EDTA). Металло-бета-лактамазы — наиболее распространенные карбапенемезы. Но есть и другие ферменты, обладающие гидролитическим действием на карбапенемы, также как и на другие антибиотики бета-лактаманной структуры. В их активном центре нет металла, это сериновые гидролазы. Вот для них специфичных, пригодных для диагностических целей ингибиторов пока не предложено. Поэтому представляется несколько искусственным противопоставление одних методик определения бета-лактамаз другим. В частности, вариант «со свидетелем», в том числе включенный в некоторые зарубежные стандарты Hodge test, является не конкурентным для ингибиторов, а еще одним достаточно информативным методом. В сложной ситуации с выявлением бета-лактамаз его целесообразно использовать совместно с ингибиторами ферментов. Чем больше будет применяться методик, тем вероятнее выявление скрытой способности бактерий семейства *Enterobacteriaceae* и так называемых неферментирующих бактерий к продукции бета-лактамаз, в том числе карбапенемаз. Клиническую значимость результатов такого тестирования переоценить невозможно.

Хотелось бы еще раз подчеркнуть, что роль лабораторной службы в обосновании надежной, максимально выверенной антибиотикотерапии сегодня не просто важна. Заключение врача-микробиолога, исследовавшего

возбудителя тяжелой инфекции, это, по сути, единственный объективный критерий для оптимального выбора антимикробного препарата, его дозы и режима введения больному. Других просто нет. Но для этого исследователь должен владеть всеми доступными методами, позволяющими судить о возможности воздействия антибиотиков на микроб. И не просто владеть, а трезво оценивать их необходимость, информативность и надежность в каждом конкретном случае. В свою очередь, для этого надо знать больного, быть неформальным участником лечебного процесса. Врач-лаборант, врач-микробиолог — это прежде всего врач, остальное — только специализация.

Список литературы

1. Boucher H., Talbot G., Bradley J. et al. Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. // *Clin. Infect. Dis.* — 2009, — vol. 48, n. 1, — p. 1–12.
2. Livermore D. Has the era of untreatable infections arrived? // *J. Antimicrob. Chemother.* — 2009, — vol. 64, suppl. 1, — p. 29–36.
3. Antimicrobial Resistance. Global Report on Surveillance. World Health Organization, 2014, — 257 p.
4. Falagas M., Bliziotis A. Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era? // *Intern. J. Antimicrob. Agents.* — 2007, vol. 29, n. 7, — p. 630–636.
5. Hsu A., Tamma P. Treatment of Multidrug-Resistant Gram-Negative Infections in Children. // *Clin. Infect. Dis.* — 2014, — vol. 58, n. 10, — p. 1439–1448.
6. IDSA. Combating Antimicrobial Resistance: Policy Recommendations to Save Lives. // *Clin. Infect. Dis.* — 2011, vol. 52, suppl. 5, — p. 397–428.
7. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistance of clinical and/or epidemiological importance. // 2013, — 40 p.
8. Поляк М. С. Лабораторное обеспечение антибиотикотерапии. // *Спб.* — 2012, — 255 с.
9. Livermore D., Andrews J., Hawkey P. et al. Are susceptibility tests enough or should laboratories still seek ESBLs and carbapenemases directly? // *J. Antimicrob. Chemother.* — 2012, — vol. 67, n. 7, — p. 1569–1577.
10. Поляк М. С. Антибиотикотерапия. Теория и практика. // *Спб.* — 2010, — 424 с.
11. Bush K., Jacoby G. Updated Functional Classification of beta-Lactamases. // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2010, — vol. 54, n. 3. — p. 969–976.
12. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. M100-S24. // *CLSI*, — 2014, — 219 p.



Молекулярно-генетическая методика оценки риска неблагоприятного течения заболевания при поверхностном раке мочевого пузыря

О. В. Сеницына, врач высшей категории, зав. клинико-диагностической лаборатории
А. А. Чанкина, врач-цитолог высшей категории клинико-диагностической лаборатории
М. В. Илюшкина, врач второй категории клинико-диагностической лаборатории
Д. В. Долгих, врач урологического отделения первой категории

ГУЗ «Московская онкологическая больница № 62» департамента здравоохранения г. Москвы

Molecular-genetic technique of the risk estimation for the adverse current of disease at superficial bladder carcinoma

O. V. Sinitina, A. A. Chankina, M. V. Iliushkina, D. V. Dolgikh
Oncological Clinic № 62, Moscow, Russia



О. В. Сеницына

А. А. Чанкина

М. В. Илюшкина

Резюме

Впервые в России на базе клинико-диагностической лаборатории больницы № 62 апробирована неинвазивная ИЦХ методика определения p16ink4a в моче.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, иммуноцитохимическое (ИЦХ) исследование, p16ink4a.

Summary

Based on clinical diagnostic laboratory hospital № 62 approved non-invasive method of determining immunocytochemistry r16ink4a in the urine for the first time in Russia.

Key words: bladder cancer, immunocytochemical (ITSH) research, p16ink4a.

Заболеваемость раком мочевого пузыря (РМП) во всем мире имеет неуклонную тенденцию к росту. По данным ВОЗ, на РМП приходится около 3% злокачественных новообразований. Среди всех онкоурологических заболеваний новообразования мочевого пузыря занимают второе место по заболеваемости после рака предстательной железы. Прирост за последние десять лет составил 14,85%. В структуре онкологической заболеваемости в РФ РМП занимает четвертое место у мужчин и десятое у женщин (соотношение 3:1).

Самой распространенной формой РМП является переходно-клеточный рак, для которого характерны длительное течение, прогрессирующий рост и частое рецидивирование.

Частое рецидивирование обусловлено биологическими особенностями опухоли, характеризующимися множественностью опухолевых зачатков в слизистой оболочке мочевого пузыря (истинные рецидивы); невыявленные и неудаленные во время операции очаги рака *in situ* или мелкие папиллярные опухоли (ложные рецидивы); возможность имплантации в поврежденные участки уротелия отделенных во время ТУР

от основной опухоли раковых клеток

Методы диагностики РМП: абдоминальное и трансуретральное ультразвуковое сканирование; цистоскопия с биопсией; рентгеновские исследования (экскреторная урография и радиоизотопные методы); компьютерная томография с контрастированием; цитологическое исследование осадка мочи.

Цель исследования

Улучшить результаты ранней диагностики первичного уротелиального рака и его рецидива за счет использования ИЦХ методики определения p16ink4a в моче.

Задачи

1. Апробировать ИЦХ методику с помощью набора CINTec Roche.
2. Провести сравнительную оценку эффективности цитологического метода в первичной диагностике РМП и его рецидивов при применении этой методики и без нее.
3. Оценить эффективность методики в первичной диагностике и рецидивов плоских поражений мочевого пузыря по сравнению с данными зарубежных коллег.
4. Изучить эффективность ИЦХ ме-

тодики определения p16ink4a при контрольном обследовании после ТУР мочевого пузыря.

5. Провести сравнительный анализ чувствительности и специфичности методики в зависимости от степени злокачественности.

Материалы и методы исследования

Материал: моча; оборудование: анализатор осадка мочи UF-1000i, Sysmex; SurePath, BD; Autostainer Link 48; Dako; методы: проточная цитометрия, ИЦХ, цитологическое исследование.

Исследование проводили: при предположительном диагнозе о наличии первичной опухоли или рецидива РМП, на основании жалоб больных, анамнестических данных, анализа осадка мочи с наличием малых круглых клеток; в плановом порядке через 4–6 недель после ТУР мочевого пузыря по поводу рака; при наличии рецидива заболевания или предположении о нем; во время диспансерного наблюдения после ТУР согласно стандартам лечения и обследования онкологических больных.

Результаты исследования

В работе проведен анализ результатов обследования 42 пациентов, которые госпитализированы в плановом порядке и по неотложным показаниям в урологическое отделение больницы с ноября 2013 года по март 2014-го.

Сравнение наших результатов с опытом зарубежных коллег

- 26,7–66,7% (11–100%) — уротелиальный рак высокой и низкой степени злокачественности вместе.
- 73,4% (80%) — уротелиальный рак высокой степени злокачественности.
- В 100% рак in situ.

Выводы

1. Методика ИЦХ исследования определения p16ink4a может быть использована как для ранней диагностики РМП, так и для контроля излеченности, выявления рецидивов.
2. Полученные данные сопоставимы с данными зарубежных коллег.
3. Первое впечатление, что данная методика эффективнее традиционного цитологического метода в первичной диагностике РМП, но вопрос требует дальнейшего изучения.

Перспективы

- Применение p16/CK20 — двойной метки ИЦХ-окрашивания в мазке мочи.
- Определение CYFRA 21/1 в моче, что является эффективным, доступным, экономичным и неинвазивным методом исследования в диагностике РМП и его рецидивов (Шелепова В. М., РОНЦ им. Н. Н. Блохина).

Клинический случай

Больная К., 83 лет. С 2013 года дизурические явления, эпизодическая макрогематурия. В феврале 2014 года при УЗИ выявлена опухоль мочевого пузыря 55 × 53 мм. Цистоскопия 12.02.2014: на правой боковой стенке солидная опухоль 3 × 4 см на широком основании.

17.02.14. Проведено цитологическое исследование мочи № 475 (рис. 1).

В исследуемом материале среди разрушенных эритроцитов и нейтрофилов обнаружены единичные комплексы, напоминающие сосоч-

Таблица 1
Результаты исследования у больных различных групп на p16ink4a

	p16ink4a +	p16ink4a –
Первичные больные	12	2
Больные после ТУР 4–6 недель	1	1
Рецидивы	15	4
Ремиссия более 6 месяцев	0	7
Всего	28 (66,7%)	14 (33,35%)

Таблица 2
Распределение больных p16ink4a + по степени злокачественности

Группы больных	Число больных	Высокая степень злокачественности		Низкая степень злокачественности	
		Абс.	%	абс	%
Первичные больные	12	8	66,7	4	33,3
Пациенты после ТУР	1	1	100	–	–
Рецидивы	15	11	73,4	4	26,6
Ремиссия	0	0	0	0	–
Всего	28	20	–	8	–

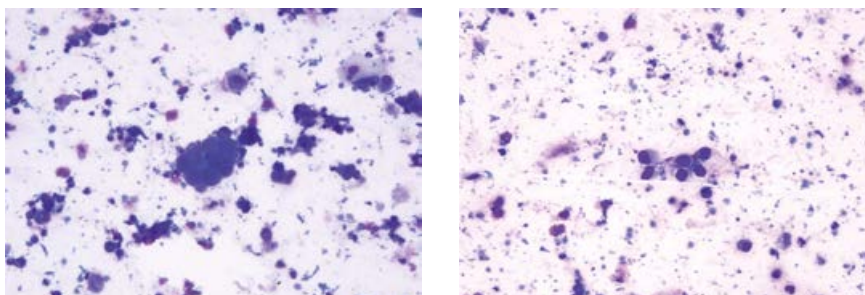


Рисунок 1. Цитология мочи традиционным методом, ×10, окраска Leukodif 200.

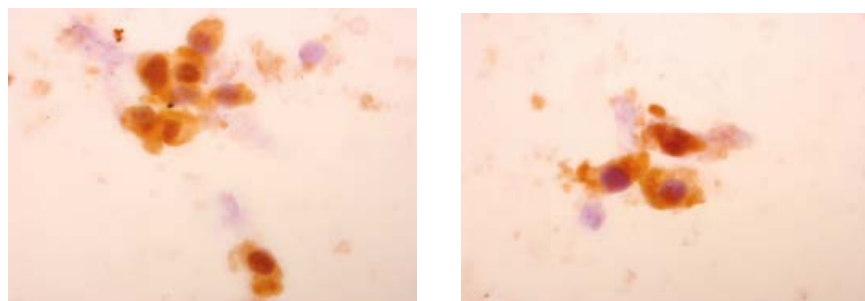


Рисунок 2. Исследование на онкопротеин p16ink4a, CLON E6H4 EPITOPE RS, Autostainer Link48, DAKO. Выраженный позитивный сигнал в цитоплазме и ядре клеток уротелия при дисплазии.

ковые структуры из полиморфных клеток, принадлежащих уротелиальному раку.

Проведено иммуноцитохимическое исследование на онкопротеин p16ink4a, CLON E6H4 EPITOPE RS, Autostainer Link48, DAKO — выраженный позитивный сигнал в цитоплазме и ядре клеток при дисплазии уротелия.

27.02.2014. Резекция мочевого пузыря, уретероцистоанастомоз справа.

Гистологическое исследование № 14/3–1 247: уротелиальный РМП высокой степени злокачественности с выраженной плоскоклеточной

дифференцировкой и прорастанием всей толщи мышечного слоя пузыря, слизистой оболочки устья правого мочеточника и врастанием в прилежащую жировую клетчатку.

Список литературы

1. Yin K и соавт. p16ink4a immunoreactivity is a reliable marker for urothelial carcinoma in situ. *Hum. Pathol.* 2008; 39: 527–35.
2. Nakazawa и соавт. p16ink4a expression analysis as an ancillary tool for cytological diagnosis of urothelial carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.* 2009; 132: 776–84.
3. Шелепова В. М., РОНЦ им. Н. Н. Блохина; семинар ООО «Рош Диагностика Рус» по использованию онкомаркеров линии Elecsys в лабораторной практике; апрель 2014 г.



Морфологическая диагностика новообразований гепатопанкреатобилиарной зоны на материале тонкоигольной аспирационной биопсии

И. Н. Костючек, к.м.н., врач-патологоанатом¹

О. Л. Василёва, врач-цитолог¹

С. Л. Воробьев, к.м.н., зав. лабораторией¹

Е. Г. Солоницын, к.м.н., врач-эндоскопист^{2,3}

¹Лаборатория морфологических исследований Санкт-Петербургского клинического комплекса ФБГУ «Национальный медико-хирургический центр им. Н. И. Пирогова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

²Отделение эндоскопии ФГБУЗ «Клиническая больница № 122 им. Л. Г. Соколова» ФМБА России, г. Санкт-Петербург

³Медицинский факультет ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет» (СПбГУ), г. Санкт-Петербург

Morphological diagnosis of hepatopancreatobiliary malignancies on fna-biopsy

I. N. Kostyuchek¹, O. L. Vasileva¹, S. L. Vorobyev¹, E. G. Solonitsyn^{2,3}

National Clinical Medical Surgical Center n.a. N. Pirogov, Clinical Hospital № 122 n.a. L. G. Sokolov, Medical Faculty of Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

Резюме

ЭУС-ТАБ образований гепатопанкреатобилиарной зоны позволяет получать информативный материал для цитологического исследования или исследования cell-блоков в 66,7% случаев. Информативность морфологического исследования повышается до 94,0% при комплексном подходе (одновременном использовании цитологического метода, метода исследования cell-блоков и иммуноморфологического исследования). ЭУС-ТАБ является высокоэффективным методом, позволяющим решать диагностические задачи.

Ключевые слова: опухоли поджелудочной железы, аденокарцинома, ЭУС-ТАБ, cell-блок.

Summary

In 66,7% of cases EUS-FNA of hepatopancreatobiliary lesions afford to obtain an adequate samples for conventional cytology or cell-blocks. If these methods are combined the results are much better and amount of informative material reaches 94,0%. EUS-FNA has a high clinical utility in revealing and making diagnosis of pancreatobiliary zone tumors.

Key words: pancreatic tumor, adenocarcinoma, EUS-FNA, cell-block.

Рак поджелудочной железы занимает четвертое место в структуре причин смерти от рака в Европе. Заболеваемость раком, в том числе данной локализации ежегодно возрастает [1]. Протоковая карцинома представляет собой наиболее часто встречающееся злокачественное новообразование поджелудочной железы с неблагоприятным прогнозом [4]. Реже встречаются другие формы карцином, такие как нейроэндокринная, ацинарная, железисто-плоскоклеточная, метастатическая и другие.

Факторами риска развития протоковой карциномы поджелудочной железы являются курение, ожирение, особенности питания: потребление большого количества жиров при низком потреблении фруктов и овощей. Риск развития рака поджелудочной железы возрастает у паци-

ентов с хроническим панкреатитом, наследственными формами панкреатита, сахарным диабетом, а также у пациентов с гастрэктомией в анамнезе [2]. Стертость клинических проявлений, быстрая прогрессия заболевания, а также сложность получения материала из образований поджелудочной железы для морфологического исследования (связанная с топографическими особенностями органа и высоким риском осложнений при хирургических манипуляциях) затрудняют раннюю диагностику опухолей поджелудочной железы.

Появление эндоскопической тонкоигольной аспирационной биопсии под контролем эндоУЗИ (ЭУС-ТАБ) кардинально изменило возможности предоперационной диагностики карцином поджелудочной железы [1] ввиду того, что метод является ма-

лотравматичным и позволяет получать материал, который может быть использован для расширенной морфологической диагностики (цитологической, исследования cell-блоков, иммуноморфологического исследования).

Материалы и методы

За 2012–2013 годы на базе эндоскопического отделения клинической больницы № 122 им. Л. Г. Соколова выполнены 57 ЭУС-ТАБ образований гепатопанкреатобилиарной зоны, исследованных в лаборатории морфологических исследований Национального медико-хирургического центра им. Н. И. Пирогова. В 45 случаях пунктированы образования поджелудочной железы, в двух — образования желчевыводящих протоков, в восьми — измененные лимфатические

узлы, в одном — образование двенадцатиперстной кишки, еще в одном случае — образование печени.

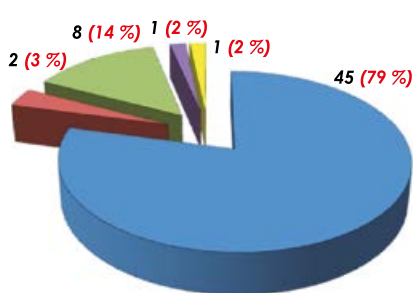
Алгоритм морфологической диагностики включал использование традиционной, жидкостной цитологии, метода исследования cell-блоков, иммуноморфологических методик.

Результаты

18-ти пациентам морфологическая диагностика осуществлена с использованием только традиционной цитологии или на материале cell-блока, при этом в шести случаях морфологическое исследование признано неинформативным (33,3%); у двоих пациентов информативность была недостаточной: скудный материал не позволил трактовать патологию как опухолевую (16,7%). 39-ти пациентам проведено комплексное морфологическое исследование, при этом у двоих материал оценен как неинформативный (5,11%).

68% пунктированных образований поджелудочной железы были солидными, при морфологическом исследовании в этой группе преобладали протоковые аденокарциномы, значительно реже встречались ацинарная и нейроэндокринная карциномы.

Хронический панкреатит был морфологически подтвержден в 8% случаев исследования поджелудочной железы. Кистозные образования составили 24%, в этой группе преоб-



■ pancreas
■ ЖВП
■ ЛУ
■ 12 п.к.
■ hepar

Рисунок 1. ЭУС-ТАБ образований гепатопанкреатобилиарной зоны (количество пункций). Примечание: pancreas — образования поджелудочной железы; ЖВП — желчевыводящие протоки; ЛУ — лимфатические узлы; 12 п.к. — образования двенадцатиперстной кишки; hepar — образования печени.

ладали псевдокисты. Метастатическое поражение поджелудочной железы мы наблюдали в одном случае.

У пяти пациентов цитологические исследования сопоставлены с результатами послеоперационного гистологического исследования. У трех пациентов, оперированных по поводу протоковой аденокарциномы, диагнозы совпали.

У одного пациента с образованием в дистальном отделе холедоха, которое при цитологическом исследовании было отнесено к эпителиальной неоплазии с неопределенным потенциалом злокачественности, в операционном материале установлена высокодифференцированная протоковая аденокарцинома поджелудочной железы с поражением холедоха.

В подобных случаях целесообразно проводить ИГХ-исследование с антителами к CD 56 [3]. Реакция будет отрицательна в карциномах протокового типа и позитивна в неопухолевом эпителии протоков.

У одного пациента в материале ТАБ поджелудочной железы были установлены признаки хронического панкреатита при наличии аденокарциномы поджелудочной железы.

Выводы

1. Эндоскопическая тонкоигольная аспирационная биопсия образований гепатопанкреатобилиарной зоны под контролем эндоУЗИ позволяет получать достаточный материал для последующей комплексной морфологической диагностики.
2. Метод cell-блоков, как правило, позволяет решать диагностические задачи, которые стоят при исследовании трепанбиопсий и инцизионных биопсий.

Список литературы

1. Bellizzi A. M., Stelow E. B. Pancreatic cytopathology. A practical approach and Review. // Arch. Pathol. Lab. Med. — 2009 — Vol. 133. — p. 388-404.
2. Bosman F. T., Carneiro F., Hruban R. H., Theise N. D. WHO Classification of Tumors of the Digestive System. — Lyon. — 2010. — 417 p.
3. Dabbs D. Diagnostic immunohistochemistry. Elsevier, Philadelphia. — 2010.
4. Sidawy M., Ali S. Z. Fine Needle Aspiration Cytology. Elsevier, Philadelphia. — 2007. — 352 p.



РОССИЙСКАЯ АССОЦИАЦИЯ МЕДИЦИНСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

План мероприятий Российской ассоциации медицинской лабораторной диагностики на 2014 год

21 ноября 2014 года. «Диагностическая значимость лабораторных тестов практической медицине»

Место проведения:

Организатор: Пермское краевое отделение РАМЛД

22–23 октября 2014 года. Научно-практическая конференция «Новые горизонты в лабораторной медицине — инновационные технологии лабораторного анализа и их вклад в клиническую практику» и специализированная выставка «Лабмедицина-2014»

Место проведения: г. Волгоград, Дворец культуры профсоюзов (пр. Ленина, д. 4). **Организатор:** РАМЛД

01 октября 2014 года. «Практические вопросы преаналитического этапа» (симпозиум состоится в рамках XVIII Форума «Национальные дни лабораторной медицины России- 2014»)

Место проведения: симпозиум состоится в рамках XVIII Форума «Национальные дни лабораторной медицины России- 2014»

Организатор: BD Vacutainer

01–03 октября 2014 года. XVIII Форум «Национальные дни лабораторной медицины России — 2014»

Место проведения: г. Москва, СК «Олимпийский» (Олимпийский проспект, 16). **Организатор:** Министерство Здравоохранения РФ, Общероссийская общественная организация «Научно-практическое Общество специалистов лабораторной медицины», Российская Ассоциация медицинской лабораторной диагностики.

Российская ассоциация медицинской лабораторной диагностики:

119526, Россия, Москва, а/я 117,

тел./факс: +7 495 433-24-04, e-mail: ramld@ramld.ru.

Поиск новых маркеров иммунологической эффективности высокоактивной антиретровирусной терапии при ВИЧ-инфекции

И. В. Решетников, аспирант кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики

В. Э. Цейликман, д.б.н., проф., зав. кафедрой биологической химии

ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» (ЮУГМУ) Минздрава России, г. Челябинск

The search of new markers of immunological efficiency of highly active antiretroviral therapy at HIV-infection

I. V. Reshetnikov, V. E. Tseilikman

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia

Резюме

Использование высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ) повышает качество и продолжительность жизни ВИЧ-инфицированных людей. Терапия направлена на снижение вирусной репликации и восстановлению популяции лимфоцитов CD4+. В настоящей работе мы изучали влияние ВААРТ на расширенный субпопуляционный состав лейкоцитов с использованием проточной цитометрии и системы CytoDiff. Было установлено, что эффект антиретровирусной терапии не ограничивается снижением вирусной нагрузки и увеличением числа Т-хелперов. Пациенты с ВИЧ-инфекцией, регулярно получающие ВААРТ, характеризуются снижением уровня «воспалительных» моноцитов CD16+, незрелых гранулоцитов, ранних В-клеток при одновременном повышении числа зрелых В-лимфоцитов.

Ключевые слова: ВИЧ, ВААРТ, CytoDiff.

Summary

Use of highly active antiretroviral therapy increases quality and life expectancy of the HIV-infected people. Therapy is aimed to decrease of viral replication and to restoration of lymphocytes CD4+ population. In this work we studied the influence of HAART on expanded subpopulation structure of leukocytes with use of a flowing cytometry and CytoDiff system. It was established that the effect of antiretroviral therapy isn't limited to decrease of viral load and increase of number of T-helpers. Patients with HIV, regularly receiving HAART, are characterized by decrease in level of «inflammatory» monocytes CD16+, immature granulocytes, immature B-cells at simultaneous increase of number of mature B-cells.

Keywords: HIV, HAART, CytoDiff.

Введение

В настоящее время пандемия ВИЧ-инфекции имеет планетарный масштаб. В 2011 году в мире было зарегистрированы примерно 2,5 миллиона новых случаев инфицирования ВИЧ, а число людей, живущих с ВИЧ, составило 34,2 миллиона человек. В 2011 году примерно 1,7 миллиона человек умерли от заболеваний, обусловленных СПИДом (UNAIDS, 2011).

Внедрение высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ) является поворотным моментом в борьбе со СПИДом является внедрение высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ). Антиретровирусные препараты направлены на уязвимые этапы жизненного цикла ВИЧ и тем самым препятствуют его размножению. Подавление репликации ВИЧ останавливает гибель лимфоцитов CD4+, что приводит к восстанов-

лению их популяции и функциональной активности. С помощью ВААРТ можно увеличить продолжительность жизни пациента [1, 3].

Для оценки эффективности ВААРТ врачи-клиницисты используют три критерия:

- вирусологический (снижение вирусной нагрузки);
- иммунологический (восстановление функций иммунной системы);
- клинический (исчезновение клинических симптомов вторичных заболеваний).

Под иммунологическим критерием подразумевается главным образом увеличение числа Т-хелперов, так как лимфоциты CD4+ являются основной мишенью вируса иммунодефицита [2]. Однако иммунопатогенез ВИЧ не ограничивается Т-хелперами, и все клинические проявления при ВИЧ-инфекции невозможно объяс-

нить лишь дефицитом данной популяции клеток. Целью настоящей работы явилось изучение влияния ВААРТ на расширенный субпопуляционный состав лейкоцитов периферической крови ВИЧ-инфицированных лиц.

Материалы

В исследовании приняли участие 84 ВИЧ-инфицированных лица с IVA стадией заболевания по Покровскому, находящихся на диспансерном наблюдении в инфекционном отделении для лечения больных ВИЧ / СПИДом клиники Южно-Уральского государственного медицинского университета. Нами был проведен сравнительный анализ иммунного статуса двух групп ВИЧ-инфицированных пациентов: никогда не получавших ВААРТ (I группа) и регулярно

принимающих антиретровирусные препараты (II группа). В I группу вошли 22 ВИЧ-инфицированных пациента, чей средний возраст составил $32,0 \pm 5,0$ года, во II группу — 62 ВИЧ-инфицированных пациента со средним возрастом $36,9 \pm 8,8$ лет.

Методы

Для изучения субпопуляционного состава лейкоцитов нами была использована система расширенного дифференциального подсчета лейкоцитов методом проточной цитометрии с использованием панели CytoDiff производства компании Beckman Coulter. Система CytoDiff включает в себя панель моноклональных антител, реагенты для контроля качества и соответствующее программное обеспечение. Анализ проводился на проточном цитометре FC500 Cytomics производства Beckman Coulter.

Реагенты CytoDiff представляют собой пятицветную комбинацию из шести моноклональных антител, которая позволяет с помощью проточной цитометрии определить девять гематологических параметров в образце цельной крови. Комбинация антител CD36-FITC/CD2-PE/CD294 (CRTH2)-PE/CD19-ECD/CD16-PC5/CD45-PC7.

При использовании значения общего количества лейкоцитов (WBC), полученного с помощью автоматического гематологического анализатора, анализ образца, окрашенного реагентом CytoDiff, позволяет получить как значения относительного содержания тех или иных популяций клеток, так и абсолютные значения.

В образцах цельной крови система определяет следующие гематологические параметры (табл. 1).

Для определения числа Т-хелперов была использована дополнительная панель моноклональных антител CD45-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5. Определение вирусной нагрузки ВИЧ проводилось методом ПЦР на автоматизированной системе для анализа нуклеиновых кислот Abbott m2000rt. Результаты представлены в табл. 2.

Таблица 1
Популяции лейкоцитов и соответствующие им фенотипы, доступные для определения с помощью системы CytoDiff

Популяция клеток	Условное обозначение (фенотип)
В-лимфоциты	Ly B (SSClow, CD45high, CD16-, CD2 и CRTH2-, CD19+)
Т- и НК-клетки CD16-	T- (SSClow, CD45high, CD16-, CD2+ или CRTH2+)
Т- и НК-клетки CD16+	T+ (SSClow, CD45high, CD16+, CD2+ или CRTH2+)
Т- и НК-клетки	Lymph T&NK
Общее количество лимфоцитов	Lymph Total
Моноциты CD16-	M- (SSCint, CD16-, CD2- и CRTH2-, CD19-, CD36+)
Моноциты CD16+	M+ (SSCint, CD16+, CD2- и CRTH2-, CD19-, CD36+)
Общее количество моноцитов	Mono Total
Незрелые гранулоциты	Imm Gr (SSChigh, CD45int, CD16-, CD2- и CRTH2-)
Эозинофилы	Eo Total (SSChigh, CD45high, CD16-, CD2+ или CRTH2+)
Зрелые нейтрофилы	Neutro Mature (SSChigh, CD45high, CD16+)
Общее количество нейтрофилов	Neutro Total
Предшественники В-лимфоцитов	Xb (SSClow, CD45low, CD16-, CD2 и CRTH2-, CD19+)
Предшественники Т-лимфоцитов	Xt (SSClow, CD45low, CD16-, CD2+ или CRTH2+)
Предшественники моноцитов	Xm
Базофилы	Baso Total (SSCint, CD45int, CD16-, CD2+ или CRTH2+)

Результаты и обсуждение

Прежде всего было выявлено снижение количества копий РНК вируса в крови пациентов, регулярно получающих терапию ($23\ 061$ копий/мл против $445\ 060$ копий/мл). Снижение вирусной нагрузки является первичной целью ВААРТ (вирусологический ответ на терапию). Во II группе было выявлено снижение относительного количества Т-лимфоцитов, при этом повышено относительное и абсолютное число Т-хелперов. Увеличение уровня Т-хелперов (иммунологический ответ на терапию) происходит после снижения вирусной нагрузки. Считается, что начальное повышение числа лимфоцитов CD4+ в периферической крови на фоне ВААРТ происходит за счет выхода Т-хелперов из лимфатической системы в кровь. Вторая стадия характеризуется притоком клеток памяти CD4+ со сниженной способностью к активации и улучшенным иммунным ответом при повторном контакте с антигеном. На третьей стадии, не менее чем через 12 недель ВААРТ, происходит повышение уровня наивных клеток. Через шесть месяцев антиретровирусной терапии восстанавливаются все разновидности лимфоцитов CD4+ [2].

В группе ВИЧ-инфицированных лиц, получающих ВААРТ, зафиксировано повышение относительного и абсолютного числа В-клеток. Интересно отметить, что относительное и абсолютное количество незрелых В-лимфоцитов было снижено.

Во II группе зафиксировано снижение относительного количества незрелых гранулоцитов. Вероятно, это связано с подавлением вторичных заболеваний у пациентов, у которых на фоне антиретровирусной терапии снизилась вирусная нагрузка, повысился уровень Т-хелперов и, следовательно, улучшился иммунный статус.

Наиболее интересным наблюдением оказалось уменьшение относительного и абсолютного количества «воспалительных» моноцитов CD16+ во II группе. Известно, что при ВИЧ-инфекции происходит увеличение количества моноцитов CD16+ [4]. Роль «воспалительных» моноцитов в патогенезе ВИЧ-инфекции в настоящее время активно изучается. Предполагается их участие в распространении вируса по тканям организма и поддержании вирусной персистенции [5, 8]. Некоторые ученые полагают, что моноциты CD16+ являются более доступными для репликации ВИЧ,

Таблица 2
Сравнительный анализ показателей иммунной системы и вирусной нагрузки у ВИЧ-инфицированных лиц с IVA стадией заболевания с учетом проводимой ВААРТ, (M ± m)

Показатели	Группа 1 (ВААРТ –)	Группа 2 (ВААРТ +)
	n = 22	n = 62
В-лимфоциты,%	3,00±0,39	3,90±0,31
В-лимфоциты, клеток/мкл	148,33±25,34	192,50±17,45
Т-лимфоциты,%	82,06±2,14	77,25±1,40
Т-хелперы,%	15,91±1,67	21,97±1,19
Т-хелперы, клеток/мкл	305,61±54,48	391,73±24,85
Моноциты CD16+,%	1,44±0,26	0,93±0,11
Моноциты CD16+, клеток/мкл	66,16±9,98	43,37±4,58
Незрелые гранулоциты,%	0,92±0,37	0,31±0,06
Предшественники В-лимфоцитов,%	0,21±0,08	0,07±0,01
Предшественники В-лимфоцитов, клеток/мкл	7,42±1,91	3,47±0,33
Вирусная нагрузка, копии/мл	445060±248870	2306±14399

Примечание: указаны только статистически значимые различия, p < 0,05.

и их экспансия поддерживается неизвестными пока факторами вируса [7]. На основе своих опытов с обезьянами Kim с коллегами делает выводы, что репликация вируса и, как следствие, возрастание вирусной нагрузки — движущие силы для экспансии CD16+ моноцитов. Важно отметить сообщение Fisher-Smith и др. о том, что повышение количества моноцитов CD16+ при ВИЧ-инфекции происходит до того, как будет снижено число Т-хелперов [6]. По данным Williams и др., увеличение количества «воспалительных» моноцитов наблюдается уже на 10–15 день после инфицирования (опыты с вирусом иммунодефицита обезьян на макаках). Таким образом, моноциты CD16+ оказываются вовлечены в патогенез ВИЧ-инфекции раньше Т-хелперов, являясь ранним биомаркером инфекции [8].

Точные механизмы влияния ВААРТ на субпопуляцию «воспалительных» моноцитов пока неизвестны. Вероятно, снижение числа «воспалительных» моноцитов связано с подавлением репликации вируса и уменьшением вирусной нагрузки.

На основании вышеперечисленных данных уместно (можно) сделать следующее предположение. При проведении эффективной антиретровирусной терапии сниже-

ние числа моноцитов CD16+ будет предшествовать по времени увеличению уровня лимфоцитов CD4+. Эта гипотеза требует доказательства в отдельном эксперименте, и если она подтвердится, в руках клиницистов появится более ранний маркер иммунологической эффективности ВААРТ.

Заключение

ВААРТ направлена на максимальное подавление размножения ВИЧ, что выражается в снижении вирусной нагрузки в крови. Подавление репликации ВИЧ останавливает гибель лимфоцитов CD4+, что приводит к восстановлению их популяции и функциональной активности. Восстановление иммунитета ведет к предотвращению развития вторичных заболеваний, а если они уже развились, к их исчезновению (клинический ответ на терапию). Кроме того, эффективное подавление размножения ВИЧ снижает вероятность развития мутаций, приводящих к возникновению резистентных штаммов вируса.

Применение ВААРТ в первую очередь направлено на снижение количества вируса в крови, что далее должно привести к повышению уровня Т-хелперов. Данные изменения зафиксированы в группе пациентов, регулярно получающих ВА-

АРТ: снижение вирусной нагрузки, увеличение уровня клеток CD4+. Однако благодаря системе CytoDiff выявлены и другие позитивные эффекты ВААРТ: увеличение количества зрелых В-лимфоцитов при одновременном снижении числа ранних В-клеток в периферической крови, снижение количества «воспалительных» моноцитов CD16+ и незрелых гранулоцитов.

Исследование выполнено при поддержке РФФИ, грант 14–04 01381.

Список литературы

1. Аронин, С.И. ВИЧ-инфекция: вопросы терапии. / С.И. Аронин. // Казанский медицинский журнал. — 2005. — Т. 86, № 6. — 443–450.
2. Бартлетт, Дж. Клинические аспекты ВИЧ-инфекции. // Дж. Бартлетт, Дж. Галлант. — Москва, 2010. — 496 с.
3. Галегов, Г.А. Высокоэффективная химио-профилактика перинатальной передачи ВИЧ-инфекции у ВИЧ-инфицированных беременных женщин. // Г.А. Галегов. // Антибиотики и химиотерапия. — 2009. — Т. 54, № 3–4. — С. 56–80.
4. Ancuta, P. CD16+ Monocyte-Derived Macrophages Activate Resting T-Cells for HIV Infection by Producing CCR3 and CCR4 Ligands / P. Ancuta, P. Aufissier, A. Wurcel, T. Zaman, D. Stone, D. Gabuzda. // Journal of Immunology. — 2006. — Vol. 176. — P. 5760–5771.
5. Ellery, P. J. The CD16+ Monocyte Subset Is More Permissive to Infection and Preferentially Harbors HIV-1 In Vivo / P. J. Ellery, E. Tippett, Y. — L. Chiu, G. Paukovic, P. U. Cameron, A. Solomon et al. // Journal of Immunology. — 2007. — Vol. 178, № 10. — P. 6581–6589.
6. Fischer-Smith, T. CD163 / CD16 coexpression by circulating monocytes/macrophages in HIV: potential biomarkers for HIV infection and AIDS progression. // T. Fischer-Smith, E.M. Tedaldi, J. Rappaport. // AIDS Res. Hum. Retroviruses. — 2008. — Vol. 24. — P. 417–421.
7. Kim, WK. Monocyte heterogeneity underlying phenotypic changes in monocytes according to SIV disease stage. // W. K. Kim, Y. Sun, H. Do et al. // Journal of Leukocyte Biology. — 2010. — Vol. 87. — P. 557–567.
8. Williams, D. W. Mechanisms of HIV Entry into the CNS: Increased Sensitivity of HIV Infected CD14+CD16+ Monocytes to CCL2 and Key Roles of CCR2, JAM-A and ALCAM in Diapedesis. // D. W. Williams, T.M. Calderon, L. Lopez et al. // PLoS One. — 2013. — Vol. 8 (7). — P. 1–15.



Опыт внедрения системы менеджмента качества в медицинской лаборатории многопрофильной клиники на примере использования ЛИС

И. Ю. Трегубов, врач клинической лабораторной диагностики, специалист по качеству отдела лабораторной диагностики¹

Н. Ю. Голикова, рук. проектов по лабораторным информационным системам²

¹ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А. М. Никифорова» (ВЦЭРМ) МЧС России, г. Санкт-Петербург

²ЗАО «СП.АРМ», г. Санкт-Петербург

Experience in implementation of quality management system in multi-field hospital medical laboratory using Laboratory Information System

I. Yu. Tregubov, N. Yu. Golikova



И. Ю. Трегубов



Н. Ю. Голикова

С каждым годом растет число лабораторных исследований, совершенствуется автоматизация технологического процесса их выполнения. Удельный вес лабораторных исследований в общей структуре диагностических процедур составляет 75–90%. Таким образом, увеличивается важность своевременности, объективности и точности данных представляемых лабораторией данных результатов исследований, то есть качества лабораторных исследований. Внедрение в лабораторную практику стандартов ГОСТ Р ИСО 9001 серии все больше ужесточает требования к лаборатории по вопросам построения системы управления качеством.

В отделе лабораторной диагностики Всероссийского центра экстренной и радиационной медицины им. А. М. Никифорова МЧС России (ВЦЭРМ) принята концепция непрерывного повышения качества, предусматривающая ориентацию прежде всего на пациента и заинтересованное творческое участие всего коллектива в работе. Для выполнения данной концепции и развития лабораторной службы ВЦЭРМ при участии IT-службы, администрации, специалистов клинической лабораторной диагностики внедрена и развивается лабораторная информационная система (ЛИС) qMS, которая, в свою очередь, является частью комплексной медицинской информационной системы qMS.

Именно внедрение ЛИС — единственный конструктивный путь и один из ключевых инструментов, позволяющих обеспечить достижение поставленных целей [1].

Использование ЛИС qMS позволило автоматизировать целый ряд технологических операций, в том числе: формирование заявки на исследование, маркировку биоматериала, регистрацию поступившего биоматериала в лабораторию, формирование заданий на автоматических анализаторах, формирование протоколов для ручных методов исследований, что позволило уменьшить риски ошибок на данных этапах за счет снижения участия персонала в этих операциях. За 2012 год в лабораториях ВЦЭРМ было выполнено 385 319 исследований, а в 2013 году количество исследований — 567 527. Такой существенный рост (~47%) был обусловлен прежде всего выходом на запланированную мощность многопрофильного стационара ВЦЭРМ клиники № 2. Эта ситуация не могла пройти мимо внимания специалистов клинической лабораторной диагностики. Ведь ни для кого не секрет, что основной процент ошибок в лаборатории приходится на преаналитический этап лабораторных исследований. По разным литературным источникам, доля ошибок преаналитического этапа в общем числе лабораторных оши-

бок составляет не менее 50% [2].

Для повышения качества преаналитического этапа в ЛИС qMS реализовано автоматическое формирование направлений на лабораторные исследования с указанием исследуемого образца и необходимого контейнера, группировка контейнеров по цветовой маркировке с учетом необходимого для выполнения исследований объема пробы, а также указание необходимых процедур для правильного взятия биологического материала. Такие действия привели к значительному снижению ошибок, связанных с нарушением правил подготовки пациента и биопробы. Фиксация времени взятия и времени доставки биоматериала в лабораторию позволило контролировать и оптимизировать этап транспортировки биопробы в рамках стационарного и поликлинического звеньев. Использование маркеров для некачественных образцов биоматериала и встроенного блока аналитики позволило выявить критические точки и добиться снижения ошибок на данных этапах. Так, в 2012 году процент ошибок от общего числа выполненных исследований составил 0,25% (в абсолютных — 984 исследования), а за 2013 год процент ошибок составил 0,1% (в абсолютных — 584 исследования).

Внедрение модуля внутрिलाбораторного контроля качества позволило, с одной стороны, автоматизировать выполнение процедуры постановки

контрольных образцов, с другой стороны, упорядочить весь документооборот и сделать процесс проведения внутрилабораторного контроля качества более понятным и прозрачным для сотрудников лабораторий.

Использование ЛИС позволяет врачу клинической лабораторной диагностики ВЦЭРМ воспользоваться всеми данными пациента при валидации полученного результата, будь то результаты сопутствующих исследований или результаты, полученные ранее, диагноз пациента,

медицинские записи или дополнительная демографическая информация о пациенте. Использование встроенной в ЛИС qMS системы хранения биологических образцов дало возможность оперативно найти требуемый образец и провести его дополнительную оценку.

Внедрение ЛИС qMS позволило контролировать любой из вышеперечисленных этапов лабораторного исследования и оперативно выявлять проблемные точки, ставить задачи по их решению и тем

самым добиваться непрерывного повышения качества лабораторных исследований, выполняемых в лабораториях ВЦЭРМ.

Список литературы

1. А. А. Кишкун, А. Л. Гузовской. Лабораторные информационные системы и экономические аспекты деятельности лаборатории. М.: Лабора. 2007. 255 с.
2. Фадин Д. В. Роль преаналитического этапа в стандартизации лабораторных исследований. // Лабораторная медицина. 2003. № 6.



О повышении качества коагуляционных тестов

М. В. Кутепов, к.т.н., ООО ЭМКО

About improving the quality of coagulation tests

M. V. Kutepov

Лабораторная диагностика состояния системы гемостаза — важный фактор эффективности лечения многих заболеваний и снижения смертности населения. Исследованию гемостаза в последнее время уделяется большое внимание не только за рубежом, но и в России. Это связано с активным применением новых лекарственных препаратов (антикоагулянтов, антиагрегантов и тромболитиков) и новых схем лечения больных. Узкий терапевтический коридор и избирательная индивидуальная чувствительность к таким препаратам требуют точного индивидуального подбора дозировки и продолжительности лечения. За последние три года в РФ наблюдается среднегодовая динамика роста количества коагулологических тестов в год на 9,6% (в мире на 15%). В то же время рутинная лабораторная практика в изучении системы гемостаза в нашей стране развивается недостаточно динамично.

Наиболее часто выполняемые в клинической практике РФ исследования системы гемостаза это рутинные (скрининговые) коагуляционные тесты: ПВ (т.н. «анализ на протромбин»), АЧТВ, ТВ и определение концентрации фибриногена (методом Клаусса). Желательно эту четверку рутинных тестов дополнить тестом по определению активности антитробина (АТ), чтобы получить общую картину и противосвертывающей системы крови. Каждый из этих тестов обладает своими особенностями, наделяющими его индивидуальными способностями к выявлению различных состояний системы гемостаза. После выполнения рутинных тестов для уточнения диагноза может понадобиться проведение уточняющих тестов (определение отдельных факторов или отдельных цепочек реакций из всего каскада свертывания), большинство из которых так же базируется на рутинных тестах.



Коагулометр АПГ4-03-ПХ.

Так, определение активности факторов II, V, VII, X — это тест ПВ, а определение активности факторов VIII, IX, XI, XII и тест ВА — тест АЧТВ.

Несмотря на простоту выполнения этих тестов, при выполнении коагулологического анализа совершаются разнообразные ошибки как на преаналитическом, так и на аналитическом этапе исследования, причем некоторые из них носят массовый и систематический характер. В ряде лабораторий по данным ФСВОК до сих пор анализы выполняются вручную.

Ошибки преаналитического этапа, к сожалению, невозможно исправить. Для исключения этих ошибок необходимо строго соблюдать современные требования выполнения анализа, осуществлять контроль над их исполнением (проводить внутрилабораторный контроль качества). В частности, эти требования содержатся и в российских стандартах: ГОСТ Р ИСО 15189, ГОСТ Р ИСО 6710, и в иностранных источниках: стандарт Института Клинических Лабораторных Стандартов (CLSI) H21-A5 2008, рекомендации Всемирной Организации Здравоохранения (WHO) BS 2011.2165 и DIL LAB 99.1 rev.2.

Кроме того, необходимо обеспечивать доставку проб в лабораторию и проведение анализа в оптимальные сроки — 45 минут до центрифугирования или 4 часа до анализа. Транспортировка проб на значительные расстояния нежелательна, т. к. на достоверность результатов анализа могут повлиять тряска, перегрев или охлаждение. Для уменьшения влияния ошибок, связанных с транспортировкой, необходимо не только обучение персонала ЛПУ, но и организационные меры, в частности — децентрализация коагулологических исследований, проведение коагулологического анализа непосредственно в небольших лабораториях первичного звена (в поликлиниках) и на экономичных приборах.

Большинство аналитических ошибок (совершаемых при выполнении анализа) может быть достаточно легко выявлено и исключено ведением внутрилабораторного контроля качества (ежедневная проверка тест системы прибор-реагент с построением контрольных карт). К сожалению, большинство полуавтоматических коагулометров не имеют встроенных программ для ведения полноценного внутрилабораторного контроля качества с построением контрольных карт. Контроль качества в основном в полуавтоматических приборах осуществляется проведением дублетного измерения каждой пробы (рекомендовано ВОЗ), что позволяет исключить грубые случайные ошибки. Дополнительно коагулометры могут осуществлять контроль качества калибровочного графика (такая функция реализована, например, в анализаторах АПГ2-02, АПГ2-02-П, АПГ4-02-П, производства ООО ЭМКО).

В настоящее время Группой компаний ЭМКО (ООО ЭМКО и ООО МЛТ) подготовлена к производству и регистрируется новая серия полуавтоматических коагулометров (АПГ2-03-П, АПГ2-03-Пх, АПГ4-03-П, АПГ4-03-Пх) с большим сенсорным экраном, дружественным интерфейсом, расширенными подсказками и, что самое важное, со встроенным контролем качества в соответствии с требованиями приказов МЗ РФ № 45, № 220 и отраслевого стандарта ОС 91500.13.0001-2003. Коагулометры также имеют возможность подключения ручного двумерного считывателя штрих-кода, упрощающего процесс ввода значений МИЧ и калибровок, номеров партий и срока годности реагентов (реализовано в прекалиброванных реагентах серии МЛТ, производства ООО ЭМКО). Применение такого оборудования в ЛПУ значительно уменьшит количество ошибок при выполнении рутинных тестов.

Для дальнейшего снижения количества ошибок при выполнении коагуляционных тестов производителями медицинских изделий (МИ) могут быть приняты дополнительные меры:

1. Производимые МИ должны иметь дружественный интерфейс, систему подсказок, полноценный контроль качества.
2. Необходима автоматизация коагулологического анализа с целью полного исключения ошибок дозирования.

В настоящее время Группой компаний ЭМКО разработан экономичный автоматический коагулометр АПГ2-01-АВТО для рутинных тестов. Ключевыми



Автоматический коагулометр АПГ2-01-АВТО.

критериями наших разработок являются надежность, удобство эксплуатации и минимальная стоимость. Для мелких и средних лабораторий, наиболее нуждающихся в оснащении коагулометрами, стоимость коагулометров и расходных материалов для них зачастую является главным критерием при их выборе. Автоматический коагулометр АПГ2-01-АВТО благодаря своей привлекательной цене, соответствующей финансовым возможностям ЛПУ, будет способен заменить значительную часть устаревших полуавтоматических приборов в первичном звене здравоохранения (прежде всего четырехканальных коагулометров) и при этом снизить количество ошибок (исключить влияние человеческого фактора при дозировании) при проведении коагулологических исследований в ЛПУ России.

Полуавтоматические коагулометры АПГ2-03-П, АПГ2-03-Пх, АПГ4-03-П, АПГ4-03-Пх подготовлены к клиническим испытаниям, автоматический коагулометр АПГ2-01-АВТО находится в стадии подготовки к регистрации. О начале продаж этих коагулометров будет объявлено дополнительно на официальном сайте компании www.coagulometer.ru.

Главное преимущество коагулометров ЭМКО — одновременное использование механического и оптического методов измерения времени образования сгустка при выполнении коагуляционных тестов, что дает лаборатории практически неограниченные возможности для адаптации реагентов любых изготовителей. Выполнение клоттинговых тестов механическим методом позволяет корректно определять время свертывания при анализе гемолизированных, липемичных и иктеричных проб.

К сожалению, мер принимаемых только одними производителями МИ недостаточно, повторюсь, что необходимо строгое соблюдение сотрудниками лабораторий современных требований коагулологического анализа и обязательное ведение внутрилабораторного контроля качества.



КОАГУЛОМЕТРЫ ЭМКО

COAGULOMETER.RU



АПГ2-02 - два канала;
АПГ2-02П - два канала, принтер;
АПГ4-02П - четыре канала, принтер

МЛТ РЕАГЕНТЫ ДЛЯ СКРИНИНГА



**МЛТ-Тромбопластин, МЛТ-АЧТВ, МЛТ-Фибриноген, МЛТ-Тромбин
НЕ ТРЕБУЮТ КАЛИБРОВОК НА КОАГУЛОМЕТРАХ ЭМКО**



КРАСКИ ДЛЯ ПАП-ТЕСТА



STAINER.RU

АВТОМАТЫ ОКРАСКИ ЭМКОСТЕЙНЕР

АФОМК-6, АФОМК8-Г-01, АФОМК8-В-01, АФОМК-13-ПАП

РОССИЙСКАЯ НЕДЕЛЯ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ

8–12 декабря 2014



ЗА ЗДОРОВУЮ ЖИЗНЬ

V Международный форум по профилактике неинфекционных заболеваний и формированию здорового образа жизни



ЗДОРОВЫЙ ОБРАЗ ЖИЗНИ

8-я международная выставка «Средства реабилитации и профилактики, эстетическая медицина, оздоровительные технологии и товары для здорового образа жизни»



ЗДРАВООХРАНЕНИЕ

24-я международная выставка «Здравоохранение, медицинская техника и лекарственные препараты»



123100, Россия, Москва,
Краснопресненская наб., 14
Единый справочно-
информационный центр:
8 (499) 795-37-99
E-mail: centr@expocentr.ru
www.expocentr.ru,
экспоцентр.рф

Организаторы:

- Государственная Дума ФС РФ
- Министерство здравоохранения РФ
- ЦВК «Экспоцентр»

При поддержке:

- Совета Федерации ФС РФ
- Министерства промышленности и торговли РФ
- Правительства Москвы
- Российской академии медицинских наук
- Торгово-промышленной палаты РФ
- Представительства Всемирной организации здравоохранения в РФ

реклама

12+

NEW!

Заказ электронной версии журнала: всего 50 рублей за номер!
 Присылайте, пожалуйста, запрос на адрес: medalfavit@mail.ru.

БЛАНК-ЗАКАЗ на подписку на журнал 2014 год



Название организации (или Ф.И.О.) _____

Адрес (с почтовым индексом) _____

Телефон: _____ E-mail: _____ Контактное лицо: _____

- «Медицинский алфавит. Стоматология» — 4 выпуска в год (1 200 руб.)
- «Медицинский алфавит. Современная лаборатория» — 4 выпуска в год (1 000 руб. в год)
- «Медицинский алфавит. Эпидемиология и гигиена» — 4 выпуска в год (1 000 руб. в год)
- «Медицинский алфавит. Больница — все для ЛПУ» — 4 выпуска в год (1 000 руб. в год)
- «Медицинский алфавит. Неотложная медицина» — 4 выпуска в год (1 000 руб. в год)
- «Медицинский алфавит. Диагностическая радиология и онкотерапия» — 4 выпуска в год (1 000 руб. в год)
- «Медицинский алфавит. Фармакотерапия» — 2 выпуска в год (500 руб в год)
- «Медицинский алфавит. Кардиология» — 4 выпуска в год (1 000 руб в год)
- «Медицинский алфавит. Гастроэнтерология» — 2 выпуска в год (500 руб в год)

Наш индекс в каталоге
«РОСПЕЧАТЬ» 36228

НДС — 0%

Извещение	<p>ООО «Альфмед» (наименование получателя платежа) 7716213348 (ИНН получателя платежа) Рс № 40702810738090108773 (номер счета получателя платежа) в Московский Банк Сбербанка России (наименование банка и банковские реквизиты) ОАО «СБЕРБАНК РОССИИ» г. МОСКВА К/с 30101810400000000225 БИК 044525225</p> <p>Годовая подписка на журнал «Медицинский алфавит. _____» на 2014 год (наименование платежа)</p> <p>Дата _____ Сумма платежа _____ Плательщик (подпись) _____ Адрес доставки: _____</p>
Кассир	
Квитанция	<p>ООО «Альфмед» (наименование получателя платежа) 7716213348 (ИНН получателя платежа) Рс № 40702810738090108773 (номер счета получателя платежа) в Московский Банк Сбербанка России (наименование банка и банковские реквизиты) ОАО «СБЕРБАНК РОССИИ» г. МОСКВА К/с 30101810400000000225 БИК 044525225</p> <p>Годовая подписка на журнал «Медицинский алфавит. _____» на 2014 год (наименование платежа)</p> <p>Дата _____ Сумма платежа _____ Плательщик (подпись) _____ Адрес доставки: _____</p>
Кассир	

Как подписаться

1. Заполнить прилагаемый бланк-заказ и квитанцию об оплате. 2. Оплатить квитанцию.
3. Отправить бланк-заказ и квитанцию (или их копии) по почте по адресу: 129344, Москва, ул. Верхоянская, д.18 к. 2; или по факсу: (495) 616-48-00, 221-76-48, или по e-mail: medalfavit@mail.ru



MC-600

АНАЛИЗАТОР ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЙ



НОВИНКА
на Российском рынке!

- **19 параметров:** WBC, Lymph#, Mid#, Gran#, Lymph%, Mid%, Gran%, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, RDW-CV, RDW-SD, PLT, MPV, PDW, PCT и гистограммы для лейкоцитов, эритроцитов, тромбоцитов
- **Производительность:** Более 60 проб в час
- **Память:** Более чем 35000 образцов с гистограммами
- **Калибровка:** Ручная и автоматическая
- **Границы норм:** Общая, Мужчина, Женщина, Ребёнок, Новорожденный
- **Дисплей:** Большой цветной жидкокристаллический экран с разрешением 600 x800 с отображением всех результатов и трёх гистограмм
- **Пакет самодиагностики:** автоматические тесты электроники, механических узлов, автоматическая калибровка, хранение и печать информации об ошибках

RE MAX

ООО «МЕДДЕВ-Р»
8 (985) 761-29-70
sd@meddev-r.com
www.meddev-r.com



INNOVASYSTEM

Хорошие новости.

Хорошие новости.

Хорошие новости.

Хорошие_новости.

Хорошие новости.

ЛИМС «INNOVASYSTEM»

Всегда on-line :)

innovasystem.pro

(495) 984-96-74