КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЙ
# КОНСИЛИУМ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

№ 3 (28) июнь 2009

Главный редактор:
**Эмануэль В. Л.**, д. м. н., проф.

Заместители главного редактора:
**Зыбина Н. Н.**, д. б. н., проф.
**Сухоруков В. С.**, д. м. н., проф.

Директор редакции:
**Чередниченко Д. В.,** к. м. н.

Зав. редакцией:
**Эмануэль Ю. В.**, к. м. н.

Редактор перевода:
**Филиппова Н. А.**, к. м. н.

Адрес редакции:
**197022, Санкт-Петербург,**
**ул. Льва Толстого, д. 6/8**

Телефон редакции:
**(812) 233 97 26**

Эл. почта:
**ejvcons@mail.ru**

Журнал зарегистрирован в Северо-Западном окружном межрегиональном территориальном управлении Министерства РФ по делам печати, телерадиовещания и средств массовых коммуникаций

Свидетельство о регистрации:
ПИ № 2-6476 от 21.03.2003

Учредитель:
**Отделение Ассоциации медицинской лабораторной диагностики,**
**СПб Государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова**
(197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6/8)

Оригинал-макет и верстка:
ООО «Издательско-полиграфическая компания "КОСТА"»,
тел. **(812) 445 10 02**

Отпечатано в типографии
ООО «ИПК БИОНТ»
199026, Санкт-Петербург,
Средний пр., д. 86

Тираж 1500 экз.
Заказ №

*Уважаемые коллеги!*

*Лабораторная медицина России активно выходит на международную арену XXI века благодаря взаимодействию общественных профессиональных организаций по клинической лабораторной диагностике.*

*В 2009 году Международная федерация клинической химии (IFCC) оказывает поддержку в организации Научно-практической конференции с международным участием «Оптимизация диалога клиницистов и лаборатории. Метрологические аспекты качества», проводимой 15–16 июня 2009 г. в Санкт-Петербурге. Данная конференция следует за одним из самых крупных симпозиумов IFCC «Евромедлаб 2009», который проводится в Инсбруке с 7 по 11 июня 2009 г. IFCC дает нам право использовать свой логотип на всех программных документах, объявлениях и печатной продукции, связанной с проведением данной конференции. Программа конференции официально размещена на сайте IFCC (www.ifcc.org).*

*В 2008 г. был подписан Меморандум «О российско-американском научном сотрудничестве» между отделением Ассоциации медицинской лабораторной диагностики по Санкт-Петербургу и Ленинградской области и Американской ассоциацией клинической химии (AACC). В этом году на конференции в Санкт-Петербурге выступают 3 спикера AACC (www.aacc.org), среди которых президент AACC. AACC также предоставила нам право использовать свой логотип при издании программы и печатной продукции.*

*На конференции по взаимодействию лабораторной службы с клиницистами (15–16 июня, Санкт-Петербург) мы объединяемся с метрологами под флагами IFCC и AACC в период празднования «года Д. И. Менделеева». Такой союз действенно направлен на практическое и научное развитие лабораторной медицины России!*

*С уважением,* *Лина Анатольевна Хоровская*

*Профессор кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, д. м. н.,*
*национальный представитель IFCC Российского научного общества клинической лабораторной диагностики,*
*член Группы Международного совета (IAG) AACC,*
*член редакционного совета журнала «Клинико-лабораторный консилиум»*

## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

**Афанасьев Борис Владимирович,**
зав. кафедрой гематологии, трансфузиологии и трансплантации СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, директор Института детской гематологии и трансплантации им. Р. М. Горбачевой, д. м. н., профессор

**Гуревич Виктор Савельевич,**
руководитель Центра атеросклероза и нарушений липидного обмена СПбГМА им. И. И. Мечникова, д. м. н., профессор

**Дюк Вячеслав Анатольевич,**
ведущий научный сотрудник Санкт-Петербургского института информатики и автоматизации РАН, д. т. н.

**Зыбина Наталия Николаевна,**
начальник НИО клинико-биохимических исследований Всероссийского центра экстренной и радиационной медицины МЧС, д. б. н., профессор (заместитель главного редактора)

**Карпищенко Анатолий Иванович,**
заведующий городским организационно-методическим и контрольным отделом по лабораторной диагностике и метрологии СПб ГУЗ МИАЦ Комитета по здравоохранению правительства СПб, д. м. н., профессор

**Петришев Николай Николаевич**,
профессор кафедры патофизиологии СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, з. д. н. РФ, академик МАНВШ, академик РАЕН, д. м. н., профессор

**Сухоруков Владимир Сергеевич,**
руководитель НИЛ общей патологии НИИ педиатрии и детской хирургии РАМН, главный специалист по лабораторной диагностике в педиатрии, д. м. н., профессор (заместитель главного редактора)

**Тец Виктор Вениаминович,**
зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, академик РАЕН, д. м. н., профессор

**Шляхто Евгений Владимирович,**
директор ФГУ «Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова», заведующий кафедрой факультетской терапии СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, главный кардиолог Санкт-Петербурга и Северо-Западного федерального округа, вице-президент Всероссийского научного общества кардиологов, президент Российской антигипертензивной лиги, председатель Санкт-Петербургского научного общества кардиологов им. Г. Ф. Ланга, член-корр. РАМН, з. д. н. РФ, д. м. н., профессор

**Эмануэль Владимир Леонидович,**
заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, д. м. н., профессор (главный редактор)

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

**Вавилова Татьяна Владимировна,**
профессор кафедры госпитальной терапии СПбГМА им. И. И. Мечникова, д. м. н.

**Каллнер Андерш,**
профессор кафедры клинической химии Каролинского госпиталя, Стокгольм, Швеция, член бюро Международного союза чистой и прикладной химии, д. м. н., профессор

**Козлов Антон Владимирович,**
зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики СПбМАПО, д. м. н., профессор

**Корячкин Виктор Анатольевич,**
зав. кафедрой анестезиологии, реаниматологии и интенсивной терапии СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, д. м. н., профессор

**Мазуров Вадим Иванович,**
зав. кафедрой терапии №1 им. Э. Э. Эйхвальда СПбМАПО, член-корр. РАМН, з. д. н. РФ, д. м. н., профессор

**Меньшиков Вадим Владимирович,**
руководитель научно-методического центра по лабораторной диагностике МЗ РФ, член-корр. РАЕН, з. д. н. РФ, д. м. н., профессор

**Новик Виктор Иванович,**
зав. лабораторией цитологии НИИ онкологии им. проф. М. Н. Петрова МЗ РФ, член Международной академии цитологии, д. м. н.

**Рыбакова Маргарита Григорьевна,**
зав. кафедрой патологической анатомии СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, д. м. н., профессор

**Сапрыгин Дмитрий Борисович,**
президент Российской ассоциации медицинской лабораторной диагностики, д. м. н., профессор

**Сельков Сергей Алексеевич,**
руководитель лаборатории иммунологии НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН, член-корр. РАЕН, д. м. н., профессор

**Смирнов Алексей Владимирович,**
зав. кафедрой пропедевтики внутренних болезней СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, директор НИИ нефрологии СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, вице-президент Всероссийского общества нефрологов, председатель Ассоциации нефрологов и врачей гемодиализа Северо-Запада России, д. м. н., профессор

**Соколовский Евгений Владиславович,**
заведующий кафедрой дерматовенерологии с клиникой СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, проректор по научной работе, д. м. н., профессор

**Стивен Хау Ян Вонг** (Steven How Yan Wong), Ph. D., DABCC (TC), FACB, председатель секции протеомики и молекулярной патологии Американской ассоциации клинической химии, США

**Тогузов Руслан Тимофеевич,**
зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики ФУВ РГМУ, д. м. н., профессор

**Хоровская Лина Анатольевна,**
доцент кафедры клинической лабораторной диагностики СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, д. м. н., профессор

# Содержание

*Gary L. Myers, W. Greg Miller, Josef Coresh, James Fleming, Neil Greenberg, Tom Greene, Thomas Hostetter, Andrew S. Levey, Mauro Panteghini, Michael Welch, John H. Eckfeldt*

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО УЛУЧШЕНИЮ ПРОЦЕДУРЫ ИЗМЕРЕНИЯ СЫВОРОТОЧНОГО КРЕАТИНИНА: ОТЧЕТ ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОЧЕЙ ГРУППЫ НАЦИОНАЛЬНОЙ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЙ ПРОГРАММЫ ПО ЗАБОЛЕВАНИЯМ ПОЧКИ . . . . . 4

**КАЧЕСТВО МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ**

*Ю. В. Эмануэль, А. Л. Хотин*

ОСОБЕННОСТИ РАЗРАБОТКИ И ВНЕДРЕНИЯ СИСТЕМЫ МЕНЕДЖМЕНТА КАЧЕСТВА В ОРГАНИЗАЦИЯХ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ . . . . . 22

*С. Н. Ковалевская, Л. А. Хоровская, Н. Г. Петрова*

ФЛЕБОТОМИЯ КАК ВАЖНАЯ СОСТАВЛЯЮЩАЯ КАЧЕСТВА ПРЕАНАЛИТИЧЕСКОГО ЭТАПА ЛАБОРАТОРНОГО ПРОЦЕССА . . . . . 31

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ МЕДИЦИНА**

*КОНСИЛИУМ У ПОСТЕЛИ БОЛЬНОГО*

*А. С. Улитина, О. В. Сироткина, С. Н. Пчелина, М. В. Дубина*

ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КАК ОСНОВА ДЛЯ ИНДИВИДУАЛИЗИРОВАННОГО ПОДХОДА К ЛЕКАРСТВЕННОЙ ТЕРАПИИ . . . . . 36

*А. К. Мартусевич, С. С. Алексанин, А. А. Гришина*

БИОКРИСТАЛЛОМНАЯ МЕТАБОНОМИКА ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЫ . . . . . 44

**ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА В МИКРОБИОЛОГИИ**

*С. А. Божкова, Г. Е. Афиногенов, В. Л. Разоренов, Т. М. Петрова*

МОНИТОРИНГ МИКРОБНОГО ПЕЙЗАЖА В ОТДЕЛЕНИИ ГНОЙНОЙ ХИРУРГИИ — ОСНОВА ДЛЯ РАЗРАБОТКИ РАЦИОНАЛЬНОЙ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ . . . . . 50

*А. Л. Позняк, С. Н. Сидорчук, Л. Б. Дрыгина, Т. В. Горейко*

СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ ДИАГНОСТИКИ МОЧЕПОЛОВОЙ ХЛАМИДИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ . . . . . 57

*А. В. Червинская, А. С. Кветная, Т. Б. Корженевская*

ВЛИЯНИЕ СУХОГО ВЫСОКОДИСПЕРСНОГО АЭРОЗОЛЯ ХЛОРИДА НАТРИЯ НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА *STREPTHOCOCCUS PNEUMONIAE,* ПЕРСИСТИРУЮЩЕГО НА СЛИЗИСТОЙ ЛАРИНГОФАРИНГЕАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ, В ЭКСПЕРИМЕНТЕ . . . . . 72

**ЛАБОРАТОРНЫЕ АСПЕКТЫ КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ**

*Т. Л. Каронова, О. Д. Беляева, Е. И. Красильникова, М. В. Буданова, Н. С. Катышева, Е. А. Баженова, А. В. Березина, Е. И. Баранова, Е. Н. Гринева*

ПОКАЗАТЕЛИ УГЛЕВОДНОГО И ЛИПИДНОГО МЕТАБОЛИЗМА В СОПОСТАВЛЕНИИ С КОЛИЧЕСТВОМ И РАСПРЕДЕЛЕНИЕМ ЖИРОВОЙ ТКАНИ У ЖЕНЩИН С АБДОМИНАЛЬНЫМ ОЖИРЕНИЕМ . . . . . 78

*Ю. В. Гайдук, И. Е. Шарина*

ОСОБЕННОСТИ НАРУШЕНИЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ВРОЖДЕННЫХ ПОРАЖЕНИЯХ ОПОРНО-ДВИГАТЕЛЬНОГО АППАРАТА И ПОРОКАХ РАЗВИТИЯ СПИННОГО МОЗГА . . . . . 84

**СЕМИНАРЫ ПО КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ДЛЯ ПРАКТИЧЕСКИХ ВРАЧЕЙ**

*А. В. Багаев*

ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЛИКИРОВАННОГО ГЕМОГЛОБИНА . . . . . 88

# РЕКОМЕНДАЦИИ ПО УЛУЧШЕНИЮ ПРОЦЕДУРЫ ИЗМЕРЕНИЯ СЫВОРОТОЧНОГО КРЕАТИНИНА: ОТЧЕТ ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОЧЕЙ ГРУППЫ НАЦИОНАЛЬНОЙ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЙ ПРОГРАММЫ ПО ЗАБОЛЕВАНИЯМ ПОЧКИ

**GARY L. MYERS[1]*, W. GREG MILLER[2], JOSEF CORESH[3], JAMES FLEMING[4], NEIL GREENBERG[5], TOM GREENE[6], THOMAS HOSTETTER[7], ANDREW S. LEVEY[8], MAURO PANTEGHINI[9], MICHAEL WELCH[10], JOHN H. ECKFELDT[11] для Лабораторной рабочей группы Национальной образовательной программы по заболеваниям почки**

**[1] Division of Laboratory Sciences, National Center for Environmental Health, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA.**
**[2] Department of Pathology, Virginia Commonwealth University, Richmond, VA.**
**[3] Department of Epidemiology, Johns Hopkins University, Baltimore, MD.**
**[4] Department of Science and Technology, Laboratory Corporation of America, Elon, NC.**
**[5] Ortho Clinical Diagnostics, Rochester, NY.**
**[6] Department of Quantitative Health Science, Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, OH.**
**[7] National Kidney Disease Education Program, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD.**
**[8] Division of Nephrology, Tufts New England Medical Center, Boston, MA.**
**[9] Department of Clinical Sciences "Luigi Sacco", University of Milan, Milan, Italy.**
**[10] Chemical Science and Technology Laboratory, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD.**
**[11] Department of Laboratory Medicine and Pathology, University of Minnesota, Minneapolis, MN.**

Данная статья была переведена с разрешения AACC. AACC не отвечает за точность перевода. Точка зрения, высказанная авторами, не обязательно отражает точку зрения AACC или журнала. Перепечатано из Clin. Chem., 2006; 56: 1: 5–18 с разрешения издательства. Оригинальная публикация — 2006. При цитировании статьи необходимо ссылаться на оригинальную публикацию в журнале «Клиническая химия» ("Clinical Chemistry").

***Резюме.*** *При оценке скорости клубочковой фильтрации (СКФ) критически важным фактором является наличие надежного метода определения сывороточного креатинина. Этот метод жизненно необходим для реализации всеобщих усилий специалистов здравоохранения, направленных на повышение эффективности диагностики и лечения хронических заболеваний почек (ХЗП). Мы представляем обзор широко распространенных методов определения сывороточного креатинина, их ограничений и погрешности в связи с усовершенствованием критериев аналитической погрешности. Обсуждаются доступные ресурсы, необходимые для стандартизации измерения креатинина сыворотки, даются рекомендации по улучшению измерений.*

***Методы.*** *Лабораторная рабочая группа Национальной образовательной программы по заболеваниям почки (NKDEP) рассмотрела проблемы, связанные с измерением сывороточного креатинина для оценки СКФ, и подготовила рекомендации по стандартизации и повышению качества измерения креатинина.*

***Результаты.*** *Лабораторная рабочая группа NKDEP совместно с международными профессиональными объединениями разработала план, позволяющий стандартизировать и повысить точность (правильность) определения сывороточного креатинина в клинических лабораториях по всему миру. Этот план включает использование уравнения для оценки СКФ на основании концентрации креатинина, разработанного в ходе исследования MDRD (модификация диеты при заболеваниях почек).*

***Заключение.*** *В настоящее время вариабельность результатов определения сывороточного креатинина затрагивает все уравнения для оценки СКФ, включая уравнение MDRD, что приводит к получению менее точных результатов в диапазоне нормальной и слегка повышенной концентрации сывороточного креатинина (< 133 мкмоль/л (1,5 мг/дл)), т.е. в диапазоне значений, актуальных для выявления ХЗП (<60 мл · мин$^{-1}$ · (1,73 м$^2$)$^{-1}$). Многие рутинные автоматизированные методы определения сывороточного креатинина имеют предельно допустимую погрешность или погрешность, превосходящую допустимую; поэтому необходимо уменьшить систематическую погрешность различных тестов на креатинин. Стандартизация калибровки не устраняет аналитическую интерференцию*

* Адрес для связи с автором статьи: Division of Laboratory Sciences, National Center for Environmental Health, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA 30341. Fax 770-488-4192; e-mail GMyers@cdc.gov.

Статья получена 26 апреля 2005 г.; принята к печати 2 сентября 2005 г. Ранее опубликовано online по адресу DOI: 10.1373/clinchem.2005.0525144.

*(неспецифическую систематическую погрешность). Необходимо уменьшить систематическую погрешность и решить проблемы, связанные с неспецифичностью некоторых рутинных методов.*

© 2006 American Association for Clinical Chemistry.

## RECOMMENDATIONS FOR IMPROVING SERUM CREATININE MEASUREMENT: A REPORT FROM THE LABORATORY WORKING GROUP OF THE NATIONAL KIDNEY DISEASE EDUCATION PROGRAM

**GARY L. MYERS[1]*, W. GREG MILLER[2], JOSEF CORESH[3], JAMES FLEMING[4], NEIL GREENBERG[5], TOM GREENE[6], THOMAS HOSTETTER[7], ANDREW S. LEVEY[8], MAURO PANTEGHINI[9], MICHAEL WELCH[10], JOHN H. ECKFELDT[11]**

**[1] Division of Laboratory Sciences, National Center for Environmental Health, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA.**
**[2] Department of Pathology, Virginia Commonwealth University, Richmond, VA.**
**[3] Department of Epidemiology, Johns Hopkins University, Baltimore, MD.**
**[4] Department of Science and Technology, Laboratory Corporation of America, Elon, NC.**
**[5] Ortho Clinical Diagnostics, Rochester, NY.**
**[6] Department of Quantitative Health Science, Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, OH.**
**[7] National Kidney Disease Education Program, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD.**
**[8] Division of Nephrology, Tufts New England Medical Center, Boston, MA.**
**[9] Department of Clinical Sciences "Luigi Sacco", University of Milan, Milan, Italy.**
**[10] Chemical Science and Technology Laboratory, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD.**
**[11] Department of Laboratory Medicine and Pathology, University of Minnesota, Minneapolis, MN.**

This article has been translated with the permission of AACC. AACC is not responsible for the accuracy of the translation. The views presented are those of the authors and not necessarily those of the AACC or the Journal. Reprinted from Clin. Chem., 2006; 56: 1: 5–18, by permission of the publisher. Original copyright © 2006 American Association for Clinical Chemistry, Inc. When citing this article, please refer to the original publication source in the journal, Clinical Chemistry.

***Background.*** *Reliable serum creatinine measurements in glomerular filtration rate (GFR) estimation are critical to ongoing global public health efforts to increase the diagnosis and treatment of chronic kidney disease (CKD). We present an overview of the commonly used methods for the determination of serum creatinine, method limitations, and method performance in conjunction with the development of analytical performance criteria. Available resources for standardization of serum creatinine measurement are discussed, and recommendations for measurement improvement are given.*

***Methods.*** *The National Kidney Disease Education Program (NKDEP) Laboratory Working Group reviewed problems related to serum creatinine measurement for estimating GFR and prepared recommendations to standardize and improve creatinine measurement.*

***Results.*** *The NKDEP Laboratory Working Group, in collaboration with international professional organizations, has developed a plan that enables standardization and improved accuracy (trueness) of serum creatinine measurements in clinical laboratories worldwide that includes the use of the estimating equation for GFR based on serum creatinine concentration that was developed from the Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) study.*

***Conclusions.*** *The current variability in serum creatinine measurements renders all estimating equations for GFR, including the MDRD Study equation, less accurate in the normal and slightly increased range of serum creatinine concentrations [<133 · mol/L (1.5 mg/dL)], which is the relevant range for detecting CKD [<60 mL · min$^{-1}$ · (1.73 m$^2$)$^{-1}$]. Many automated routine methods for serum creatinine measurement meet or exceed the required precision; therefore, reduction of analytical bias in creatinine assays is needed. Standardization of calibration does not correct for analytical interferences (nonspecificity bias). The bias and nonspecificity problems associated with some of the routine methods must be addressed.*

© 2006 American Association for Clinical Chemistry.

* Address correspondence to this author at: Division of Laboratory Sciences, National Center for Environmental Health, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA 30341. Fax 770-488-4192; e-mail GMyers@cdc.gov.

Received April 26, 2005; accepted September 2, 2005. Previously published online at DOI: 10.1373/clinchem.2005.0525144.

Хронические заболевания почек (ХЗП)* являются основной проблемой здравоохранения в США. За последние двадцать лет степень распространения и число случаев почечной недостаточности в терминальной стадии, требующей лечения диализом или трансплантации, возросли более чем в четыре раза [1]. Число людей с ранней стадией ХЗП оценивается примерно в 19 миллионов, включая 8 миллионов со скоростью клубочковой фильтрации (СКФ) < 60 мл · мин$^{-1}$ · (1,73 м$^2$)$^{-1}$ и 11 миллионов с СКФ > 60 мл · мин$^{-1}$ · (1,73 м$^2$)$^{-1}$, но аномально высокой экскрецией альбумина (отношение альбумина к креатинину в моче составляет >30 мг/г) [2].

Недавно в рамках Инициативы по повышению качества исходов болезней почек (K/DOQI) Национального фонда почки (National Kidney Foundation) и Национальной образовательной программы по заболеваниям почек (NKDEP) Национального института диабета, пищеварительных и почечных заболеваний (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases) было дано определение ХЗП: это повреждение почки либо состояние, при котором СКФ в течение трех и более месяцев, независимо от причины, составляет < 60 мл · мин$^{-1}$ · (1,73 м$^2$)$^{-1}$. Также этими организациями была предложена классификация степени тяжести ХЗП на основании СКФ [3].

Традиционно СКФ считается лучшим показателем общей функциональности почек [4]. Пороговое значение СКФ 60 мл · мин$^{-1}$ · (1,73 м$^2$)$^{-1}$ было выбрано для оценки ХЗП потому, что при этом значении утрачивается примерно половина нормальной функциональности почек взрослого человека, что может привести к различным осложнениям [3].

Сотрудники лабораторий по всему миру должны осознать важность получения надежных результатов определения сывороточного креатинина при оценке СКФ, а также значение факторов, которые могут влиять на измерение. Это критически важно для реализации всеобщих усилий специалистов здравоохранения, направленных на повышение эффективности диагностики и лечения ХЗП. Лабораторная рабочая группа NKDEP совместно с международными профессиональными объединениями разработала план, позволяющий стандартизировать и повысить точность (правильность) определения сывороточного креатинина в клинических лабораториях по всему миру.

### Материалы и методы, использующиеся для оценки СКФ

СКФ нельзя измерить непосредственно, но ее можно оценить путем определения почечного клиренса экзогенных маркеров фильтрации, таких как инулин, йогексол и йоталамат [5–7]. Однако из-за трудностей в работе, дороговизны, радиоактивного излучения и нормативов, регулирующих работу с радионуклидами, эти методы имеют ограниченную сферу применения в клинических лабораториях и, как правило, используются в научно-исследовательских учреждениях.

В клинических условиях СКФ часто оценивается с помощью концентрации в сыворотке эндогенного креатинина [8] или цистатина С [9, 10]. Использование сывороточного цистатина С в качестве показателя СКФ еще недостаточно разработано [11], а концентрация сывороточного креатинина не должна использоваться сама по себе для оценки СКФ или выявления ХЗП, поскольку она зависит не только от СКФ, но также от ряда не зависящих от СКФ факторов, включая возраст, пол, расовую принадлежность, вес тела, режим питания, употребление определенных лекарственных препаратов и используемые аналитические методы [12, 13]. Более точную оценку СКФ можно получить с помощью уравнений, выведенных эмпирическим путем, в которых учтено усредненное влияние факторов, воздействующих на концентрацию креатинина в сыворотке (помимо СКФ) [14]. Рекомендуемое в настоящее время оценочное уравнение разработано с использованием данных исследования изменения диеты при заболеваниях почек (MDRD) [15] и основано на значениях СКФ, определенных по клиренсу йоталамата у 1628 взрослых людей. Эти значения впоследствии прошли валидацию в ходе исследования заболеваний почек у афроамериканцев (African American Study of Kidney Disease, AASK), в котором приняли участие 1755 других взрослых людей [16]. В уравнении MDRD с четырьмя переменными (ур. 1) учитываются возраст, пол, раса (афроамериканец или не афроамериканец) и концентрация креатинина в сыворотке (sCr) (17):

$$\text{СКФ [мл} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot (1{,}73\ \text{м}^2)^{-1}] = 186 \times (\text{sCr})^{-1{,}154} \times \times (\text{возраст})^{-0{,}203} \times (0{,}742 \text{ для женщин}) \times \times (1{,}210 \text{ для афроамериканцев}) \quad (1)$$

В уравнении MDRD не используется в качестве переменной размер тела, поскольку СКФ нормализует-

* Сокращения: ХЗП — хронические заболевания почек; СКФ — скорость клубочковой фильтрации; K/DOQI — Инициатива по повышению качества исходов болезней почек (Kidney Disease Outcomes Quality Initiative); NKDEP — Национальная образовательная программа по заболеваниям почек (National Kidney Disease Education Program); MDRD — модификация диеты при заболеваниях почек (Modification of Diet and Renal Disease); IDMS — масс-спектрометрия с изотопным разведением; GC — газовая хроматография; LC — жидкостная хроматография; PT — проверка профессионального уровня лаборатории (proficiency testing); EQAS — Программа внешнего обеспечения качества (external quality assurance scheme); CAP — Коллегия американских патологов (College of American Pathologists); IVD — диагностика in vitro; ISO — Международная организация по стандартизации; JCTLM — Объединенный комитет по единству измерений в лабораторной медицине (Joint Committee on Traceability in Laboratory Medicine); CLSI — Институт клинических и лабораторных стандартов (Clinical and Laboratory Standards Institute).

ся с учетом стандартной площади поверхности тела, составляющей 1,73 м$^2$.

Было показано, что уравнение MDRD полезно при лечении пациентов с ХЗП, его эффективность схожа при диабетической и недиабетической нефропатии [18], однако его использование для оценки состояния здоровых людей не разработано и для госпитализированных пациентов не рекомендуется [19].

В настоящее время существуют вариации калибровки тестов на сывороточный креатинин. Если калибровка тестов не соответствует кинетическому методу определения с использованием щелочного пикрата (этот метод использовался в исследовании MDRD), эти тесты будут источником погрешности при оценке СКФ. Данная погрешность калибровки относительно больше при низких концентрациях креатинина, она дает бóльшую неопределенность в оценке СКФ в области верхней границы референсного диапазона [20]. На рисунке 1 показано постепенное увеличение неопределенности СКФ при увеличении систематической погрешности калибровки для разных методов определения креатинина [21]. Рисунок 2 иллюстрирует усиление влияния случайной погрешности измерения креатинина в области низких значений. Таким образом, систематическая погрешность калибровки и случайная погрешность измерения сывороточного креатинина имеют гораздо более сильное влияние на неопределенность оценки СКФ в том случае, когда концентрация сывороточного креатинина близка к референсному значению, т. е. находится в том диапазоне, который используется для раннего выявления ХЗП (СКФ < 60 мл · мин$^{-1}$ · (1,73 м$^2$)$^{-1}$).

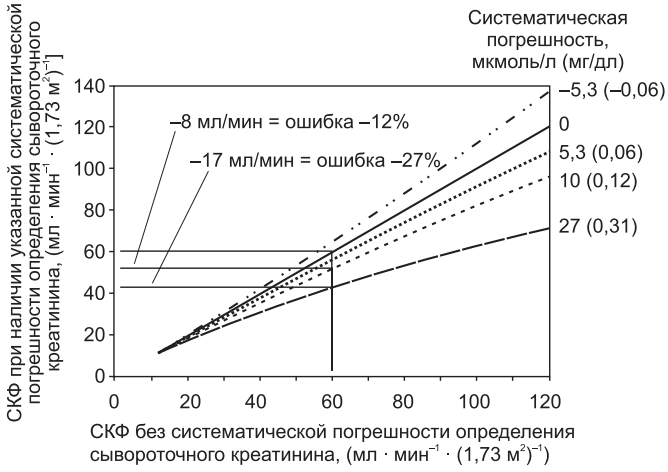



Рисунок 1. Влияние систематической погрешности калибровки на расчетное значение СКФ.

*Линии* представляют собой расчетные значения СКФ без систематической погрешности и с указанной систематической погрешностью определения сывороточного креатинина для образца 60-летней женщины, не афроамериканки (СКФ 60 мл · мин$^{-1}$ · (1,73 м$^2$)$^{-1}$ при концентрации креатинина 88,4 мкмоль/л (1,00 мг/дл)). Показанные систематические погрешности представляют собой минимальное, максимальное и наиболее часто встречающееся расхождение, полученное при исследовании свежезамороженного образца 50 различными методами. Данная работа была выполнена Коллегией американских патологов (CAP) в 2003 году [126]. Для расчетной СКФ 60 мл × мин$^{-1}$ × × (1,73 м$^2$)$^{-1}$ расхождение в калибровке 11 мкмоль/л (0,12 мг/дл) ассоциировано с ошибкой определения СКФ 12%. Ошибка определения СКФ во всем диапазоне наблюдаемой систематической погрешности составила от +7,5 до –27%. График на рисунке 1 построен на основании результатов Murthy и др. [21] и обновлен с учетом новых данных, полученных в ходе исследования CAP, проведенного в 2003 году

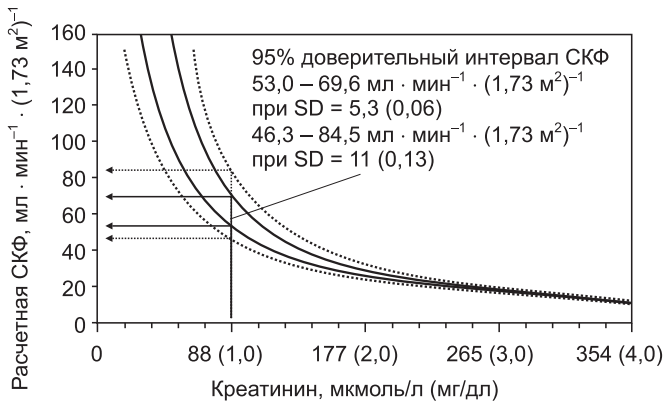



Рисунок 2. Влияние случайной погрешности измерения креатинина на расчетную СКФ.

Сплошными линиями обозначены верхний и нижний пределы 95% доверительного интервала для расчетного значения СКФ 60-летней женщины, не афроамериканки (СКФ 60 мл мин$^{-1}$ · (1,73 м$^2$)$^{-1}$ при концентрации креатинина 88,4 мкмоль/л (1,00 мг/дл)). В качестве SD использовалось значение 5,3 мкмоль/л (0,06 мг/дл). Данное SD — это медианное SD, полученное при исследовании 50 различными методами свежезамороженного образца сыворотки с концентрацией креатинина 80 мкмоль/мл (0,90 мг/дл). Данная работа была выполнена CAP в 2003 году [126]. Пунктирные линии обозначают верхний и нижний пределы 95% доверительного интервала для расчетного значения СКФ, основанного на самой высокой SD, 12 мкмоль/л (0,13 мг/дл), полученной в ходе исследования

Данное ограничение действует не только для уравнения MDRD, но также для всех оценочных уравнений, в которых используется концентрация сывороточного креатинина [22]. По этой причине NKDEP в настоящее время рекомендует при получении СКФ больше 60 мл × × мин$^{-1}$ × (1,73 м$^2$)$^{-1}$ приводить в отчете не точное числовое значение, а просто сообщать, что результат > 60 мл × × мин$^{-1}$ × (1,73 м$^2$)$^{-1}$ [3, 18]. Вариабельность калибровки тестов на креатинин и случайная погрешность измерения также вносят свой вклад в существенную неопределенность оценки СКФ у детей, для которых, как правило, характерна более низкая концентрация креатинина, чем у взрослых. Для оценки СКФ у детей рекомендуется использовать уравнения Шварца и Конахана-Барата [23–26]. Оба уравнения обеспечивают оценку СКФ с помощью константы, которая умножается на вес ребенка, разделенный на измеренную концентрацию креатинина в сыворотке.

### Источники вариабельности расчетной СКФ

Источники вариабельности расчетной СКФ включают базовую биологическую вариабельность значений СКФ, биологическую вариабельность значений сывороточного креатинина, ошибки измерения сывороточ-

ного креатинина и ошибки, связанные с оценочным уравнением.

СКФ может варьировать в зависимости от питания, физической активности, позы, изменений давления крови и других причин. Также на СКФ влияют беременность, контроль концентрации глюкозы при диабете, объем внеклеточной жидкости, использование препаратов, понижающих давление, наличие острых и хронических заболеваний почек [27]. Ошибки могут произойти при измерении маркеров почечной фильтрации в сыворотке и моче, при выполнении урофлоуметрии или при сборе мочи. Вариабельность периодов клиренса в ходе измерения СКФ также может привести к ошибке [28]. По литературным данным, медианный внутрииндивидуальный CV для измеренной СКФ колеблется в диапазоне от 6,3 до 7,5% [6, 29]. Данные измерения СКФ были выполнены в контролируемых условиях; видимо, поэтому внутрииндивидуальная вариабельность была меньше, чем в типичных клинических лабораториях.

В двух опубликованных работах внутрииндивидуальный CV концентрации сывороточного креатинина составил 4,1 и 4,3% соответственно [30, 31]. Ни в одну из этих работ не были включены пациенты с ХЗП.

### Спецификации аналитической погрешности для расчетной СКФ

Процентильная кривая распределения расхождения расчетной и измеренной СКФ является хорошим средством определения точности оценки СКФ. В исследовании K/DOQI сообщается, что для независимой выборки, состоящей из образцов 1070 человек с СКФ в диапазоне < 90 мл·мин$^{-1}$·(1,73 м$^2$)$^{-1}$, ~90% значений СКФ, вычисленных с помощью уравнения MDRD, оказались в пределах 30% от измеренной СКФ [3]. Данная общая мера погрешности клинических исследований учитывает составляющие ошибки из нескольких источников: погрешность измерения сывороточного креатинина, включая неспецифические факторы, связанные со свойствами образцов, и факторы, определяющие метаболизм креатинина (помимо СКФ), включая его генерацию, секрецию и выведение; погрешность измерения СКФ по клиренсу йоталамата, включая физиологические различия почечной функциональности и различия, связанные с сопутствующими патологическими состояниями.

В работе K/DOQI было сделано заключение, что, учитывая ошибки различных типов, колебания расчетной СКФ в пределах 30% от измеренной СКФ приемлемы для клинической интерпретации (т. е. для идентификации лиц с ХЗП, у которых в течение трех и более месяцев наблюдается СКФ < 60 мл·мин$^{-1}$·(1,73 м$^2$)$^{-1}$) и для последующего наблюдения за ходом развития заболевания. Например, при СКФ 60 мл·мин$^{-1}$ × ×(1,73 м$^2$)$^{-1}$, диапазон значений СКФ составит 42–78 мл·мин$^{-1}$·(1,73 м$^2$)$^{-1}$.

### Спецификации аналитической погрешности для определения сывороточного креатинина

Для того, чтобы общая неопределенность расчетной СКФ оставалась в клинически приемлемых пределах, измерение концентрации креатинина в сыворотке должно иметь достаточно небольшую общую погрешность. Критическая концентрация сывороточного креатинина, соответствующая СКФ 60 мл·мин$^{-1}$·(1,73 м$^2$)$^{-1}$, зависит от возраста, пола и расы пациента [3]. У 60-летней женщины, не афроамериканки, типичная концентрация креатинина для этого критического значения СКФ составляет 88,4 мкмоль/л (1,00 мг/дл), у 60-летней афроамериканки — 99 мкмоль/л (1,18 мг/дл), у 60-летнего мужчины, не афроамериканца — 114 мкмоль/л (1,30 мг/дл), а у 60-летнего афроамериканца — 135 мкмоль/л (1,53 мг/дл).

Таким образом, концентрация креатинина, попадающая в референсные интервалы или очень близкая к референсным интервалам, приводящимся во многих исследованиях, соответствует существенному снижению СКФ у некоторых пациентов. Для тех же демографических групп при расчетной СКФ 30 мл·мин$^{-1}$·(1,73 м$^2$)$^{-1}$ концентрация креатинина в сыворотке составляет 162, 190, 209 и 247 мкмоль/л (1,83, 2,15, 2,37 и 2,79 мг/дл) соответственно. При небольшой концентрации креатинина случайная и систематическая погрешности его определения приводят к значительному увеличению погрешности определения СКФ (рис. 1 и 2), поэтому в настоящее время необходимо повысить эффективность лабораторных измерений при концентрации креатинина 88,4 мкмоль/л (1,00 мг/дл), которая для некоторых демографических групп взрослых людей соответствует СКФ 60 мл·мин$^{-1}$ · (1,73 м$^2$)$^{-1}$ и находится в нижней части диапазона измерения (где влияние систематической и случайной погрешностей будет выше, чем при более высоких значениях).

Две первичных составляющих погрешности измерения сывороточного креатинина — это систематическая погрешность, т. е. систематическая ошибка, которая, как правило, является следствием различий в калибровке процедур измерения, и случайная погрешность измерения, которая включает внутрилабораторные факторы, межлабораторную случайную вариабельность стандартной калибровки и факторы, связанные со спецификой образцов. При моделировании этих погрешностей случайные ошибки, имеющие гауссово распределение, и увеличивающиеся систематические погрешности были добавлены к базовой концентрации креатинина, полученной в ходе валидационной части исследования MDRD, в которой принимал участие 491 пациент. Концентрация креатинина составляла от 88,4 до 132 мкмоль/л (от 1,00 до 1,50 мг/дл). Для каждого инкремента добавленной случайной ошибки и систематической погрешности было вычислено увеличение среднеквадратической ошибки расчетной СКФ

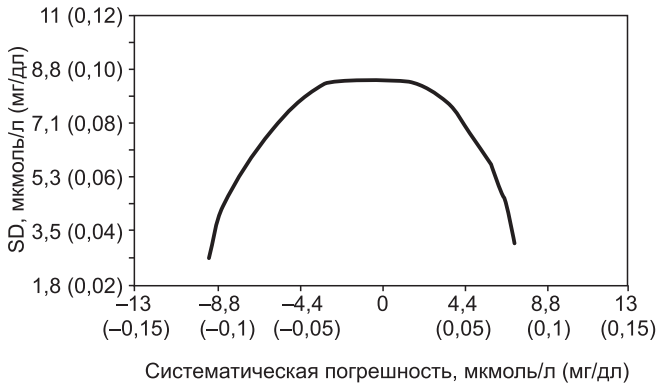



Рисунок 3. Ресурс общей ошибки измерения креатинина в диапазоне 88,4–133 мкмоль/л (1,00–1,50 мг/дл).

Кривая соответствует пределу систематической и случайной погрешностей, которые дают относительное увеличение среднеквадратической ошибки не более чем на 10% при расчете СКФ по уравнению MDRD

по сравнению с СКФ, измеренной с помощью йоталамата.

На рисунке 3 показана верхняя граница комбинации систематической и случайной погрешностей измерения сывороточного креатинина, совокупность которых приводит к увеличению среднеквадратической ошибки расчетной СКФ не более чем на 10% (это произвольно выбранное достаточно небольшое увеличение, соответствующее предыдущим рекомендациям, касающимся влияния ошибки измерения на клиническую пригодность лабораторных результатов [32]). Было сделано допущение, что измерения сывороточного креатинина, выполненные в ходе исследования MDRD, имеют нулевую систематическую погрешность; таким образом, инкременты систематической погрешности следует интерпретировать как отличия от состояния, при котором систематическая погрешность нулевая. Инкременты SD добавлялись к базовому SD в исследовании MDRD (2,65 мкмоль/л (0,03 мг/дл) для концентрации креатинина в диапазоне 88,4–133 мкмоль/л (1,00 –1,50 мг/дл)). Линия на рисунке 3 соответствует комбинации добавленной систематической погрешности и SD, при которой среднеквадратическая ошибка была ≤ 12,22 мл × мин$^{-1}$ × ×(1,73 м$^2$)$^{-1}$ (10% увеличение). Данные об ошибке метода, представленные на рисунке 3, следует обобщить для других условий, используя приемы моделирующего анализа. Более подробное описание моделирующего анализа можно найти в дополнительных материалах к данной статье, представленной в интернете по адресу *http://www.clinchem.org/content/vol52/issue1/*.

Ошибку лабораторных измерений сывороточного креатинина также можно оценить, основываясь исключительно на базовой биологической вариабельности [33]. При любом подходе к оценке аналитических характеристик, необходимых для клинической интерпретации результатов, необходимо учитывать и случайную ошибку, и систематическую ошибку. Было сделано следующее предложение: целевая удовлетворительная случайная погрешность должна составлять половину внутрииндивидуальной биологической вариабельности — в этом случае общая погрешность возрастет не более чем на 12% [32].

Недавние рекомендации относительно целевых аналитических характеристик, основанные на внутри- и межиндивидуальной биологической вариабельности, включают и случайную, и систематическую погрешности и содержат эмпирические рекомендации, которые можно использовать для клинической интерпретации результатов. Эти рекомендации разделены на категории в соответствии с максимально допустимой, удовлетворительной и оптимальной погрешностями метода [33].

Удовлетворительная случайная погрешность соответствует указанному ранее максимальному увеличению общей погрешности на 12%, а другие категории для случайной и систематической погрешностей являются произвольным расширением диапазона погрешности, они позволяют классифицировать методы по погрешности и выявить те методы, которые требуют усовершенствования. Целевые аналитические характеристики измерения креатинина при использовании данного подхода приводятся в таблице 1. Максимально допустимая общая погрешность оценивается как 11,4%, а удовлетворительная целевая общая погрешность — как 7,6%.

### Клинические лабораторные системы для оценки СКФ путем определения сывороточного креатинина

Наиболее широко используемые методы измерения концентрации сывороточного креатинина — это методы с применением щелочного пикрата, ферментативные или полуферментативные тесты и методы ВЭЖХ. Масс-спектрометрия с изотопным разведением используется в референсных методах высшего уровня и была разработана для анализа референсных материалов, однако доступна только в нескольких высокоспециализированных лабораториях во всем мире.

Поскольку никаких систематических отличий в измерении образцов плазмы и сыворотки в литературе отмечено не было, мы считаем результаты анализа сыворотки и плазмы эквивалентными [34]. Было обнаружено, что креатинин сыворотки остается стабильным при долговременном хранении и после повторного размораживания–замораживания [35], также его стабильность сохраняется в течение 24 часов при комнатной температуре в коагулированных образцах цельной крови [36].

## МЕТОДЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЩЕЛОЧНОГО ПИКРАТА

Измерение сывороточного креатинина методом Яффе [37] получило широкое распространение среди лабораторий, выполняющих стандартные исследования. Наличие в сыворотке интерферирующих веществ, особенно белков, может привести к завышению концентра-

*Таблица 1*

**Целевые аналитические характеристики измерения креатинина, рассчитанные на основании биологической вариабельности**

| CVi[a] | CVg[b] | Целевой CVa[c] | Целевая систематическая погрешность | Целевая ОП[d] |
|---|---|---|---|---|
| 4,3% | 12,9% | Максимально допустимая (0,75 CVi), 3,2% | Максимально допустимая [0,375 ($CVi^2$ + + $CVg^2)^{1/2}$], 5,1% | Максимально допустимая, 11,4% |
| | | Удовлетворительная (0,50 CVi), 2,2% | Удовлетворительная [0,25 ($CVi^2 + CVg^2)^{1/2}$], 3,4% | Удовлетворительная, 7,6% |
| | | Оптимальная (0,25 CVi), 1,1% | Оптимальная [0,125 ($CVi^2 + CVg^2)^{1/2}$], 1,7% | Оптимальная, 3,8% |

[a] CVi, средняя внутрииндивидуальная биологическая вариация [136].
[b] CVg, средняя межиндивидуальная биологическая вариация [136].
[c] CVa, аналитическая случайная погрешность. При достижении максимальной приемлемой случайной погрешности вклад аналитической вариабельности в общую вариабельность составляет самое большее 25%. При достижении удовлетворительной случайной погрешности вклад аналитической вариабельности в общую вариабельность составляет < 12%. При достижении оптимальной случайной погрешности вклад аналитической вариабельности в общую вариабельность составляет максимум 3% [33].
[d] ОП, общая погрешность. Целевое значение рассчитывается следующим образом: Целевая систематическая погрешность + (1,96 × Целевой CVa).

ции сывороточного креатинина на 15–25% при использовании различных модификаций метода Яффе. Многие эндогенные и экзогенные интерферирующие вещества вносят вклад в потерю аналитической специфичности метода Яффе [38–76]. Интерференция глюкозы [65–67] и ацетоацетата [58] особенно важна, поскольку лица, страдающие диабетом, входят в группу с повышенным риском развития ХЗП.

Чтобы повысить специфичность и снизить чувствительность к интерферирующим веществам, было предложено несколько модификаций метода, включая тесты с оптимизированной кинетикой [38, 77–81].

В одной работе изучалось влияние метода Яффе с компенсацией на величину расчетной СКФ. Было установлено, что у лиц с концентрацией сывороточного креатинина < 155 мкмоль/л (1,75 мг/дл) при использовании уравнения MDRD величина СКФ завышалась ~50% [82]. В другой работе для того, чтобы установить референсные интервалы, концентрация креатинина в сыворотке определялась с помощью нового модифицированного кинетического метода Яффе и модифицированной версии ферментативного метода с использованием *p*-аминофеназона (PAP) [83]. Ферментативный метод был стандартизирован по методу IDMS, а калибровочное значение для метода Яффе было установлено путем измерения нескольких сотен объединенных образцов сыворотки методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией с изотопным разведением (GC-IDMS) и методом Яффе. Результаты показали: для того, чтобы добиться соответствия с ферментативным методом, необходимо ввести поправку 21 мкмоль/л (0,234 мг/дл), которая позволит откорректировать модифицированный метод Яффе с учетом соединений, участвующих в реакции Яффе, но не являющихся креатинином. Таким образом, даже если случайная погрешность низка и тест стандартизован по референсному методу IDMS, если остается неспецифическая систематическая погрешность, для отдельных пациентов будут наблюдаться ошибки в расчетной СКФ.

## ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ МЕТОДЫ

Методы с использованием неорганических соединений [84, 85], которые были разработаны в качестве альтернативы методам с использованием щелочного пикрата, не получили широкого распространения в клинической практике, поскольку погрешность этих методов оказалась не ниже, чем погрешность различных вариаций метода Яффе. Единственными альтернативными методами, широко используемыми в стандартных клинических лабораториях, стали ферментативные методы определения креатинина [86–89]. Хотя ферментативные методы, согласно литературным данным, в целом имеют меньше факторов интерференции по сравнению с методом Яффе, однако в литературе сообщалось о различных веществах, мешающих определению креатинина этими методами [90–98].

## ВЭЖХ

В более ранних статьях уже высказывались предположения о том, что ВЭЖХ — это довольно чувствительный и аналитически специфичный метод для измерения сывороточного креатинина [99, 100]. Было описано более 50 методов анализа креатинина, включая катионообменную, нормально-фазовую, обращенно-фазовую и обращенно-фазовую ионпарную хроматографию [101]. Депротеинизация образца увеличивает специфичность анализа креатинина методом ВЭЖХ за счет устранения многих связанных белками эндогенных и экзогенных соединений, уровень креатинина при этом не меняется [101–111]. Некоторые авторы описывают методики прямой инжекции образца в колонку без этапа депротеинизации [99, 112, 113].

Интерференционные исследования показали, что методы на основе ВЭЖХ имеют более высокую аналитическую специфичность по сравнению с общепринятыми методами [101, 103, 106, 107, 109–111, 114–117]. Депротеинизация белка в сочетании с возможностью выбора параметров подвижной фазы позволяет сильно уменьшить количество интерферирующих веществ;

таким образом, ВЭЖХ является превосходным методом сравнения, который может использоваться производителями тестов на креатинин для решения внутренних задач.

## МЕТОДЫ, ОСНОВАННЫЕ НА МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

GC-IDMS считается предпочтительным методом определения истинной концентрации креатинина в сыворотке, поскольку этот метод имеет превосходную специфичность и относительное SD < 0,3% [118–120]. В этой процедуре ввиду полярности креатинина перед газовой хроматографией необходимо получить его производное. Кроме того, перед газовой хроматографией также необходимо провести этап очистки с помощью катионообменной смолы, поскольку креатин (соединение, похожее на креатинин) дает те же химические производные, что и креатинин. Недавно появилось сообщение о разработке метода прямого количественного определения креатинина, совмещающего ВЭЖХ с IDMS [121]. Это быстрая и простая процедура, которая в перспективе позволит получать высокоточные результаты, затрачивая на анализ существенно меньше времени, поскольку для ее выполнения требуется лишь осадить белок и не требуется получать производные креатинина. Слепое международное межлабораторное исследование показало, что метод жидкостной хроматографии (LC)-IDMS сравним с методом GCIDMS, наблюдаемая систематическая погрешность составила < 0,2%, а расширенная неопределенность < 0,3% ($k = 2$) [121].

### Погрешность современных рутинных методов определения креатинина

Некоторые организации, занимающиеся проверкой профессионального уровня лабораторий (proficiency testing, PT), предлагают программы внешней оценки качества (EQAS), предназначенные для оценки точности измерений сывороточного креатинина. К сожалению, материалы, которые, как правило, используются в межлабораторных PT-программах, не дают ту же числовую связь между двумя методами, которая наблюдается при анализе реальных клинических образцов (сопоставление значений невозможно). Это касается большинства стандартных методов, используемых клиническими лабораториями, включая методы определения креатинина [122–125].

В недавнем исследовании Коллегии американских патологов (CAP) было обнаружено, что для 69% методов определения креатинина результаты, полученные с использованием стандартных образцов для проверки профессионального уровня, не соответствуют результатам, полученным с использованием свежезамороженных образцов сыворотки [126]. Это ограничение не позволяет использовать результаты, полученные в ходе проверки профессионального уровня с помощью стандартных образцов, для того, чтобы путем сравнения с референсной процедурой измерения, такой как GC-IDMS, оценить точность в отдельной лаборатории или правильность метода, используемого группой лабораторий.

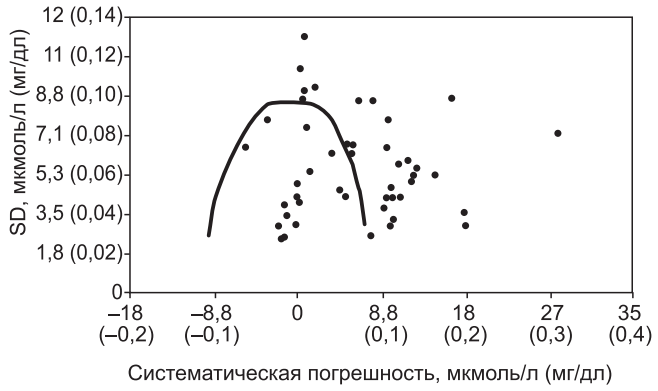



Рисунок 4. Погрешность рутинных методов в сравнении с пределом общей ошибки определения сывороточного креатинина.
Точки данных представляют систематическую погрешность по сравнению с референсной процедурой измерения GC-IDMS и межлабораторное SD для 50 рутинных методов. Данные получены при тестировании свежезамороженных объединенных образцов сыворотки с концентрацией креатинина 80 мкмоль/л (0,90 мг/дл) в ходе исследования CAP, проведенного в 2003 году [126]. Также представлена кривая ресурса общей ошибки измерения креатинина, ранее показанная на рисунке 3

Имеются программы PT и EQAS, в которых были получены результаты для оценки измерений креатинина. В этих программах использовались тщательно отобранные замороженные, не имеющие сгустков, объединенные образцы сыворотки, результаты которых, по-видимому, могут быть сопоставлены с результатами реальных клинических образцов сыворотки; в качестве референсной процедуры измерения использовался метод GC-IDMS [122, 125–128]. В совокупности эти наблюдения в рамках программ PT/EQAS указывают на то, что большое количество рутинных методов определения креатинина имеет большую систематическую погрешность (в диапазоне от –5,3 до 27 мкмоль/л (от –0,06 до 0,31 мг/дл) при концентрации креатинина ~80 мкмоль/л (0,90 мг/дл)), и программа стандартизации по референсной процедуре высокого уровня позволила бы производителям достичь существенного повышения правильности результатов определения креатинина, найденных рутинными методами.

Данные PT, полученные для групп лабораторий, использующих один метод, также содержат полезную информацию о межлабораторном SD, представляющем собой общую случайную погрешность. В это SD вносят вклад отсутствие единообразия калибровки в пределах группы и внутрилабораторная случайная погрешность. Эту информацию можно использовать для оценки дисперсии результатов, полученных рутинным методом, которая влияет на величину общей ошибки измерения креатинина. Два крупнейших исследования, в которых использовались образцы сыворотки, подходящие для сопоставления с клиническими образцами, показали

сходные SD для разных методов (0,088–12 мкмоль/л (0,001–0,131 мг/дл) с медианным SD 5,1 мкмоль/л (0,058 мг/дл) [126] и от ~2,6 до 11 мкмоль/л (0,03–0,12 мг/дл) [128]) и медианные CV (6,4% при концентрации креатинина 80 мкмоль/л (0,90 мг/дл) [126] и ~5% при концентрации креатинина 74 мкмоль/л (0,84 мг/дл) [128]). На рисунке 4 показаны данные исследования CAP: систематическая погрешность и межлабораторное SD для 50 групп лабораторий, объединенных по используемому методу [126]. Также на этом рисунке показана кривая ресурса общей ошибки, полученная в ходе моделирующего анализа и представленная ранее на рисунке 3.

Для 41 из 50 групп коррекция систематической погрешности позволила бы достигнуть такой погрешности метода, вклад которой в погрешность расчетной СКФ составил бы не больше 10%.

Внутрилабораторную случайную погрешность можно определить на основании внутренних данных ежедневного контроля качества. На основании данных, представленных в рамках программы межлабораторного мониторинга качества (G Cooper, Bio-Rad Laboratories Inc, Quality Systems Division, Irvine, CA.), внутрилабораторный CV соответствует SD в диапазоне от 1,8 до 7,5 мкмоль/л (от 0,02 до 0,085 мг/дл) при критической концентрации креатинина 88,4 мкмоль/л (1,00 мг/дл). Эти данные указывают на то, что внутри- и межлабораторные погрешности имеют сходную величину, их необходимо откорректировать для того, чтобы получить удовлетворительную общую погрешность метода.

### Средства стандартизации измерений сывороточного креатинина

Для того, чтобы повсеместно использовать оценку СКФ на основании измерений сывороточного креатинина, необходимы общие усилия по стандартизации рутинных измерений концентрации креатинина в сыворотке. Стандартизация по методу высокого уровня — это важное средство достижения необходимой сравнимости результатов измерений сывороточного креатинина независимо от используемого метода и/или условий, существующих в лаборатории, выполнившей анализ. Усилия по стандартизации должны включать международное сотрудничество производителей систем для диагностики in vitro (IVD), клинических лабораторий, профессиональных объединений, правительственных организаций и организаций, предоставляющих возможность проведения EQAS/PT.

Достижение единства измерений сывороточного креатинина в клинических лабораториях за счет производителей IVD-систем более эффективно по сравнению с попытками установить это единство на уровне десятков тысяч клинических лабораторий, занимающихся определением креатинина по всему миру (к примеру, в США 97% участников исследования CAP в 2003 использовали приборы 5 производителей [126]). Для повышения точности результатов определения креатинина необходимо, чтобы значения, присвоенные изготовителями калибраторам и контрольным материалам, были основаны на референсной процедуре измерения высокого уровня и референсных материалах высокого уровня. Международная организация по стандартизации (ISO) разработала стандарт, в котором подробно описывается способ достижения единства результатов измерений клинических лабораторий [129].

Единственным препятствием для внедрения этого способа на уровне производителей IVD-систем является наличие лабораторий, предпочитающих работать с «негомогенными» системами, в которых используется реагент одного производителя, а прибор или калибратор — другого производителя. В таких случаях лаборатория должна принять на себя основную ответственность и быть готова документально подтвердить точность представленных значений сывороточного креатинина.

Для решения глобальной задачи достижения стандартизации и единства измерений клинических лабораторий был создан Объединенный комитет по единству измерений в лабораторной медицине (Joint Committee on Traceability in Laboratory Medicine, JCTLM). Недавно JCTLM завершила критический обзор референсных материалов и референсных процедур, представленных на рассмотрение, используя критерии, установленные в стандартах ISO 15194 [130] и 5193 [131], которые определяют, соответственно, характеристики референсных материалов и референсных процедур более высокого порядка.

В настоящее время на сайте Bureau International des Poids et Mesures (*http://www.bipm.org/en/committees/jc/jctlm*) доступен первый список одобренных референсных материалов и референсных процедур измерения. Эти материалы и процедуры являются средствами, которые производители IVD-систем могут использовать для того, чтобы обеспечить непрерывную прослеживаемость и конвертацию единиц измерения в единицы СИ.

## РЕФЕРЕНСНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Стандартный референсный материал (SRM) 914a, рекомендованный Национальным институтом стандартов и технологий США (NIST), представляет собой кристаллический креатинин. Он предназначен для калибровки референсных процедур измерения. Растворы калибратора SRM 914a, приготовленные растворением кристаллического креатинина в водном буфере, предназначены прежде всего для использования в референсных процедурах высокого уровня (например, GCIDMS и LC-IDMS) и, как правило, непригодны для прямого измерения в обычных клинических анализаторах.

NIST и Институт референсных материалов и измерений (Institute for Reference Materials and Measurements, IRMM) предложили многоуровневые сертифицированные референсные материалы на основе сыворотки чело-

века (соответственно SRM 909b-1 и -2 и BCR 573, 574 и 575). Заданные значения этих материалов найдены методом GC-IDMS. Эти материалы предназначены для использования в качестве контролей правильности при выполнении референсных процедур измерения высокого уровня. Несмотря на то, что эти материалы приготовлены из сыворотки человека, их основной компонент претерпел изменения: плазма была преобразована в сыворотку, а затем лиофилизирована, что могло повлиять на результаты определения креатинина в этих растворах рутинными методами.

Поскольку для рутинных методов сопоставимость результатов, полученных при использовании этих материалов, с результатами анализа реальных клинических образцов не была установлена, необходимо соблюдать осторожность при использовании их в качестве референсных материалов для калибровки или контроля правильности измерений. Референсные материалы, результаты которых не сопоставимы с результатами реальных клинических образцов, могут вызвать значительную ошибку калибровки метода.

## РЕФЕРЕНСНЫЕ МАТЕРИАЛЫ, СОПОСТАВИМЫЕ С РЕАЛЬНЫМИ КЛИНИЧЕСКИМИ ОБРАЗЦАМИ

NKDEP, CAP и NIST совместно подготовили референсный материал на основе сывороточного креатинина человека с приемлемой сопоставимостью с реальными клиническими образцами при анализе рутинными методами. Этот материал представляет собой свежезамороженный объединенный образец сыворотки человека, подготовленный согласно руководству C-37A Института клинических и лабораторных стандартов (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) [132]. Были приготовлены материалы двух концентраций ~71 и 354 мкмоль/л (0,8 и 4,0 мг/дл). Чтобы добиться высокой концентрации, в материал добавлялся кристаллический креатинин. С помощью референсных процедур измерения GC-IDMS и LC-IDMS NIST присвоит этим материалам заданные значения. Этим материалам будет присвоено название NIST SRM 967. Ожидается, что они будут сопоставимы с реальными образцами сыворотки человека, их сопоставимость будет подтверждена для большого количества рутинных методов. NIST планирует представить этот новый референсный материал JCTLM для включения в список одобренных материалов.

## МАТЕРИАЛЫ PT И EQAS, СОПОСТАВИМЫЕ С РЕАЛЬНЫМИ КЛИНИЧЕСКИМИ ОБРАЗЦАМИ

Организации, осуществляющие программы PT и EQAS, должны сделать доступными материалы, сопоставимые с реальными клиническими образцами, для регулярной оценки погрешности измерения сывороточного креатинина в обычных клинических лабораториях. CAP в сотрудничестве с NKDEP и NIST представила программу верификации/проверки линейности калибровки (Calibration Verification/Linearity Survey, LN-24) для сывороточного креатинина (см. страницу 87 в каталоге за 2005 г. “Surveys and Educational Anatomic Pathology Programs” (*http://www.cap.org/apps/docs/proficiency_testing/Surveys_catalog_05.pdf*)). Эта новая программа проверки профессионального уровня была начата в 2004 году, в ней рассматривается диапазон результатов, важный для выявления ранних стадий ХЗП, 44–354 мкмоль/л (0,50–4,00 мг/дл). Заданные значения присвоены NIST с использованием IDMS. В данной внешней программе проверки профессионального уровня лабораторий используются замороженные объединенные образцы сыворотки человека, не имеющие сгустков и приготовленные в соответствии с рекомендациями CLSI C-37A [132]. NIST в сотрудничестве с CAP и NKDEP проведет оценку сопоставимости материала LN-24 с реальными клиническими образцами. Программы EQA и PT предоставят производителям IVD-систем и отдельным клиническим лабораториям прекрасный способ проверки соответствия их процедур измерения принятым стандартам.

## РЕФЕРЕНСНЫЕ ПРОЦЕДУРЫ ИЗМЕРЕНИЯ

Три метода GC-IDMS, предложенные Университетом Гента (Бельгия), Немецким обществом клинической химии и лабораторной медицины (German Society of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, DGKC) и NIST, были одобрены JCTLM в качестве референсных процедур измерения сывороточного креатинина [118–120]. Все три метода перед получением производных креатинина включают этап удаления креатина, который дает те же производные, что и креатинин; это этап газовой хроматографии, поэтому все три процедуры занимают очень много времени и имеют ограниченную производительность. Альтернативный подход к стандартизации результатов по референсной процедуре измерения, особенно в тех случаях, когда сопоставимость референсных материалов неизвестна, заключается в том, чтобы производители IVD-систем разделили образцы с лабораторией, выполняющей референсную процедуру измерения. Метод LC-IDMS был разработан для определения сывороточного креатинина и предложен во втором цикле исследований JCTLM для рассмотрения в качестве референсной процедуры [121]. Методы LC-IDMS гораздо проще по сравнению с методами GC-IDMS, подготовка образца происходит быстрее. Эти методы гораздо лучше подходят для сравнения разделенных образцов в более сжатые сроки.

### Введение в действие текущего уравнения MDRD для расчета СКФ на основании результатов определения сывороточного креатинина

NKDEP рекомендует немедленно, до того как будет проведена стандартизация измерений креатинина, на-

чать использовать уравнение MDRD для оценки СКФ. При разработке и проверке уравнения MDRD в центральной лаборатории был использован рутинный метод определения креатинина. Не является неожиданностью то, что этот метод имел небольшую положительную систематическую погрешность по сравнению с референсной процедурой GC-IDMS.

Отличие между систематической погрешностью калибровки этого метода и систематическими погрешностями калибровки наиболее современных рутинных методов относительно мало. В результате влияние систематической погрешности на неопределенность расчетной СКФ, хотя и не отвечает поставленной цели, однако, как считается, приносит значительную пользу при идентификации пациентов с ранними стадиями ХЗП.

При внедрении оценки СКФ на основании уравнения MDRD лабораториям необходимо решить несколько задач. Данное уравнение можно использовать для взрослых людей не моложе 18 лет. Влияние погрешности измерения креатинина существенно возрастает при высоких значениях СКФ (низких значениях креатинина); поэтому для расчетной СКФ > 60 мл×мин$^{-1}$× ×(1,73 м$^2$)$^{-1}$ приводить в отчете числовые значения не рекомендуется. Поскольку данное уравнение учитывает расовую принадлежность, рекомендуется приводить в отчете два значения расчетной СКФ: одно для афроамериканца(ки), другое для не афроамериканца(ки). Программное обеспечение не должно рассчитывать значение, если какая-либо информация отсутствует. И наконец, программа должна корректировать расчетную СКФ, если было изменено значение сывороточного креатинина, дата рождения (возраст) или пол.

При внедрении стандартизации определения креатинина по методу IDMS необходимо четко понимать клинические последствия этого шага. В сотрудничестве с производителями аналитических систем необходимо разработать систематическую программу информирования лабораторий о клинических последствиях изменения калибровки определения сывороточного креатинина. Поскольку большинство современных рутинных процедур измерения креатинина имеют небольшую положительную систематическую погрешность, изменение калибровки приведет к уменьшению числовых значений концентрации сывороточного креатинина. Поскольку метод определения креатинина, использованный для разработки и проверки уравнения MDRD, не стандартизован по методу IDMS, в коэффициенты уравнения MDRD необходимо внести изменения, соответствующие изменению стандартизации калибровки определения креатинина. Осенью 2005 года будет представлено улучшенное уравнение для оценки СКФ на основании значений сывороточного креатинина, стандартизованное по референсной процедуре измерения IDMS [133].

При внедрении пересмотренной калибровки креатинина, стандартизованной по IDMS, лаборатории должны сообщить организациям здравоохранения следующую информацию: референсные интервалы определения сывороточного креатинина сдвинутся в сторону меньших значений; снижение значений креатинина повлияет на результаты расчетной СКФ, используемые фармацевтами и представителями других медицинских профессий для определения дозы лекарств; измеренные и вычисленные значения клиренса креатинина возрастут, изменится соответствующий референсный интервал. Обратите внимание, значения расчетной СКФ, полученные с помощью уравнения MDRD, более точны, чем значения клиренса креатинина [3], поэтому не рекомендуется использовать клиренс креатинина для пациентов с нормальными размерами тела.

Для каждого рутинного метода определения креатинина необходимо тщательно оценить величину и влияние данного изменения калибровки так, чтобы после стандартизации, если потребуется откорректировать критерии принятия решения, прослеживалась количественная связь с текущими критериями. Недавно были опубликованы рекомендации, принятые в Австралии [134] и Великобритании [135].

### Ограничения уравнения MDRD

Имеются ограничения в использовании уравнения MDRD:

- Погрешность уравнения MDRD для здоровых людей и пациентов с ХЗП, имеющих СКФ ≥ 90 мл×мин$^{-1}$× × (1,73 м$^2$)$^{-1}$, не ясна.
- Эффективность уравнения MDRD не была проверена для детей, пожилых людей старше 75 лет, беременных женщин, пациентов с серьезными сопутствующими патологиями и лиц с очень большими размерами тела, большой мышечной массой и серьезными нарушениями режима питания. Использование этого уравнения для данных групп пациентов может привести к ошибкам в оценке СКФ.
- Вариабельность результатов определения сывороточного креатинина в диапазоне референсных (нормальных) значений и в диапазоне слегка увеличенных значений (< 133 мкмоль/л (1,50 мг/дл)) приводит к существенному снижению точности оценки СКФ с помощью всех уравнений, включая уравнение MDRD. Именно этот диапазон важен для выявления ХЗП у взрослых (СКФ < 60 мл × мин$^{-1}$× × (1,73 м$^2$)$^{-1}$).
- Большинство рутинных методов имеют удовлетворительную случайную погрешность; однако текущая систематическая погрешность рутинных методов определения сывороточного креатинина субоптимальна для достижения целевой общей погрешности оценки СКФ с помощью уравнения MDRD.
- Неспецифическая систематическая погрешность анализа отдельных клинических образцов может существенно повлиять на точность оценки СКФ, вычисленной на основании концентрации сывороточного креатинина.

- Стандартизация калибровки не позволяет откорректировать аналитическую интерференцию (неспецифическую систематическую погрешность). Проблемы, связанные с неспецифической погрешностью, должны решаться производителями IVD-систем.
- Внедрение стандартизации определения сывороточного креатинина по методам GC- или LC-IDMS приведет к изменению критериев принятия решения, действующих в настоящее время для сывороточного креатинина и клиренса креатинина. Будут подвергнуты сомнению любые клинические решения, принятые не на основании оценки СКФ с помощью нового уравнения MDRD с использованием концентрации креатинина, стандартизованной по референсному методу IDMS (который будет представлен осенью 2005 года).
- Корректировка калибровки рутинных методов в соответствии с методом GC- или LC-IDMS повлияет на клиническую интерпретацию результатов анализа креатинина и потребует следующих действий: распространения информации об изменении референсных интервалов; сообщения фармацевтам информации об изменении значений креатинина, от которых будет зависеть дозировка лекарственных препаратов; распространения информации об изменении значений клиренса креатинина и соответствующих референсных интервалов; а также коррекции коэффициентов, используемых в уравнении для вычисления СКФ.

**Рекомендации лабораторной рабочей группы NKDEP**

Лабораторная рабочая группа NKDEP выпустила следующие рекомендации как для производителей IVD-систем, так и для клинических лабораторий:

- Уже сейчас, до того как будут готовы к использованию пересмотренное уравнение MDRD и рутинные методы, стандартизованные по IDSM, необходимо начать использовать для вычисления СКФ уравнение MDRD для рутинных методов, не откалиброванных в соответствии с IDMS.
- Производители IVD-систем должны откалибровать методы определения сывороточного креатинина в соответствии с методом IDMS и согласованно ввести в действие вновь откалиброванные методы определения сывороточного креатинина и пересмотренное уравнение для оценки СКФ, пригодное для использования с рутинными методами, имеющими нулевую систематическую погрешность. Если согласованное введение в действие не может быть проведено, производители IVD-систем должны в сотрудничестве с NKDEP и другими профессиональными объединениями донести до заказчиков информацию о клинических последствиях, связанных с новой калибровкой метода определения креатинина (см. четвертый пункт в разделе «Для NKDEP в сотрудничестве с другими профессиональными объединениями»).
- Значения расчетной СКФ, превышающие 60 мл × × мин$^{-1}$ · (1,73 м$^2$)$^{-1}$, следует приводить в отчете в виде «> 60 мл · мин$^{-1}$ · (1,73 м$^2$)$^{-1}$», а не в виде точного числа. Значения < 60 мл · мин$^{-1}$ · (1,73 м$^2$)$^{-1}$ следует округлять в отчете до ближайшего целого числа, например «35 мл · мин$^{-1}$ · (1,73 м$^2$)$^{-1}$».
- Концентрацию сывороточного креатинина в мг/дл следует приводить в отчете с точностью до двух десятичных знаков (например, 0,92 мг/дл вместо 0,9 мг/дл). Концентрацию сывороточного креатинина в мкмоль/л следует округлять в отчете до ближайшего целого числа (например, 109 мкмоль/л вместо 109,3 мкмоль/л).
- После стандартизации калибровки по IDMS вполне реально добиться того, чтобы общая погрешность измерения креатинина увеличивала относительную погрешность оценки СКФ не более чем на 10%. Добиться этой целевой общей погрешности рутинных методов можно в том случае, если при концентрации сывороточного креатинина ≥ 88,4 мкмоль/л (1,00 мг/дл) аналитическая случайная погрешность (включая межлабораторную вариабельность калибровки) будет составлять < 8%, а аналитическая систематическая погрешность (по сравнению с референсной процедурой измерения IDMS) будет составлять < 5%.

ДЛЯ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ IVD-СИСТЕМ И ПОСТАВЩИКОВ ЛАБОРАТОРНЫХ ИНФОРМАЦИОННЫХ СИСТЕМ

- Производители IVD-систем должны обеспечить оптимальные характеристики существующих и новых методов при концентрации креатинина 88,4 мкмоль/л (1,00 мг/дл), а также обеспечить соизмеримую правильность и случайную погрешность во всем аналитическом диапазоне.
- Производители IVD-систем должны уменьшить случайную погрешность при концентрации креатинина < 88,4 мкмоль/л (1,00 мг/дл), чтобы иметь возможность расширить оценку СКФ до значений > 60 мл × мин$^{-1}$ × (1,73 м$^2$)$^{-1}$ и уменьшить неопределенность оценки СКФ для популяций детей.
- Производители IVD-систем должны решить проблемы, связанные с неспецифической систематической погрешностью анализа при использовании современных рутинных методов определения сывороточного креатинина.
- В программном обеспечении, предоставляемом поставщиками лабораторных информационных систем и производителями IVD-систем, необходимо изменить уравнение, используемое для оценки СКФ, на уравнение MDRD. Программное обеспечение должно быть обновлено, чтобы сделать возможным использование пересмотренного уравнения для оценки

СКФ, когда оно будет доступно, а также в соответствии со стандартизацией рутинного метода по IDMS.

### ДЛЯ NKDEP В СОТРУДНИЧЕСТВЕ С ДРУГИМИ ПРОФЕССИОНАЛЬНЫМИ ОБЪЕДИНЕНИЯМИ

- Необходимо определить отличия критериев принятия решения, которые могут появиться в результате стандартизации методов определения сывороточного креатинина по IDMS.
- Необходимо разработать новое уравнение MDRD, которое будет использоваться для оценки СКФ на основании измерений креатинина, стандартизованных по IDMS. При этом любая модификация должна иметь количественную связь с конечными решениями, принятыми с помощью текущего уравнения MDRD.
- Совместно с производителями IVD-систем и клиническими лабораториями следует обеспечить согласованное внедрение стандартизации методов по IDMS и пересмотренного уравнения для оценки СКФ.
- Следует разработать руководство, которое поможет производителям предложить клиническим лабораториям лучший способ согласованного внедрения стандартизации определения сывороточного креатинина по IDMS и одновременного внедрения нового уравнения для оценки СКФ, что приведет к изменениям клинической интерпретации значений сывороточного креатинина. Необходимо выполнить следующее: сообщить об изменении референсных интервалов сывороточного креатинина; сообщить об изменениях значений и референсных интервалов клиренса креатинина; сообщить фармацевтам об изменении значений креатинина, от которых зависит дозировка лекарственных препаратов; провести коррекцию коэффициентов в уравнении, используемом для вычисления СКФ.
- Следует согласовать внедрение стандартизации определения сывороточного креатинина по IDMS с организациями, осуществляющими программы PT/EQAS, чтобы обеспечить соответствующую классификацию участников при переходе между схемами калибровки.
- Следует определить небольшую группу референсных лабораторий в США и других странах, которые смогут выполнять высокопроизводительное измерение концентрации сывороточного креатинина референсным методом и предоставлять результаты в течение 1 месяца по разумной стоимости, таким образом, производители IVD-систем, организации, осуществляющие программу PT, и другие заинтересованные стороны смогут получить точные результаты определения креатинина, стандартизованные по референсному методу высокого уровня. Международная федерация клинической химии (IFCC) собрала Рабочую группу по СКФ, которая определит сеть референсных лабораторий для измерения сывороточного креатинина.
- Если в будущем альтернативный маркер фильтрации заменит сывороточный креатинин или будет использоваться совместно с сывороточным креатинином для оценки СКФ, должна быть разработана аналогичная программа стандартизации исследований. В настоящее время в IFCC уже действует рабочая группа по стандартизации цистатина С.
- Профессиональные объединения должны ввести в действие программы обучения своих участников, направленные на получение надежных результатов измерений сывороточного креатинина и правильное использование уравнения MDRD для оценки риска ХЗП. Рабочая группа IFCC по СКФ в сотрудничестве с NKDEP будет координировать глобальное введение в действие стандартизации креатинина вместе с новыми уравнениями для оценки СКФ, а также обучение сотрудников лабораторий в связи с важностью оценки риска развития ХЗП.

### ДЛЯ НАЦИОНАЛЬНЫХ МЕТРОЛОГИЧЕСКИХ ИНСТИТУТОВ, РЕФЕРЕНСНЫХ ЛАБОРАТОРИЙ И ОРГАНИЗАЦИЙ-ЧЛЕНОВ JCTLM

- Возможно, многие автоматизированные рутинные методы будут иметь предельно допустимую или выходящую за допустимые пределы случайную погрешность (более 8%), так что ее вклад в погрешность расчетной СКФ окажется больше 10%. Поэтому следует обеспечить средства, которые помогут производителям IVD-систем уменьшить аналитическую систематическую погрешность.
- Следует разработать легко доступные референсные материалы для определения сывороточного креатинина, продемонстрировать их сопоставимость с отдельными клиническими образцами сыворотки при анализе широким спектром рутинных методов и представить эти материалы JCTLM для проверки и одобрения. Предполагается, что после завершения разработки материала NIST SRM 967 (в двух концентрациях, ~71 мкмоль/л (0,80 мг/дл) и 354 мкмоль/л (4,00 мг/дл)), он будет удовлетворять этому требованию.
- Необходимо сделать доступной референсную процедуру измерения высокого уровня (например, LC-IDMS) с высокой производительностью и подтвердить, что эта процедура имеет незначительную систематическую погрешность или не имеет систематической погрешности по отношению к GC-IDMS. Такая высокопроизводительная референсная процедура измерения высокого порядка может помочь производителям IVD-систем проверить правильность используемых ими методов и сопоставимость

референсных материалов. Кроме того, референсным лабораториям придется оказывать аналитические услуги, обеспечивая стандартизацию и подтверждение стандартизации по референсному методу.

## ДЛЯ ОРГАНИЗАЦИЙ, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИХ ПРОГРАММЫ PT И EQAS

- Следует ввести в действие регулярную программу, в которой будут использоваться материалы сыворотки, сопоставимые с клиническими образцами и имеющие заданные значения, стандартизованные по референсной процедуре измерения IDMS, таким образом, чтобы производители IVD-систем смогли постоянно использовать результаты, полученные рутинными методами, для оценки качества работы клинических лабораторий и точности методов более низкого уровня.

### Члены Лабораторной рабочей группы NKDEP

Членами Лабораторной рабочей группы NKDEP являются John Eckfeldt, MD, PhD, University of Minnesota, National Kidney Disease Education Program, Laboratory Working Group Chair; Thomas Hostetter, MD, Director, National Kidney Disease Education Program and Director, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Institutes of Health; Elisa Gladstone, MPH, National Kidney Disease Education Program Associate Director, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Institutes of Health; Joris Delanghe, MD, PhD, University Hospital Ghent (European Communities Confederation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine); James Fleming, PhD, FACB, Laboratory Corporation of America; Neil Greenberg, PhD, Ortho Clinical Diagnostics (AdvaMed); Ethan Hausman, MD, FAAP, FCAP (US Food and Drug Administration); Glen Hortin, MD, PhD, National Institutes of Health; Harvey Kaufman, MD, Quest Diagnostics; Anthony Killeen, MD, PhD, University of Minnesota (College of American Pathologists); David A. Lacher, MD, MEd, Centers for Disease Control and Prevention; Timothy Larson, MD, Mayo Clinic Renal Laboratory (AACC); Andrew S. Levey, MD, Tufts-New England Medical Center; Frederick Van Lente, PhD, Cleveland Clinic (CKD Epidemiology Collaboration); Greg Miller, PhD, Virginia Commonwealth University (Clinical and Laboratory Standards Institute, formerly NCCLS); Gary Myers, PhD (Centers for Disease Control and Prevention); Mauro Panteghini, MD, Universita` degli Studi di Milano (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine); David W. Seccombe, MD, PhD, Canadian External Quality Assessment Laboratory; Michael Welch, PhD, National Institute of Standards and Technology. Names that appear with an organization in parentheses have been designated that organization's official working group representative.

Мы благодарим Элизу Глэдстоун (Elisa Gladstone) за ее неоценимую помощь в подготовке этой статьи и за ее превосходное материально-техническое обеспечение Лабораторной рабочей группы.

### Список литературы

1. US Renal Data System, USRDS 2002 annual data report: atlas of end-stage renal disease in the United States. Bethesda, MD: National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2002.

2. Coresh J., Astor B. C., Greene T., Eknoyan G., Levey A. S. Prevalence of chronic kidney disease and decreased kidney function in the adult US population: Third National Health and Nutrition Examination Survey // Am. J. Kidney Dis., 2003; 41: 1–12.

3. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. Kidney Disease Outcome Quality Initiative // Am. J. Kidney Dis., 2002; 39: S1–246.

4. Smith H. W. Comparative physiology of the kidney. In: The kidney: structure and function in health and disease. New York: Oxford University Press, 1951: 520–74.

5. Perrone R. D., Steinmen T. I., Beck G. J., Skibinski C. I., Royal H., Lawlor M., et al. Utility of radioisotopic filtration markers in chronic renal insufficiency: simultaneous comparison of 125Iiothalamate, 169Yb-DTPA, 99mTc-DTPA, and inulin. The Modification of Diet in Renal Disease Study Group // Am. J. Kidney Dis., 1990; 16: 224–35.

6. Levey A. S., Greene T., Schluchter M. D., Cleary P. A., Teschan P. E., Lorenz R. A., et al. Glomerular filtration rate measurements in clinical trials. Modification of Diet in Renal Disease Study Group and the Diabetes Control and Complications Trial Research Group // J. Am. Soc. Nephrol., 1993; 4: 1159–71.

7. Israelit A. H., Long D. L., White U. G., Hall A. R. Measurement of glomerular filtration rate utilizing a single subcutaneous injection of 125I-sodium iothalamate // Kidney Int., 1973; 4: 345–9.

8. Levey A. S. Measurement of renal function in chronic renal disease // Kidney Int., 1990; 38: 167–84.

9. Grubb A. O. Cystatin C-properties and use as diagnostic marker // Adv. Clin. Chem., 2000; 35: 63–99.

10. Laterza O., Price C., Scott M. Cystatin C: an improved estimator of glomerular filtration rate? // Clin. Chem., 2002; 48: 699–707.

11. Stevens L. A., Levey A. S. Chronic kidney disease in the elderly. How to assess risk? [Editorial] // N. Engl. J. Med., 2005; 352: 2122–4.

12. Shemesh O., Golbety H., Kriss J. P., Myers B. D. Limitations of creatinine as a filtration marker in glomerulopathic patients // Kidney Int., 1985; 28: 830–8.

13. Perrone R. D., Madias N. E., Levey A. S. Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts // Clin. Chem. 1992; 38: 1933–53.

14. Stevens L. A., Levey A. S. Clinical implications for estimating equations for GFR // Ann. Intern. Med., 2004; 141: 959–61.

15. Levey A. S., Bosch J. P., Lewis J. B., Greene T., Rogers N., Roth D., et al. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation // Ann. Intern. Med., 1999; 130: 461–70.

16. Lewis J., Agodoa L., Cheek D., Greene T., Middleton J., O'Connor D., et al. African-American Study of Hypertension and Kidney Disease. Comparison of cross-sectional renal function measurements in African Americans with hypertensive nephrosclerosis and of primary formulas to estimate glomerular filtration rate // Am. J. Kidney Dis., 2001; 38: 744–53.

17. Levey A. S., Greene T., Kusek J. W., Beck G. J., Group M. S. A simplified equation to predict glomerular filtration rate from serum creatinine [Abstract] // J. Am. Soc. Nephrol., 2000; 11: A0828.

18. Poggio E. D., Wang X., Greene T., Van Lente F., Hall P. M. Performance of the modification of diet in renal disease and Cockcroft-Gault equations in the estimation of GFR in health and in chronic kidney disease // J. Am. Soc. Nephrol., 2005; 16: 459–66.

19. Poggio E. D., Nef P. C., Wang X., Greene T., Van Lente F., Dennis V. W., et al. Performance of the Cockcroft-Gault and modification of diet in renal disease equations in estimating GFR in ill hospitalized patients // Am. J. Kidney Dis., 2005; 46: 242–52.

20. Coresh J., Astor B. C., McQuillan G., Kusek J., Greene T., Van Lente F., et al. Calibration and random variation of the serum creatinine assay as critical elements of using equations to estimate glomerular filtration rate // Am. J. Kidney Dis., 2002; 39: 920–9.

21. Murthy K., Stevens L. A., Stark P. C., Levey A. S. Variations in serum creatinine assay calibration: a practical application to glomerular filtration rate estimation // Kidney Int., 2005; 68: 1884–7.

22. Verhave J. C., Baljer'-Volkers C. P., Hillege H. L., Dezeeuw D., Dejong P. E. The reliability of different formulae to predict creatinine clearance // J. Intern. Med., 2003; 253: 563–73.

23. Schwartz G. J., Haycock G. B., Edelmann C. M. Jr, Spitzer A. A simple estimate of glomerular filtration rate in children derived from body length and plasma creatinine // Pediatrics, 1976; 58: 259–63.

24. Schwartz G. J., Feld L. G., Langford D. J. A simple estimate of glomerular filtration rate in full-term infants during the first year of life // J. Pediatr., 1984; 104: 849–54.

25. Schwartz G. J., Gauthier B. A simple estimate of glomerular filtration rate in adolescent boys // J. Pediatr., 1985; 106: 522–6.

26. Counahan R., Chantler C., Ghazali S., Kirkwood B., Rose F., Barratt T. M. Estimates of glomerular filtration rate from plasma creatinine concentration in children // Arch. Dis. Child, 1976; 51: 875–8.

27. Stevens L. A., Lafayette R. A., Perrone R. D., Levey A. S. Laboratory evaluation of renal function. In: Schrier R. W., ed. Diseases of the kidney and urinary tract, 8th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, in press.

28. Levey A. Use of glomerular filtration measurements to asses the progression of renal disease // Semin. Nephrol., 1989; 9: 370–9.

29. Davies D., Schock N. Age Changes in glomerular filtration rate, effective renal plasma flow, and tubular excretory capacity in adult males // J. Clin. Invest., 1950; 29: 496–507.

30. Gowans E. M., Fraser C. G. Biological variation of serum and urine creatinine and creatinine clearance: ramifications for interpretation of results and patient care // Ann. Clin. Biochem., 1988; 25: 259–63.

31. Eckfeldt J. H., Chambless L. E., Shen Y. L. Short-term, within-person variability in clinical chemistry test results. Experience from the Atherosclerosis Risk in Communities Study // Arch. Pathol. Lab. Med., 1994; 118: 496–500.

32. Harris E. K. Statistical principles underlying analytic goal setting in clinical chemistry // Am. J. Clin. Pathol., 1979; 374: 72–82.

33. Fraser C. G., Petersen P. H., Libeer J. C., Ricos C. Proposals for setting generally applicable quality goals solely based on biology // Ann. Clin. Biochem., 1997; 34: 8–12.

34. Kubasik N. P., Lisuzzo C. W., Same D. G., Sine H. E., D'Souza J. P. Multilayered film analysis: evaluation of ammonia and creatinine slides // Clin. Biochem., 1984; 17: 15–8.

35. DiMagno E. P., Corle D., O'Brien J. F., Masnyk I. J., Go V. L. W., Aamodt R. Effect of long-term freezer storage, thawing, and refreezing on selected constituents of serum // Mayo Clin. Proc., 1989; 64: 1226–34.

36. Zhang D. J., Elswick R. K., Miller W. G., Bailey J. L. Effect of serumclot contact time on clinical chemistry laboratory results // Clin. Chem., 1998; 44: 1325–33.

37. Jaffe M. Uber den Niederschlag welchen Pikrinsäure in normalem Harn erzeugt und ueber eine neue Reaction des Kreatinins // Z. Physiol. Chem., 1886; 10: 391–400.

38. Osberg I. M., Hammond K. B. A solution to the problem of bilirubin interference with the kinetic Jaffe' method for serum creatinine // Clin. Chem., 1978; 24: 1196–7.

39. Gerard S. K., Khayam-Bashi H. Characterization of creatinine error in ketotic patients: a prospective comparison of alkaline picrate methods with an enzymatic method // Am. J. Clin. Pathol., 1985; 84: 659–64.

40. Young D. S. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 4th ed. Washington, DC: American Association for Clinical Chemistry Press, 1995: 3-190–3-208.

41. Hortin G. L., Goolsby K., Slickers K. A., Sine H. E. Lipemia interference with a rate-blanked creatinine method // Clin. Chem., 1997; 43: 408–10.

42. Saah A. J., Koch T. R., Drusano G. L. Cefoxitin falsely elevates creatinine levels. JAMA, 1982; 247: 205–6.

43. Durham S. R., Bignell A. H. C, Wise R. Interference of cefoxitin in the creatinine estimation and its clinical relevance // J. Clin. Pathol., 1979; 32: 1148–51.

44. Cook J. H. G. Factors influencing the assay of creatinine // Ann. Clin. Biochem., 1975; 12: 219–32.

45. Christian D. G. Drug interference with laboratory blood chemistry determinations // Am. J. Clin. Pathol., 1970; 54: 118–42.

46. Knapp M. L., Hadid O. Investigations into negative interference by jaundiced plasma in kinetic Jaffe' methods for plasma creatinine determination // Ann. Clin. Biochem., 1987; 24: 85–97.

47. Schmierer D. M., Staley M. J., von Witt R. J. Interference by fluorescein with the single end-point determination of creatinine by use of the Jaffe' reaction [Letter] // Clin. Chem., 1981; 27: 1315.

48. Glick M. R., Moorehead W. R., Oei T. O., Moore G. R. Acetoacetate and "ketone" interference in kinetic and continuous-flow methods for creatinine [Letter] // Clin. Chem., 1980; 26: 1626–7.

49. Bye A. Drug interference with creatinine assay [Letter] // Clin. Chem., 1976; 22: 283–4.

50. Kulkarni S., Wilson A. P., Gruneberg R. N., Filipiak C., Samuell C. T. Interference of cefpirome with the measurement of plasma creatinine // J. Antimicrob. Chemother., 1991; 28: 617–9.

51. Kroll M. H., Koch T. R., Drusano G. L., Warren J. W. Lack of interference with creatinine assays by four cephalosporin-like antibiotics // Am. J. Clin. Pathol., 1984; 82: 214–6.

52. Guay D. R., Meatherall R. C., Macaulay P. A. Interference of selected second-and-third-generation cephalosporins with creatinine determination // Am. J. Hosp. Pharm., 1983; 40: 435–8.

53. Hyneck M. L., Berardi R. R., Johnson R. M. Interference of cephalosporins and cefoxitin with serum creatinine determination // Am. J. Hosp. Pharm., 1981; 38: 1348–52.

54. Letellier G., Desjarlais F. Analytical interference of drugs in clinical chemistry: I. Study of twenty drugs on seven different instruments // Clin. Biochem., 1985; 18: 345–51.

55. Green A. J., Halloran S. P., Mould G. P., Barbour H. M., Pritchard J. L., Hallworth M. J., et al. Interference by newer cephalosporins in current methods for measuring creatinine // Clin. Chem., 1990; 36: 2139–40.

56. Kirby M. G., Gal P., Baird H. W., Roberts B. Cefoxitin interference with serum creatinine measurement varies with the assay system [Letter] // Clin. Chem., 1982; 28: 1981.

57. Blank D. W., Nanji A. A. Ketone Interference in estimation of urinary creatinine; effect on creatinine clearance in diabetic ketoacidosis // Clin. Biochem., 1982; 15: 279–80.

58. Koumantakis G., Wyndham L. Fluorescein interference with urinary creatinine and protein measurements [Letter] // Clin. Chem., 1991; 37: 1799.

59. Murphy J. L., Hurt T. L., Griswold W. R., Peterson B. M., Rodarte A., Krous H. F., et al. Interference with creatinine concentration measurement by high dose furosemide infusion // Crit. Care Med., 1989; 17: 889–90.

60. Guix P., Parera M., Fuentespina E., Garcia A., Coll R. Study of the interference of haemolysis in the determination of creatinine in the Technicon DAX-72 (Bayer) // Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 1997; 35: 115–6.

61. Price L. A., Newman K. J., Clague A. E., Wilson P. R., Wenck D. J. Paraquat and diquat interference in the analysis of creatinine by the Jaffe' reaction // Pathology, 1995; 27: 154–6.

62. Siest G., Appel W., Blijenberg G. B., Capolaghi B., Galteau M. M., Heusghem C., et al. Drug interference in clinical chemistry: studies on ascorbic acid // J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 1978; 16: 103–10.

63. Datta P., Graham G. A., Schoen I. Interference by IgG paraproteins in the Jaffe' method for creatinine determination. Am J Clin. Pathol., 1986; 85: 463–8.

64. Jaynes P. K., Witte D. L., Simpson C. H., Feld R. D. Interference by some monoclonal IgM's in discrete serum creatinine analysis [Abstract] // Clin. Chem., 1982; 28: 1580.

65. Da Rin G., Amici G., Virga G., Bardin C., Calzavara P., Bocci C. Correction of glucose concentration interference on Jaffe' kinetic creatinine assay in peritoneal dialysis // Am. J. Nephrol., 1995; 15: 480–7.

66. Lo S. C., Tsai K. S. Glucose interference in Jaffe' creatinine method: effect of calcium from peritoneal dialysate // Clin. Chem., 1994; 40: 2326–7.

67. Gerard S., Khayam-Bashi H. Negative interference with the Ektachem (Kodak) enzymic assay for creatinine by high serum glucose [Letter] // Clin. Chem., 1984; 30: 1884.

68. Mascioli S. R., Bantle J. P., Freier E. F., Hoogwerf B. J. Artifactual elevation of serum creatinine level due to fasting // Arch. Intern. Med., 1984; 144: 1575–6.

69. Mali B., Nicholas P. C. Jaffer's reaction for creatinine: kinetic study and spectrophotometric characteristics of the product of the reactions of creatinine, acetoacetate and creatinine and acetoacetate with alkaline picrate // Biochem. Soc. Trans., 1988; 16: 549–50.

70. Cruickshank A. M., Ballantyne F. C., Shenkin A. Negative interference in a kinetic Jaffe' method for serum creatinine determination // Ann. Clin. Biochem., 1988; 25: 112–3.

71. Osselaer J. C., Lievens M. M. More on interference of bilirubin in creatinine determination by Hitachi analyzers // Clin. Chem., 1991; 37: 1460–1.

72. Dilena B. A. Bacterial interference with measurement of creatinine in stored plasma // Clin. Chem., 1988; 34: 1007–8.

73. Daugherty N. A., Hammond K. B., Osberg I. M. Bilirubin interference with the kinetic Jaffe' method for serum creatinine // Clin. Chem., 1978; 24: 392–3.

74. Boot S., LaRoche N., Legg E. F. Elimination of bilirubin interference in creatinine assays by routine techniques: comparisons with a high performance liquid chromatography method // Ann. Clin. Biochem., 1994; 31: 262–6.

75. Lolekha P. H., Jaruthunyaluck S., Srisawasdi P. Deproteinization of serum: another best approach to eliminate all forms of bilirubin interference on serum creatinine by the kinetic Jaffe' reaction // J. Clin. Lab. Anals., 2001; 15: 116–21.

76. Dick J. B., Bartlett W. A., Ibrahim U., Coleiro J. A. Interference of fluorescein with creatinine assays // Ann. Clin. Biochem., 1991; 28: 311–3.

77. Hare R. S. Endogenous creatinine in serum and urine // Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1950; 74: 148–51.

78. Fabiny D. L., Ertingshausen G. Automated reaction-rate Method for determination of serum creatinine with the Centrifichem // Clin. Chem., 1971; 17: 696–700.

79. Swain R. R., Briggs S. L. Positive interference with the Jaffe' reaction by cephalosporin antibiotics // Clin. Chem., 1977; 23: 1340–2.

80. Kroll M. H., Hagengruber C., Elin R. J. Reaction of picrate with creatinine and cepha antibiotics // Clin. Chem., 1984; 30: 1664–6.

81. Spencer K. Analytical reviews in clinical biochemistry: the estimation of creatinine // Ann. Clin. Biochem., 1986; 23: 1–25.

82. Chan M. H. M., Ng K. F., Szeto C. C., Lit L. C. W, Chow K. M., Leung C. B., et al. Effect of a compensated Jaffe creatinine method on the estimation of glomerular filtration rate // Ann. Clin. Biochem., 2004; 41: 482–4.

83. Junge W., Wilke B., Halabi A., Klein G. Determination of reference intervals for serum creatinine, creatinine excretion and creatinine clearance with an enzymatic and a modified Jaffe method // Clin. Chim. Acta, 2004; 344: 137–48.

84. Van Pilsum J. F., Martin R. P., Kito E., Hess J. Determination of creatine, creatinine, arginine, guanidinoacetic acid, guanidine and methyl guanidine in biological fluids // J. Biol. Chem., 1956; 222: 225–35.

85. Parekh A. C., Sims C. Serum creatinine assay by use of 3,5 dinitrobenzoates: a critique // Clin. Chem., 1977; 23: 2066–71.

86. Sundberg M. W., Becker R. W., Esders T. W., Figueras J., Goodhue C. T. An enzymatic creatinine assay and a direct ammonia assay in coated thin films // Clin. Chem., 1983; 29: 645–9.

87. Toffaletti J., Blosser N., Hall T., Smith S., Tompkins D. An automated dry-slide enzymatic method evaluated for measurement of creatinine in serum // Clin. Chem., 1983; 29: 684–7.

88. Tanganelli E., Prencipe L., Bassi D., Cambiaghi S., Murador E. Enzymic assay of creatinine in serum and urine with creatinine iminohydrolase and glutamate dehydrogenase // Clin. Chem., 1982; 28: 1461–4.

89. Fossati P., Prencipe L., Berti G. Enzymatic creatinine assay: a new colorimetric method based on hydrogen peroxide measurement // Clin. Chem., 1983; 29: 1494–6.

90. Mitchell R. T., Marshall L. H., Lefkowitz L. B., Stratton C. W. Falsely elevated serum creatinine levels secondary to the presence of 5-fluorocytosine // Am. J. Clin. Pathol., 1985; 84: 251–3.

91. Karon B. S., Daly T. M., Scott M. G. Mechanisms of dopamine and dobutamine interference in biochemical tests that use peroxide and peroxidase to generate chromophore // Clin. Chem., 1998; 44: 155–60.

92. Weber J. A., van Zanten A. P. Interferences in current methods for measurements of creatinine // Clin. Chem., 1991; 37: 695–700.

93. Artiss J. D., McEnroe R. J., Zak B. Bilirubin interference in a peroxidase-coupled procedure for creatinine eliminated by bilirubin oxidase // Clin. Chem., 1984; 30: 1389–92.

94. Schoenmakers C. H., Kuller T., Lindemans J., Blijenberg B. G. Automated enzymatic methods for creatinine measurement with special attention to bilirubin interference // Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 1993; 31: 861–8.

95. Eng C. D., Delgado R., Kroll M. H. Complex analyte-dependent and analyte-independent interferences with conjugated bilirubin in the enzymatic phenolaminophenazone peroxidase (pap) method for creatinine determination // Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 1993; 31: 839–50.

96. Bagnoud M. A., Reymond J. P. Interference of metamizol (dipyrone) on the determination of creatinine with the Kodak dry chemistry slide comparison with the enzymatic method from Boehringer // Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 1993; 31: 753–7.

97. Ali A. C., Mihas C. C., Campbell J. A. Interferences of O-raffinose cross-linked hemoglobin in three methods for serum creatinine // Clin. Chem., 1997; 43: 1738–43.

98. Hummel K. M., von Ahsen N., Kuhn R. B., Kaboth U., Grunewald R. W., Oellerich M., et al. Pseudohypercreatininemia due to positive interference in enzymatic creatinine measurements caused by monoclonal igm in patients with Waldenstrom's macroglobulinemia [Letter] // Nephron., 2000; 86: 188–9.

99. Brown N. D., Sing H. C., Neeley W. E., Koetitz S. E. Determination of "true" serum creatinine by high-performance liquid chromatography combined with a continuous-flow microanalyzer // Clin. Chem., 1977; 23: 1281–3.

100. Lim C. K., Richmond W., Robinson D. P., Brown S. S. Towards a definitive assay of creatinine in serum and in urine: separation by high-performance liquid chromatography // J. Chromatogr., 1978; 145: 41–9.

101. Kegedal B., Olsson B. Determination of creatinine in serum by high-performance liquid chromatography: a comparison of three ion-exchange methods // J. Chromatogr., 1990; 527: 21–30.

102. Zwang L., Blijenberg B. G. assessment of a selected method for creatinine with special emphasis on bilirubin interference // Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 1991; 29: 795–800.

103. Holmes E. W., Oeser T. H., Kahn S. E., Bekeris L., Bermes E. W. Jr. Serum creatinine determination by high performance liquid chromatography and five automated chemistry analyzers // Ann. Clin. Lab. Sci., 1983; 13: 503–10.

104. Buchanan D. N., Tait S. K., Domino E. F. High-performance liquid chromatographic assay of creatinine in human urine // J. Chromatogr., 1979; 163: 212–6.

105. Chiou W. L., Peng G. W., Gadalla M. A., Nerenberg S. T. Comparison of plasma creatinine levels in patients determined by high-pressure liquid chromatography, automated analysis, and boiling alkaline picrate method // J. Pharm. Sci., 1978; 67: 292–3.

106. Ambrose R. T., Ketchum D. F., Smith J. W. Creatinine determined by "high performance" liquid chromatography // Clin. Chem., 1983; 29: 256–9.

107. Rosano T. G., Ambrose R. T., Wu A. H., Swift T. A., Yadegari P. Candidate reference method for determining creatinine in serum: method development and interlaboratory validation // Clin. Chem., 1990; 36: 1951–5.

108. Schneiderka P., Pacakova V., Stulik K., Kloudova M., Jelinkova K. High-performance liquid chromatographic determination of creatinine in serum, and a correlation of the results with those of the Jaffe' and enzymatic methods // J. Chromatogr., 1993; 614: 221–6.

109. Scott P. H. High-performance liquid-chromatographic measurement of plasma creatinine in newborns // Clin. Chem., 1992; 38: 101–3.

110. Paroni R., Arcelloni C., Fermo I., Bonini P. A. Determination of creatinine in serum and urine by a rapid liquidchromatographic method // Clin. Chem., 1990; 36: 830–6.

111. Marsilio R., Dall'Amico R., Giorfano G., Murer L., Montini G., Ros M., et al. Rapid determination of creatinine in serum and urine by ion-pair high-performance liquid chromatography // Int. J. Clin. Lab. Res., 1999; 29: 103–9.

112. Kock R., Seitz S., Delvoux B., Greiling H. A Method for the simultaneous determination of creatinine and uric acid in serum by high-performance liquid-chromatography evaluated versus reference methods // Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 1995; 33: 23–9.

113. Puhlmann A., Dulffer T., Kobold U. Multidimensional high-performance liquid chromatography on Pinkerton ISRP and RP18 columns: direct serum injection to quantify creatinine // J. Chromatogr., 1992; 581: 129–33.

114. Spierto F. W., MacNeil M. L., Culbreth P., Duncan I., Burtis C. A. Development and validation of a liquid-chromatographic procedure for serum creatinine // Clin. Chem., 1980; 26: 286–90.

115. Soldin S. J., Hill J. G. Micromethod for determination of creatinine in biological fluids by high-performance liquid chromatography // Clin. Chem., 1978; 24: 747–50.

116. Okuda T., Oie T., Nishida M. Liquid-chromatographic measurement of creatinine in serum and urine // Clin. Chem., 1983; 29: 851–3.

117. Linnet K., Bruunshuus I. HPLC with enzymatic detection as a candidate reference method forserum creatinine // Clin. Chem., 1991; 37: 1669–75.

118. Welch M. J., Cohen A., Hertz H. S., Ng K. J., Schaffer R., Van Der Lijn P. et al. Determination of serum creatinine by isotope dilution mass spectrometry as a candidate definitive method // Anal. Chem., 1986; 58: 1681–5.

119. Stöckl D., Reinauer H. Candidate reference methods for the determination of target values for cholesterol, creatinine, uric acid and glucose in external quality assessment and internal accuracy control. I. Method setup // Clin. Chem., 1993; 39: 993–1000.

120. Siekmann L. Measurement of creatinine in human serum by isotope dilution mass spectrometry // J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 1985; 23: 137–44.

121. Stokes P., O'Connor G. Development of a liquid chromatographymass spectrometry method for the highaccuracy determination of creatinine in serum // J. Chromatogr. B., 2003; 794: 125–36.

122. Ross J. W., Miller W. G., Myers G. L., Praestgaard J. The accuracy of laboratory measurements in clinical chemistry. A study of 11 routine chemistry analytes in the College of American Pathologists Chemistry survey with fresh frozen serum, definitive methods and reference methods // Arch. Pathol. Lab. Med., 1998; 122: 587–608.

123. Miller W. G. Specimen materials, target values and commutability for external quality assessment (proficiency testing) schemes // Clin. Chim. Acta., 2003; 327: 25–37.

124. Ferrero C. A., Carobene A., Ceriotti F., Modenese A., Arcelloni C. Behavior of frozen serum pools and lyophilized sera in an external quality-assessment scheme // Clin. Chem., 1995; 41: 575–80.

125. Carobene A., Ferrero C.A., Ceriotti F., Modenese A., Besozzi M., De Giorgi E., et al. Creatinine measurement proficiency testing: assignment of matrix-adjusted ID GC-MS target values // Clin. Chem., 1997; 43: 1342–7.

126. Miller W. G., Myers G. L., Ashwood E. R., Killeen A. A., Wang E., Thienpont L. M., et al. Creatinine measurement: state of the art in accuracy and inter-laboratory harmonization. Arch Pathol Lab Med 2005; 129:297–304.

127. StoËckl D, Libeer JC, Reinauer H, Thienpont LM, De Leenheer AP. Accuracy-based assessment of proficiency testing results with serum from single donation: possibilities and limitations // Clin. Chem., 1996; 42: 469–70.

128. European Commission-Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM). Retieseweg, B-2440. Geel, Belgium: IRMM, 2003.

129. International Organization for Standardization. ISO guide 17511. In vitro diagnostic medical devices — measurement of quantities in biological samples — metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials. Geneva, Switzerland: ISO, 2003.

130. International Organization for Standardization. ISO guide 15194. In vitro diagnostic medical devices — measurement of quantiti-

es in samples of biological origin—description of reference materials. Geneva, Switzerland: ISO, 2002.

131. International Organization for Standardization. ISO guide 15193. In vitro diagnostic medical devices — measurement of quantities in samples of biological origin — presentation of reference measurement procedures. Geneva, Switzerland: ISO, 2002.

132. Clinical and Laboratory Standards Institute. Preparation and validation of commutable frozen human serum pools as secondary reference materials for cholesterol measurement procedures; approved guideline. CLSI document C37-A. Wayne, PA: CLSI, 1999.

133. Levey A.S., Coresh J., Greene T., March J., Stevens L.A., Kusek J., et al. Expressing the MDRD study equation for estimating GFR with IDMS traceable (gold standard) serum creatinine values [Abstract] // J. Am. Soc. Nephrol., 2005; in press.

134. The Australasian Creatinine Consensus Working Group. Chronic kidney disease and automatic reporting of estimated glomerular filtration rate: a position statement // Med. J. Aust., 2005; 183: 138–41.

135. Lamb E.J., Tomson C.R.V., Roderick P.J. Estimating kidney function in adults using formulae // Ann. Clin. Biochem., 2005; 42: 321–45.

136. Ricos C., Alvarez V., Cava F., Garcia-Lario J.V., Hernandez A., Jimenez C.V., et al. Current databases on biological variation: pros, cons and progress // Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1999; 59: 491–500.

***Издательско-полиграфический отдел фирмы "КОСТА" с 1993 года занимается подготовкой и изданием книг.***
*За эти годы мы приобрели большой опыт подготовки специальной и, в частности, медицинской литературы.*
*Среди подготовленных нами книг — работы в области кардиологии, неврологии, хирургии, генетики и других областях медицины.*
*Мы будем рады помочь Вам подготовить к печати юбилейный сборник, монографию, брошюру, методические рекомендации, автореферат.*
*Собственная полиграфическая база позволяет оперативно отпечатать любую полиграфическую продукцию.*
*Кроме того, наши дизайнеры разработают для Вас визитки, наклейки, рекламные листовки, обложки книг.*
*Не тратьте драгоценное время Ваших специалистов — приходите к нам.*
***Сделать Вашу рукопись книгой — наша специальность.***

# ОСОБЕННОСТИ РАЗРАБОТКИ И ВНЕДРЕНИЯ СИСТЕМЫ МЕНЕДЖМЕНТА КАЧЕСТВА В ОРГАНИЗАЦИЯХ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ

**Ю. В. ЭМАНУЭЛЬ*, А. Л. ХОТИН****

*** Кафедра клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины ГОУ ВПО СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова Росздрава**

**** Отделение Ассоциации медицинской лабораторной диагностики, консультант по системам менеджмента качества**

***Резюме.*** *Данная статья продолжает серию работ по проблемам обеспечения качества деятельности организаций здравоохранения за счет улучшения их менеджмента в соответствии с требованиями международных стандартов серии ISO. В статье проводится разъяснение отдельных требований стандарта по системам менеджмента качества ISO 9001-2000 (или в русской транскрипции — ИСО), в частности, рассматриваются требования по управлению документацией и ответственности руководства, а также определяются методологические подходы к практической разработке системы менеджмента качества (СМК).*

***Ключевые слова:*** *стандарты ISO, системы менеджмента качества, СМК, менеджмент качества в здравоохранении, ГОСТ Р ИСО 9000-2001, ГОСТ Р ИСО 9001-2001, ISO 9001-2008, политика и цели в области качества, документация СМК.*

# FEATURES OF DEVELOPMENT AND IMPLEMENTATION OF QUALITY MANAGEMENT SYSTEM IN HEALTH CARE SETTINGS

**YU. V. EMANUEL*, A. L. KHOTIN****

*** Department of Clinical Laboratory Diagnostics and Molecular Medicine, I. Pavlov St. Petersburg State Medical University, Federal Agency for Health Care and Social Development**

**** Department of Association for Medical Laboratory Diagnostics, consultant in quality assessment systems**

***Abstract.*** *Present article continues a series of publications concerning maintenance of quality in medical settings and institutions, by means of improvement of their management, in accordance with International Standards and Regulations (ISO series). The article deals with interpretations of some requirements from this Standard, i.e., ISO 9001-2000 quality management systems. In particular, we consider requirements for documentation management, and responsibility of management, as well as some methodological approaches to practical aspects of quality management system.*

***Keywords:*** *ISO standards, quality management systems, health care, ISO 9000-2001 standards, policy and aims, quality management documentation.*

**Введение**

Начало разработки СМК часто вызывает в организации определенные трудности вследствие отсутствия опыта в трактовке требований стандарта ИСО 9001-2000 и в применении их к специфике своей деятельности. Данные требования охватывают все аспекты функционирования организации, связанные с созданием продукции, а также являются универсальными для применения в организациях любого вида деятельности.

Как было показано в предыдущей публикации [1], содержание требований стандарта ИСО 9001-2000 отражает интересы не только поставщика продукции, но потребителя, с целью обеспечения этим взаимодействующим субъектам обоюдной для них выгоды. И только в таком диалектическом единстве представляется возможным создать оптимальный менеджмент в организации-поставщике продукции. Нужно заметить, что такое диалектическое единство не является чем-то искусственно созданным — оно непосредственно следует из объективно существующих законов конкурентной рыночной борьбы. И в этом смысле стандарт ИСО 9001-2000* лишь тезисно обозначил эти законы. Поэтому такое понимание стандарта должно быть основополагающим для разработки СМК.

* *Примечание*. В конце 2008 года международная организация по стандартизации ввела в действие новую версию стандарта — ИСО 9001-2008, официально за-

явив, что данная версия стандарта не устанавливает новых требований, а только содержит пояснения к существующим требованиям стандарта ИСО 9001-2000, основанные на 8-ми годах применения стандарта по всему миру. И действительно, текст нового стандарта практически не изменился, более того — сохранены нумерация пунктов и содержание соответствующих им требований. Кроме того, введен двухлетний период для перехода на новый стандарт. Поэтому в дальнейшем в наших публикациях мы пока сохраним ссылки на стандарт ИСО 9001-2000 (принятый в России как ГОСТ Р ИСО 9001-2000) [2] — как наиболее известный нашим читателям и актуальный.

Основное требование стандарта о «процессном подходе» к анализу деятельности организации было уже рассмотрено в предыдущей работе [1]. Далее, при анализе других требований стандарта можно будет заметить, что все они органически связаны с «процессным подходом», обеспечивая нормальное функционирование установленных в организации процессов и контроль за ними. Данное замечание является особенно важным, поскольку иногда при реализации менеджмента качества возникает желание «обойти» некоторые требования стандарта, которые представляются, на первый взгляд, «несущественными» в практической деятельности. Однако в этом случае неизбежно пострадает вся функциональная модель взаимосвязанной системы процессов, и при анализе эффективности и результативности процессов обнаружится отсутствие некоторых элементов, что может привести к наличию отдельных неконтролируемых областей в производственной деятельности. Поэтому все требования стандарта должны выполняться, поскольку их частичное выполнение может оказаться малоэффективным.

Для создания СМК и удовлетворения всем требованиям стандарта ИСО 9001-2000 нужно прежде всего разработать документацию СМК, в которой были бы отражены все аспекты деятельности по созданию продукции. Как правило, в любой организации применяется совокупность самых различных документов: инструктивных, методических, регламентирующих, управляющих. Независимо от назначения и категории данных документов, а также от их происхождения (внутренние или внешние документы), все они должны быть объединены в целостную систему и охвачены единым управлением. Только в этом случае удается избежать «хаоса» в учете и применении документов.

Согласно стандарту ИСО 9001-2000 в любой организации должны быть следующие категории документов:

- документированные положения политики и целей в области качества;
- руководство по качеству;
- документированные процедуры и записи;
- документы и записи, необходимые для эффективного планирования, управления и контроля своих процессов.

Далее мы рассмотрим основное назначение данных документов, их содержание, а также методологические подходы к их разработке.

**1. Политика и цели в области качества**

Разработка документированных положений о политике и целях в области качества — это именно то, с чего должна начинаться в организации разработка СМК. Обычно в организациях, где отсутствует СМК, также отсутствуют и какие-либо документы по политике и целям в области качества. На замечания по этому поводу руководство таких организаций обычно отвечает, что основные положения по этим проблемам записаны у них в уставных документах или в «миссии организации». Более того, даже разрабатывая и внедряя СМК, некоторые руководители как бы «снисходительно» относятся к написанию данных документов СМК, усматривая в этом некое формальное требование. При этом данные руководители полагают, что основой эффективной СМК является «раздача полномочий персоналу и написание для него оптимальных должностных инструкций». Именно такой подход всегда и существовал, когда кого-то назначали ответственным должностным лицом, полагая при этом, что «обладая необходимой компетентностью, остальные производственные мелочи он решит сам». Однако такой подход является ошибочным, поскольку никакие полномочия персонала, как и никакие процессы, не могут появиться без предварительной и тщательной разработки стратегии, увязывающей все аспекты деятельности.

Действительно, в документах по политике и целям в области качества приведена стратегия организации, которая определяет, в том числе, стратегию и тактику разработки, внедрения и дальнейшего развития СМК. По существу, все дальнейшие предпринимаемые действия в области качества должны быть в полном соответствии с этими документами. В свою очередь, основой для разработки политики и целей в области качества являются маркетинговые исследования. Учитывая, что многие организации здравоохранения не имеют опыта проведения работ по маркетингу, можно понять и возникающие у них определенные трудности при создании СМК, поскольку лишь ориентированность на рынок и конкурентную борьбу стимулирует поиск улучшений деятельности и повышение качества продукции. Можно предположить, что преодолению такой сложившейся ситуации будут способствовать новые программы и задачи развития отечественного здравоохранения, в частности, совершенствование системы страховой медицины, увеличение полномочий руководства государственных медицинских учреждений и другие. При этом важно, чтобы любая организация здравоохранения, кроме заботы о профессио-

нальной деятельности, рассматривала бы себя также и субъектом рыночной деятельности, поскольку конечный выбор остается за пациентами (потребителями).

Как соотносятся политика и цели? На основе маркетинговых исследований организация устанавливает цели в области качества и начинает реализовывать соответствующую политику для достижения этих целей. После достижения поставленных целей устанавливаются новые. В отдельных случаях может изменяться политика, если она недостаточно эффективна.

Какими могут быть, например, цели и политика в области качества в организациях здравоохранения?

Во-первых, как политика, так и цели должны быть абсолютно конкретными, так как в противном случае они будут просто бесполезными. Действительно, очень часто почему-то считается даже «высоким профессионализмом» разрабатывать некие универсальные управляющие документы, в которых всё изложено только в общем и неконкретном виде. Например, таким образом: «...предприятие должно выпускать продукцию высокого качества, отвечающую требованиям потребителей, и при этом быть рентабельным...», или: «...лаборатория должна обеспечивать увеличение номенклатуры и качества выполняемых медицинских анализов...», или: «поликлиника должна повышать качество обслуживания пациентов и профилактики заболеваний». Однако при этом возникает множество вопросов: каким образом на основе такого «лозунга» создавать систему менеджмента качества в организации? Номенклатуру каких групп проводимых медицинских анализов предполагается увеличить? За счет чего предполагается повысить качество обслуживания пациентов? И так далее. На практике это приводит к отсутствию единого системного подхода к управлению организацией, поскольку нет конкретных целей, а значит нет и конкретных планов по их достижению.

Руководители таких организаций, не желая осуществлять тщательное стратегическое планирование по всем аспектам деятельности (и прежде всего — связанным с созданием продукции), а также ошибочно полагая, что «универсальные документы» обеспечат им гибкость в управлении, на самом деле становятся заложниками быстро изменяющейся внутренней и внешней ситуации, что приводит к постоянным стрессам и авралам в управлении.

С другой стороны, отсутствие конкретности в стратегических документах при разработке СМК приводит к «разнородности» и некоторых других категорий документов СМК, которые создаются уже на их основе. Поэтому стандарт ИСО 9001-2000 как раз и требует оценки выполнения поставленных целей (п. 5.4.1 стандарта).

Рассмотрим некоторые примеры возможных целей в области качества, а также проводимых стратегических мероприятий (политики по качеству).

*Цели в области качества:*

1) Обеспечить до конца текущего года снижение на 10% времени обслуживания пациентов при сохранении качества медицинского обслуживания за счет совершенствования системы заполнения и регистрационного учета медицинских документов.

2) До конца следующего года разработать «паспорт здоровья» и методику его ведения.

3) До конца текущего года внедрить штрих-кодовую систему идентификации материалов, рабочей и нормативной документации.

4) Разработать и предоставить населению в следующем году не менее 3-х комплексных пакетов услуг по профилактическому обследованию.

*Политика в области качества:*

1) Внедрение в практическую деятельность систем и средств вычислительной техники и информационных технологий.

2) Систематическое проведение научных исследований и поисковых работ, изучение опыта применения новых технологий в практике медицинской лабораторной диагностики.

3) Организация стимулирования авторской и изобретательской работы.

4) Организация постоянного контроля за вновь введенными технологическими процессами.

5) Организация систематического повышения квалификационного уровня медицинского персонала, связанного с обслуживанием пациентов и проведением медицинских исследований.

Как можно заметить, указанные цели являются абсолютно конкретными, их результативность можно измерить и оценить. Аналогичным образом, все проводимые стратегические мероприятия (политика) могут быть разделены на ряд более мелких мероприятий, запланированы, а затем их выполнение должно быть проконтролировано. Сопоставление результатов достижения поставленных целей и реализации проводимой политики создает основу для оценки политики и проведения в необходимых случаях её коррекции.

Главное, что данные цели возникли не случайно, а в результате предварительных маркетинговых исследований, согласно которым достижение каждой из этих целей действительно принесет конкретные выгоды для организации (но не явится просто отчетом для вышестоящей инстанции о проведении каких-то инноваций, которые, кстати, в действительности могут принести убытки).

**2. Руководство по качеству**

Руководство по качеству — это тот документ, где система менеджмента качества рассматривается именно как «единая система» по всем без исключения элементам и взаимодействиям. При этом в руководстве по качеству обязательно должны быть приведены все процессы (или

даны ссылки на другие документы, в которых они рассматриваются), а также показано взаимодействие между процессами. Руководство по качеству предназначено как для внутреннего, так и для внешнего пользования. Обычно активными внутренними пользователями этого документа в своей деятельности являются руководители различных уровней, которые разрабатывают систему менеджмента качества и контролируют её функционирование.

Внешним пользователем руководства по качеству может выступать любой субъект рыночных отношений, заинтересованный в какой-либо совместной деятельности с организацией и желающий быть при этом уверенным в надежности организации, а также желающий ознакомиться с реализацией каких-либо конкретных элементов будущей совместной работы — для принятия окончательного решения о возможности такой совместной деятельности.

*Примечание*. Иногда возникает вопрос: а не раскрывается ли при этом в руководстве по качеству некая конфиденциальная информация о деятельности организации (по стратегии, экономике, любым другим аспектам работы или по конкретным элементам), которая таким образом становится доступной посторонним лицам?

Однако не следует беспокоиться, поскольку, как правило, конфиденциальная информация может содержаться в документах более низкого уровня: инструкциях, методических указаниях, рабочих и иных документах. И, при необходимости, в руководстве по качеству могут быть приведены лишь ссылки на такие документы, которые, однако, не дадут внешнему пользователю никакой конкретной информации. Кроме того, таких ссылок вообще может и не быть. А допуск к конфиденциальной информации в организации, как известно, будет иметь только ограниченный круг лиц, определяемый руководителем организации.

Руководство по качеству должно быть предельно «прозрачным» для управляющего персонала организации (как, впрочем, и другие документы СМК), поскольку только в этом случае можно будет полностью увидеть, контролировать и управлять деятельностью организации. Вообще, для руководителя любого ранга не должно быть никаких «темных пятен» по тем аспектам деятельности, за которую он несет ответственность. Однако в тех случаях, когда производственная деятельность подробно не регламентирована и не задокументирована, часто возникает ситуация, при которой подчиненный персонал недостаточно информирует руководителя о порядке проведения своей деятельности, ограничиваясь лишь общими отчетами. Конечно, в отдельных случаях это и допустимо, но как же руководитель при этом (в отсутствие достаточного объема информации) может оценивать фактические действия подчиненного, а тем более, корректировать его деятельность с целью ее улучшения?

При ознакомлении с руководством по качеству пользователь должен иметь возможность проследить реализацию всех аспектов деятельности организации и, при необходимости, получить ссылки на другие документы, в которых более подробно рассматривается конкретный аспект. В свою очередь, каждый ссылочный документ, рассматривающий конкретный аспект, может также иметь ссылки и на другие документы, и т. д. Таким образом создается «дерево» документов СМК. При этом, некоторые вопросы СМК могут быть рассмотрены подробно непосредственно в руководстве по качеству, без ссылок на другие нормативные документы.

Обычно разработку руководства по качеству производят уже после разработки всех остальных документов СМК, когда последняя уже создана и требуется лишь её системное описание.

*Примечание*. Как известно, все аккредитованные медицинские лаборатории имеют руководство по качеству — как один из основных нормативных документов, в котором обычно регламентирована вся производственная деятельность лаборатории за исключением регламентов по выполнению отдельных профессиональных действий, изложенных в методических и инструктивных материалах. Однако данный документ является руководством только по «качеству», а не по «системе менеджмента качества», вследствие чего он не отвечает всем требованиям стандарта ИСО 9001-2000. Поэтому аккредитованным лабораториям также целесообразно разрабатывать и внедрять СМК для успешной работы в условиях конкуренции.

### 3. Документированные процедуры

Как ранее отмечалось [1], документированные процедуры должны содержать описание конкретных процессов. Однако не следует отождествлять документированную процедуру (конкретный процесс) с рабочими инструкциями по выполнению процесса, которые, естественно, имеются в любой организации здравоохранения. Данные рабочие инструкции содержат лишь профессиональные сведения по выполнению процесса или каких-либо отдельных его операций.

Документированная процедура — это прежде всего организационный документ, который, в том числе, содержит ссылки и на конкретные рабочие инструкции. Но главным содержанием документированной процедуры является описание всех элементов конкретного процесса (рабочего персонала, документов, материалов и иных ресурсов, средств контроля и мониторинга и др.) и порядка их взаимодействия между собой, а также взаимодействия с элементами других процессов. Таким образом, документированная процедура направлена прежде всего на обеспечение надлежащего менеджмента в организации.

В работе [1] уже приводились примеры типовых процессов, число которых в каждой организации (даже

одного вида деятельности) может быть различным и определяется способами, которые организация установила для создания продукции. В свою очередь, каждый из процессов может быть разделен на ряд подпроцессов (операций) в зависимости от установленного распределения ответственности персонала. И здесь возникает очень важная проблема: как идентифицировать длительность процесса, т.е. — с чего процесс начинается и чем заканчивается (границы процесса).

Из опыта разработки и внедрения СМК известно, что укрупнение процессов может приводить к «размыванию» ответственности и снижению контроля за реализацией процесса (когда, например, один человек несет ответственность «за всё»), что также может уменьшать и эффективность корректировки процесса (при необходимости).

Однако чрезмерное дробление процесса на ряд более мелких приводит к увеличению числа нормативных документов, хотя и обеспечивает гибкость в управлении.

Рассмотрим примеры по определению границ процесса.

1) Процесс «Проведение анализа крови» включает в себя 3 основные профессиональные действия: подготовку оборудования, забор крови и исследование пробы. Осуществляться данный процесс может как в небольшой лаборатории, где работает всего несколько человек, выполняющих все указанные действия, так и в большой лаборатории, в которой реализация указанных действий производится специализированными группами персонала. Кроме того, например, подготовка оборудования специализированным персоналом может выполняться не только для нужд данной большой лаборатории, но и в интересах других лабораторий, а, например, исследование проб крови может производиться специализированным персоналом, обслуживающим несколько пунктов забора крови.

Итак, можно видеть, что одна и та же совокупность действий по «Проведению анализа крови» может выполняться в различных ситуациях. Но при этом важным является следующее: каким бы образом ни была представлена система процессов (в виде одного большого процесса, объединяющего все три указанных действия, или трех отдельных маленьких процессов, каждый из которых соответствует только одному действию), объем выполнения профессиональных действий в обоих рассмотренных случаях остается неизменным (всего три действия, которые выполняются в соответствии с точно установленными методиками).

На первый взгляд может показаться, что такие «манипуляции» с возможностью различного представления процессов являются несущественными. Однако, кроме профессиональных действий, имеется ещё значительное число других вспомогательных действий:

- планирование каждого процесса;
- контроль выполнения каждого процесса;
- дальнейшее распределение результатов выполнения каждого процесса;
- взаимодействие между процессами;
- составление отчетов о выполнении каждого процесса;
- проведение анализа и оценки качества каждого процесса.

И поэтому один из основных вопросов менеджмента заключается в том, каким образом наиболее эффективно управлять этой деятельностью, в которой участвует большое число субъектов и объектов? Каким образом сгруппировать отдельные действия в систему процессов, чтобы уменьшить затраты на всю совокупность указанных выше вспомогательных действий (которые требуют значительных ресурсов), но при этом не снизить качества? Кроме того, следует ещё учесть, что каждый процесс требует разработки отдельной документированной процедуры. Но в том случае, если ряд действий сгруппирован в единый процесс, разрабатывается только одна документированная процедура для этого процесса.

Из вышесказанного следует, что при неоптимальном представлении системы процессов могут возникнуть следующие трудности. В случае разработки единого большого процесса документированная процедура может оказаться слишком громоздкой, что затруднит как её изучение, так и выполнение. В противоположном случае, когда каждое действие будет представлено в виде отдельного процесса и для каждого из них будет разработана документированная процедура, необходимо будет выполнять большой объем вспомогательных действий, что в некоторых случаях может быть абсолютно неоправдано и приведет к излишним расходам.

Возвращаясь к нашему примеру процесса по «Проведению анализа крови», для маленькой лаборатории наиболее оптимально будет представить все действия в виде единого процесса. Действительно, здесь все профессиональные и вспомогательные действия выполняются одним персоналом, что позволит снизить уровень затрат на вспомогательные действия, но при этом и не ухудшить управляемость всего процесса.

В случае большой лаборатории, где (как было указано) каждая из специализированных групп может взаимодействовать с другими специализированными группами, которые, в свою очередь, могут участвовать и в других процессах, целесообразно каждое действие представить отдельным процессом. Действительно, в данном случае (по сравнению с маленькой лабораторией) будут отличаться следующие элементы:

- планирование работ каждой группы специализированного персонала будет различным;
- взаимодействие между специализированными группами будет различным;
- возможно, и административное подчинение каждой специализированной группы будет отличаться;

— распределение результатов выполнения работ каждой специализированной группой может быть различным.

Если же здесь попытаться представить все действия в виде одного процесса, то это приведет к существенному усложнению самой процедуры, поскольку необходимо будет учесть всевозможные варианты взаимодействия специализированных групп персонала. Также существенно усложнится и планирование работ в рамках одной процедуры, а следовательно — снизится управляемость процедурой, что практически всегда приводит к снижению качества продукции и дополнительным издержкам.

2) Рассмотрим другой пример — процесс «Обслуживание пациента в поликлинике». Во-первых, начало и окончание процесса может совпадать с приходом и уходом из поликлиники. Во-вторых, находясь в поликлинике, пациент может быть на приеме у нескольких врачей или пройти ещё обследование, сдать анализы, пройти процедуру и т. д. Причем порядок приема у каждого из врачей может отличаться. Кроме того, кое-где необходимо пройти предварительную регистрацию, произвести оплату услуг. Иногда перед приемом врача средний медицинский персонал измеряет некоторые медицинские показатели: температуру, артериальное давление.

Анализ указанных действий показывает:

— последовательность выполнения действий не является определенной (пациент может в любой последовательности получать различные услуги);
— каждое действие выполняется различным специализированным персоналом, имеющим к тому же и разное административное подчинение.

Поэтому целесообразно в данном случае каждое действие представить в виде отдельного процесса. При этом возможна унификация похожих процессов (например, процедур приема у некоторых врачей).

3) Рассмотрим ещё один пример — процесс «Обслуживание пациента в стационаре». Здесь в чем-то совокупность действий является похожей на «Обслуживание пацинета в поликлинике». Однако имеется существенное отличие: от момента поступления в приемный покой и до выписки пациент находится под постоянным контролем, и во многом последовательность действий по предоставлению ему услуг является постоянной. Поэтому целесообразно такую совокупность действий представить как единый процесс, состоящий из следующих действий: прием–обследование–лечение–выписка. Это позволит осуществлять постоянный контроль за пациентом. В свою очередь, например, различные обследования отличаются друг от друга и проводятся, как правило, в специализированных подразделениях, а иногда и в других организациях. Поэтому каждое из них может быть представлено отдельным процессом.

Естественно, что для каждого стационара (учитывая его специфику) оптимальная система процессов будет отличаться. Это может зависеть от большого числа различных факторов: лечебного профиля, номенклатуры предоставляемых услуг, среднего числа обслуживаемых пациентов, имеющихся технических средств и инфраструктуры и т. д. Поэтому в каждом конкретном случае необходимо анализировать процессы и производить экономические расчеты. Но при этом также следует помнить, что любая оптимизация ни в коей мере не должна производиться в ущерб установленному уровню качества и интересам пациентов.

**4. Другие категории документов**

К данным документам могут относиться:

— методики выполнения работ в области профессиональной деятельности: исследований, обследований, диагностики, процедур, лечения, обучения;
— инструкции для персонала по выполнению вспомогательных работ, соблюдению правил, установленных органами госнадзора (техника безопасности, пожарная безопасность и т. д.);
— руководящие и распорядительные документы;
— положения о подразделениях и службах организации;
— должностные инструкции;
— документы по планированию;
— различные виды внешних документов, применяемых в организации;
— документы по взаимодействию с различными субъектами рыночной деятельности;
— инструкции и правила, разрабатываемые для потребителей (пациентов);
— различные виды записей и другие документы.

Следует заметить, что практически все указанные категории документов имеют отношение к процессам по созданию продукции, а значит — и отношение к её качеству. Поэтому стандарт ИСО 9001-2000 обязывает иметь процедуру по управлению документацией, а также устанавливает определенные требования к нему.

1) Важным требованием является обеспечение актуальности документации. Действительно, нередки случаи применения уже вышедших из официального использования методик и инструкций. Поэтому организация обязана отслеживать любые изменения применяемых документов.

2) Организация должна применять только утвержденные документы. При этом применяемые документы могут быть как внешнего происхождения, так и внутреннего. Как правило, внешние нормативные документы утверждены Минздравом или соответствующими его комитетами, комиссиями или иными ведомствами.

Но организация может также сама разрабатывать нормативные документы. Как правило, такие документы

касаются прежде всего менеджмента в организации. Кроме того, организация может разрабатывать и создавать собственные методики по выполнению профессиональной деятельности. И в этом смысле она является автором данных нормативных документов, которые могут уже применяться и в других учреждениях. Однако данные документы, в соответствии с установленным порядком, должны быть предварительно одобрены и утверждены. Поэтому для внутренних нормативных документов организации должен быть разработан свой порядок утверждения данных документов, их пересмотра и актуализации.

3) Особое внимание уделяется порядку обращения документов: простоте идентификации, контролю передачи и распространения документов, предотвращению использования устаревших документов.

Указанные требования являются, по существу, простыми и легко реализуемыми, однако они часто нарушаются, что иногда приводит к негативным последствиям.

Важным обстоятельством при создании СМК является определение достаточности нормативных документов, регламентирующих выполнение работ. Обычно в несертифицированных организациях ограничиваются применением только утвержденных нормативных методик и инструкций в области профессиональной деятельности, в то время как другие документы отсутствуют. Вместо этого имеются какие-либо устные назначения или договоренности по разграничению обязанностей и порядку выполнения работ. В крайнем случае — издается некое указание. Вследствие этого возникает неопределенность при выполнении ряда работ, а также при осуществлении взаимодействия между различными операциями и процессами. В полной мере это проявляется в случае, например, временного отсутствия ранее назначенного исполнителя работ, когда его дело поручается новому работнику, который не всегда четко знает: что и в какой последовательности нужно делать. Это очень часто встречающаяся ситуация, и именно здесь заканчивается качество работы. Поэтому при разработке СМК необходимо, чтобы абсолютно все мельчайшие процессы и операции были регламентированы, были указаны их взаимосвязь, порядок передачи результатов работы, требуемые условия (квалификация исполнителей, ресурсы), возможные ограничения и особенности и многое другое. Только в этом случае может быть обеспечено качество работ (в нашем случае, например, услуг по лечению или проведению медицинских исследований) вне зависимости от каких-либо внешних воздействий, которые могут дестабилизировать сложившуюся и привычную ситуацию.

При создании документов СМК следует обратить внимание на то, чтобы содержание одних документов согласовывалось с другими и не противоречило им. Такое противоречие можно часто наблюдать, например, между должностной инструкцией работника и документированной процедурой или иным нормативным документом, устанавливающим полномочия работника. Поскольку обеспечить согласованность таких разных документов без разработки СМК очень трудно, руководители отдельных организаций, как правило, составляют должностные инструкции для работников в общем и неконкретном виде, что делает эти документы практически бесполезными. Но в то же время, значительное число вопросов по деятельности работника оказывается неурегулированным, что неизбежно сказывается на качестве продукции.

**5. Записи**

Записи представляют собой особый вид документов. Их основное назначение — регистрация выполнения процессов. Объем производимых записей устанавливается с учетом необходимости получения полного объема информации для целей контроля, а также для использования этой информации при реализации других процессов. Более того, записи — это объективные доказательства выполнения каких-либо действий, а значит, они имеют ещё и юридическое значение. В связи с этим можно напомнить, что в зарубежной практике документы по качеству часто присутствуют при каких-либо судебных разбирательствах. В этом смысле хорошо разработанные документы СМК и выполненные записи могут служить для защиты интересов организации.

В самой организации записи служат для анализа деятельности и реализации мероприятий по её улучшению. В связи с этим уместно напомнить рассмотренный нами [1] один из восьми принципов менеджмента качества — «принятие решений, основанное на фактах». Именно произведенные записи и предоставляют нам такие факты.

Для того, чтобы записи действительно выполняли указанные выше функции, стандарт ИСО 9001-2000 требует разработать процедуру по управлению записями, в которой должен быть установлен порядок идентификации, хранения, защиты, восстановления и уничтожения записей, а также установлен срок хранения записей. Кроме того, записи должны быть однозначно читаемыми и воспроизводимыми, исключающими какие-либо помарки, и должны поддерживаться в рабочем состоянии.

В действительности, не везде в полной мере выполняются данные требования и имеются разработанные документированные правила по управлению записями. Достаточно вспомнить рабочие места некоторых сотрудников, на которых находится большое число разных бумаг с записями, произведенными случайным образом. А как в некоторых случаях осуществляется хранение стандартных регистрационных записей: больничных карт, справок, результатов анализов? Наверняка при посещении медицинских учреждений кому-то приходи-

лось сталкиваться с недоразумениями, связанными с медицинскими документами.

При этом также иногда можно слышать одно устойчивое высказывание: «У нас все всё знают — кому, что и как нужно делать, а потому нет необходимости выполнения каких-либо регистрационных записей». К сожалению, это является заблуждением, поскольку любая, даже самая совершенная память может давать сбои. Но здесь важно понимать другое — согласно стандартам ИСО необходимо производить документирование фактов. Устно — ничто не действует и в расчет не принимается.

Известно, что в медицинских организациях выполняется большой объем записей, однако большинство из них касается только профессиональной деятельности (амбулаторные карты, результаты анализов, рецепты и назначения, справки), а регистрационных записей по менеджменту недостаточно. Обычно записи выполняются в специально установленных формах: бланках, таблицах, журналах. Как правило, формы бланков для записей должны разрабатываться при разработке соответствующих документированных процедур, после чего они должны утверждаться.

### 6. Общие замечания по управлению документацией

Итак, из рассмотрения требований стандарта ИСО 9001-2000 следует, что необходимо управлять очень большим числом документов и записей. В крупных организациях этим занимаются специальные подразделения, в небольших — назначаются ответственные должностные лица. Но в любом случае — это большой объем работ по организации документооборота.

Согласно требованиям стандарта, документация может храниться на носителях любого типа: бумажных, магнитных и иных. Конечно, можно ожидать, что широкое внедрение средств вычислительной техники и оргтехники безусловно даст определенные преимущества при внедрении документооборота. Но при этом также возникнут и новые проблемы, которых не было при управлении документами и записями на бумажных носителях. Например, электронный документооборот по своей структуре является более сложным, чем документооборот на бумажных носителях, и для его практической реализации потребуется дополнительная разработка регламентирующих нормативных документов. Также для избежания ошибок потребуется дополнительное обучение персонала. Кроме того, необходимо учесть, что некоторые применяемые документы могут существовать только на бумажных носителях, например: юридические документы, некоторые внешние документы, записи, выполняемые вне учреждения, документы, передаваемые пациенту и т. д. Поэтому наиболее оптимальным будет сочетание документооборота на бумажных носителях с электронным документооборотом, вид которого будет зависеть от технических возможностей и подготовки персонала.

При разработке системы документооборота следует помнить, что документооборот является таким же элементом СМК и также может влиять на качество продукции. Кроме того, при проведении сертификации вопросы управления документацией подвергаются самой серьезной проверке.

### 7. Ответственность руководства

В стандарте ИСО 9001-2000 устанавливаются требования по ответственности руководства организации за разработку и внедрение СМК (п. 5 стандарта). Рассмотрим, в чем именно заключается эта ответственность?

Как известно, любой руководитель организации несет полную ответственность за всё, что происходит в организации. Но поскольку сам руководитель не может выполнять все производственные функции, то он назначает ответственных должностных лиц по управлению определенным видом деятельности, а его деятельность в таком случае может ограничиться контролем этих должностных лиц, получением от них отчетов, постановкой для них задач. При этом объем и содержание взаимодействия руководителя организации с подчиненными по любым вопросам может быть абсолютно разным.

Однако в случае разработки и внедрения СМК стандарт ИСО 9001-2000 требует, чтобы руководитель организации сам непосредственно возглавлял работы по созданию и функционированию СМК. Кроме того, должен быть назначен представитель руководства, для которого устанавливаются полномочия по оперативному управлению СМК и отчетности высшему руководству. На основании предоставляемых отчетов производится анализ СМК со стороны руководства и принимаются управляющие решения.

Более того, должна быть установлена периодичность анализа СМК со стороны руководства, а также стандартом определен перечень входных и выходных данных для проведения такого анализа. И это является главным отличием метода управления созданием и функционированием СМК от методов управления другими элементами производственной деятельности, а именно — управление СМК осуществляется строго в соответствии с установленными правилами. При этом входные данные представляют собой информацию по результатам выполнения всех процессов и проведения различных контрольных проверок СМК, информацию от потребителей, а также предложения по улучшению СМК. Выходные данные представляют собой ответные решения, направленные на повышение результативности СМК, совершенствование продукции и обеспечение ресурсами.

Также для высшего руководства организации установлены следующие требования:

- ориентация деятельности организации на потребителей;

— разработка политики и целей в области качества;
— планирование деятельности в области качества;
— установление в организации ответственности и полномочий для всех категорий персонала;
— установление в организации процессов связи для информирования руководства и персонала по результативности СМК.

Ещё раз подчеркнем, что это очень жесткие правила, обязывающее руководителя организации постоянно лично заниматься вопросами качества, учитывая при этом интересы и организации, и потребителей.

Как известно, руководители организаций здравоохранения несут очень высокую ответственность, поскольку работа сопряжена с обеспечением здоровья людей. Поэтому можно ожидать, что принятие данными руководителями дополнительных обязанностей по управлению СМК не вызовет абсолютно никаких трудностей.

**Заключение**

Анализ рассмотренных требований стандарта ИСО 9001-2000 показывает, что эффективность деятельности организаций здравоохранения в определенной степени зависит от менеджмента качества, включающего в себя все вопросы по обеспечению и координации многочисленных процессов. При этом только сочетание профессионального мастерства и менеджмента качества может дать организации конкурентные преимущества и явиться стимулом для её дальнейшего развития.

В следующих статьях по проблемам качества мы продолжим рассмотрение требований стандарта ИСО 9001-2000 (ИСО 9001-2008), а также применения их в практической деятельности организаций здравоохранения.

1. Эмануэль Ю. В., Хотин А. Л. Применение системы менеджмента качества в организациях здравоохранения // Клинико-лабораторный консилиум, 2009. — № 2 (27). — С. 4–13.

2. ГОСТ Р ИСО 9001-2001. Системы менеджмента качества. Требования.

КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЙ КОНСИЛИУМ

**ПО ВОПРОСАМ СОТРУДНИЧЕСТВА И РАЗМЕЩЕНИЯ РЕКЛАМЫ**

в научно-практическом журнале «Клинико-лабораторный консилиум» просим обращаться в редакцию:

**Эмануэль Владимир Леонидович**
e-mail: **vladimirem1@gmail.com**
моб. тел. **8 (901) 306-70-03**

**Чередниченко Денис Владимирович**
e-mail: **cheredni1@gmail.com**
тел./факс **(812) 233-97-26**

# ФЛЕБОТОМИЯ КАК ВАЖНАЯ СОСТАВЛЯЮЩАЯ КАЧЕСТВА ПРЕАНАЛИТИЧЕСКОГО ЭТАПА ЛАБОРАТОРНОГО ПРОЦЕССА

**С. Н. КОВАЛЕВСКАЯ, Л. А. ХОРОВСКАЯ, Н. Г. ПЕТРОВА**
**Кафедра клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины, кафедра общественного здоровья и здравоохранения СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова**

***Резюме.*** *Как известно, результаты лабораторных исследований напрямую влияют на диагностический и лечебный процессы. Качество результата зависит не только от наличия современного лабораторного оборудования и хорошо обученного лабораторного персонала, но и от факторов, не контролируемых лабораторией, которые возникают на преаналитическом этапе и составляют около 70% ошибок, возникающих в процессе лабораторных исследований. Одним из самых важных факторов является флеботомия — взятие крови из вены. Значение флеботомии до сих пор остается недооцененным. Неправильная идентификация пациента, неправильная техника взятия крови, неправильно выбранное оборудование приводят к изменению многих лабораторных показателей. Поэтому стандартизация преаналитического этапа, постоянный контроль за работой медицинского персонала при процедуре проведения флеботомии, проведение тренингов и написание рабочих инструкций, а также сертификация медицинских сестер повышают качество результатов лабораторного исследования и напрямую влияют на эффективность работы всего медицинского учреждения.*

***Ключевые слова:*** *флеботомия, преаналитический этап, вакуумные пробирки, вариация, лаборатория.*

# PHLEBOTOMY — A SIGNIFICANT ELEMENT OF PREANALYTICAL STAGE OF LABORATORY PROCESS

**S. N. KOVALEVSKAYA, L. A. KHOROVSKAYA, N. G. PETROVA**
**Pavlov State Medical University, St.-Petersburg, Russia**

***Summary.*** *It is well-known that the results of laboratory testing directly influence to medical diagnosis and patient treatment. The quality of the results depends not only on modern laboratory equipment and well-trained laboratory staff. 70% of the errors in laboratory testing belong to preanalytical stage of laboratory process. Phlebotomy — blood evacuation — is one of the major concerns. Inappropriate patient's identification, the wrong technique of blood collection, inadequate equipment can cause blood cells damage and change test results. So, the standartization of preanalytical phase, constant control over phlebotomy by laboratory staff and clinic administration, training and operative guidelines, certification of nurses increase the quality of laboratory testing and strongly influence effectiveness of hospitals.*

***Key words:*** *phlebotomy, preanalytical stage, vacuum tubes, variation, laboratory.*

Лабораторные исследования являются важной составляющей лечебно-диагностического процесса, и их результаты непосредственно влияют на врачебную тактику в различных учреждениях здравоохранения. Как известно, лабораторный процесс состоит из 3 основных этапов: преаналитического, аналитического и постаналитического [1]. Первый и третий этапы не связаны с процессом измерения, и их называют экстрааналитической фазой лабораторного процесса. Практический врач и пациент взаимодействуют с лабораторной службой в основном при назначении лабораторных исследований и сборе биоматериала, что составляет преаналитический этап, а также при получении результатов лабораторных исследований с последующей их интерпретацией клиницистом на постаналитическом этапе.

Вся предыдущая история улучшения качества лабораторной диагностики в основном связана с аналитической фазой. В настоящее время в области аналитического качества достигнут существенный прогресс благодаря автоматизации лабораторий, и постепенно накапливаются доказательства, что дальнейшее улучшение качества лабораторных исследований должно быть направлено на экстрааналитические фазы лабораторных исследований. Известно, что ошибки, сделанные на преаналитическом этапе, составляют почти 70% от всех ошибок, которые могут быть допущены в лаборатории.

Неправильные процедуры взятия крови составляют более 60% ошибок лабораторного анализа, что выдвигает на первый план необходимость более строгого и эффективного контроля за этой процедурой как незаменимой частью процесса диагностики.

Объективные трудности в мониторинге большинства преаналитических изменений, которые лежат вне прямого контроля и руководства лабораторного персо-

нала, в том числе и флеботомия, требуют эффективных образовательных и предупредительных мер. Высокая текучесть кадров, недостаточное понимание общего лабораторного процесса и недостаточная подготовка медицинского персонала создают предпосылки для возникновения ошибок в процессе взятия крови. В большинстве случаев ошибки состоят в нарушении идентификации пациента и сбора образца, получении несоответствующего материала для анализов из-за неправильного венозного доступа, венозного стаза, неправильного оборудования для взятия крови и контейнеров. Поэтому необходимо введение стандартизации техники взятия крови для лабораторных исследований наряду с распространением рабочих инструкций, постоянным процессом обучения, сертификацией и тренингами работников здравоохранения, отвечающих за процесс взятия крови. Это повышает шансы на получение образцов стабильного качества, правильного результата лабораторных тестов и гарантирует улучшение диагностики и лечения пациента.

Известно, что ошибки, связанные с неправильным употреблением лекарств и работой хирурга, выявляются сразу, но есть и другие, «незаметные» ошибки, которые могут негативно влиять на диагностический процесс, точно так же, как на любую другую часть клинических рассуждений. Определение лабораторных ошибок, недавно принятое Международной организацией по стандартизации (ИСО), формулируется как «любой дефект от момента назначения анализов до получения результата и соответствующей интерпретации с последующим выбором врачебной тактики». Хотя существуют разные данные о возможном уровне ошибок в пределах работы одной лаборатории, они всегда отражают значительные цифры из-за огромного числа тестов, выполняемых ежедневно в клинических лабораториях. По данным литературы, уровень лабораторных ошибок в различных учреждениях здравоохранения колебался от 1 на каждые 8300 лабораторных результатов (или 2000 пациентов) до 1 на каждые 33–50 лабораторных результатов [2].

Флеботомия появилась еще до Гиппократа, в V в. до н. э., когда основной метод медицинского лечения основывался на учении о 4 жидкостях человеческого тела: крови, флегме, желтой и черной желчи. Известно, что флеботомия предплечья с помощью ланцета является одной из самых древних медицинских процедур, традиционно использовавшихся для кровопускания. Кровопускание использовалось врачом, чтобы восстановить баланс между жидкостями. К Средним векам врачи и цирюльники специализировались в практике кровопускания, хотя врачей пугал тот факт, что феодальные лорды могли казнить их в случае неблагоприятного исхода. Флеботомия и вивисекция достигли большого распространения в XVIII в. и начале XIX в., когда внедрялись различные методики. Особенно были распространены методы кровопускания, когда кровь вытекала из одной или более крупных наружных вен, таких как вены предплечья и шеи. В артериотомии пунктировалась артерия, чаще всего височная. И только к началу XX века использование безопасных и эффективных игл и шприцевых систем стало общей практикой для взятия крови. До начала 1980-х годов получение крови для аналитических целей продолжало выполняться обычными иглами и шприцами. Затем кровь переливалась в пробирки после извлечения иглы. Внедрение одноразовых игл и систем для взятия крови было существенным прогрессом. Эти устройства состояли из двусторонней иглы, пластикового держателя, или адаптера и серии вакуумных пробирок с крышками. Взятие крови при помощи такого устройства дает наилучшее качество образцов для лабораторных анализов, обеспечивая большую безопасность флеботомисту, потому что кровь пациента поступает непосредственно в пробирку для анализа. К тому же внутреннее устройство иглы позволяет взять последовательно несколько пробирок, предотвращая утечку крови при перемене пробирки.

Хотя внедрение одноразовых прямых игл и вакуумных систем позволило собирать образцы подходящего качества, с дополнительными общими преимуществами как с точки зрения безопасности, так и с практической, все общие процедуры забора крови и сам по себе уровень успеха флеботомии оказываются под влиянием нескольких аспектов. Главная причина широко распространенных проблем заключается в том, что трудно мониторировать большинство преаналитических погрешностей, включая погрешности флеботомии, которая не всегда находится под прямым контролем сотрудников лаборатории. Порядок проведения процедуры флеботомии имеет свои отличия в различных странах. В Германии забирать артериальную и венозную кровь разрешено только врачам, и они обучаются и контролируются более старшими коллегами в отделении. В Британии в качестве флеботомиста выступает специально обученный медицинский технический персонал, который частично контролируется лабораторными специалистами. Принимая во внимание распространяющуюся тенденцию централизации лабораторного тестирования, которая неизбежно ведет к привлечению сторонних организаций для взятия образцов и транспортировки, очевидно, что улучшенный контроль за децентрализованными процедурами флеботомии приобретет в будущем большое значение.

Флеботомия только кажется одной из самых простых процедур в здравоохранении. В реальной ситуации она имеет высокую степень преаналитической вариабельности и вызывает серьезные риски для здоровья, главным образом зависящие от риска случайного укола иглой у производящего процедуру и обычных повреждений, связанных с пациентом (укол в нерв или сухожилие, геморрагии, кратковременная потеря сознания, лимфедема, воспаление в месте взятия крови), в результате небрежного выполнения процедуры. Вариабель-

ность лабораторного тестирования является результатом плохо стандартизированных процедур по взятию крови. Из-за сменной работы персонала, недостаточного понимания того, что является правильной лабораторной практикой преаналитического этапа, и плохого обучения, флеботомисты могут совершать большое число ошибок, которые нарушают целостность образца, иногда в такой степени, что лабораторный персонал не может обнаружить ошибку во время аналитического процесса.

При исследовании венозной крови необходимо знание преаналитических вариаций, которые могут оказать влияние на результат лабораторного исследования. Так, при исследовании венозной крови на качество лабораторного анализа влияют прием пищи, время сбора биоматериала, положение пациента во время процедуры флеботомии, продолжительность наложения жгута и физическая нагрузка, что описано ниже. Существуют и дополнительные факторы, способные повлиять на качество лабораторных исследований.

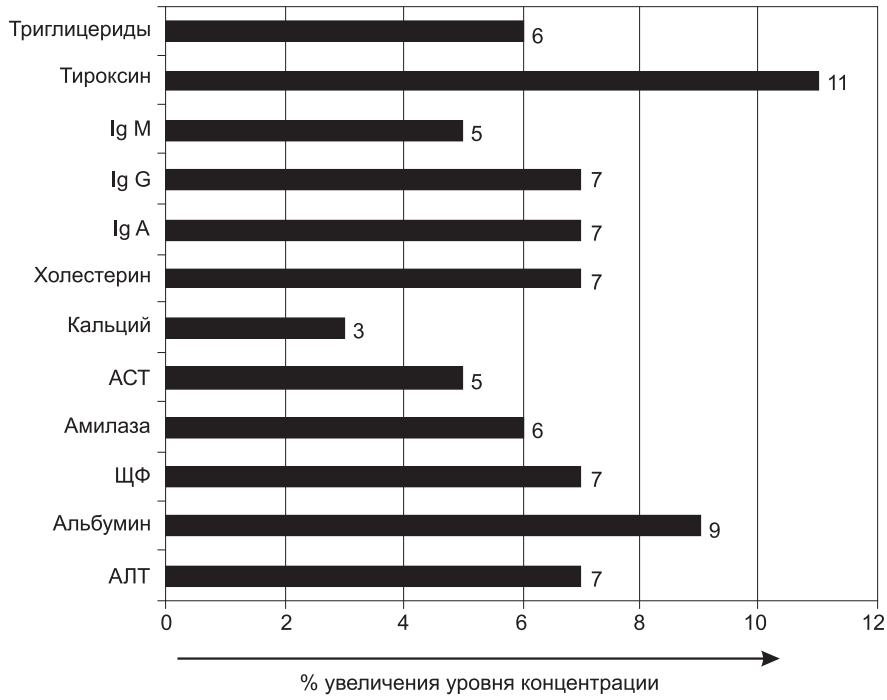



Рис. 1. Изменение уровня концентрации некоторых исследуемых компонентов сыворотки крови при изменении положения тела с горизонтального на вертикальное (по Felding P. et al., 1980)

**Прием пищи** может исказить некоторые результаты лабораторных исследований, особенно при исследовании проб крови, например, глюкозы, триглицеридов, липидного спектра и др. В связи с этим рекомендуется воздержаться от приема пищи и напитков за 8–14 часов до забора крови (для исследования липидного спектра). Из жидкостей можно употреблять только воду, но не кофе, сок и другие напитки. Нельзя исследовать биоматериал после длительного голодания более 24 часов, так как это может вызвать метаболические изменения, связанные с голоданием.

**Время.** Часто необходимо определить время забора биоматериала. Обычно забор биоматериала назначается утром натощак, однако возможен специальный режим при измерении глюкозы после еды, для исследования сахарной кривой. Очень важно время при лекарственном мониторинге, обычно «пиком» считается 30 минут после внутривенного введения лекарства, и до приема следующей дозы — при пероральном. Миокардиальные маркеры назначаются в серии с определенным интервалом при нахождении пациента с жалобами на боли в грудной клетке в приемном покое или отделении реанимации. На результатах лабораторных исследований должно быть указано время забора биоматериала [3].

Часто лабораторное исследование не требует специальных условий подготовки, что врачу необходимо пометить на бланке заказа. Однако необходимо обозначить время забора биоматериала.

При назначении некоторых тестов необходимо учитывать суточные циркадные ритмы. Например, уровень кортизола крови максимален в утренние часы и минимален в вечерние, а концентрация тиреотропного гормона (ТТГ) максимальна поздно вечером, а минимальна — около полудня.

**Положение тела пациента при заборе крови.** Изменение положения тела — «лежа», «стоя» или «сидя» — вызывает перемещение воды в человеческом теле в интерстициальные пространства тканей [4]. Вследствие этого возрастает концентрация крупных молекул, которые не могут иммигрировать из кровяного русла в интерстициальное пространство. Например, вследствие этого концентрация альбумина в среднем выше у пациентов в ЛПУ поликлинического типа, где обычно забор крови осуществляется в положении «сидя», и ниже в стационарах, когда пациент при сборе биоматериала чаще лежит в кровати. Концентрация некоторых мелких молекул, частично связанных с белками (например, кальция, билирубина), и многих лекарственных препаратов возрастает при заборе крови в положении «стоя» и «сидя» (рис. 1).

**Продолжительность наложения жгута.** Жгут накладывается для наполнения вен при венепункции. Это приводит примерно к такому же эффекту, что и изменение положения тела с горизонтального на вертикальное. Мелкие молекулы и вода уходят из кровяного русла,

*Таблица 1*

**Эффекты интенсивной физической нагрузки на содержание уровней концентрации различных исследуемых компонентов сыворотки крови (по Burtis C.A., Ashwood E.R., 2001)**

| Увеличение концентрации | | Уменьшение концентрации | |
|---|---|---|---|
| Исследуемый компонент | % увеличения уровня концентрации | Исследуемый компонент | % уменьшения уровня концентрации |
| АЛТ | 41 | Альбумин | 4 |
| ЩФ | 3 | Билирубин | 4 |
| АСТ | 31 | Железо | 11 |
| Кальций | 1 | ЛДГ | 1 |
| Хлориды | 1 | Калий | 8 |
| Холестерин | 3 | Натрий | 1 |
| Креатинин | 17 | | |
| Фосфаты | 12 | | |
| Общий белок | 3 | | |
| Мочевина | 3 | | |
| Мочевая кислота | 4 | | |

вызывая гемоконцентрацию и венозный стаз, что приводит к увеличению концентрации крупных молекул. Дополнительное уменьшение содержания кислорода способствует увеличению уровней концентрации лактата и калия в сыворотке крови. Чрезмерное первое сокращение кулака для нагнетания крови может привести к похожему эффекту. В связи с этим рекомендуется накладывать жгут продолжительностью не более 2 минут и избегать интенсивного сокращения кисти.

**Физическая нагрузка.** Перед лабораторным исследованием крови не рекомендуется выполнение интенсивной физической нагрузки (спорт и др.) в течение 72 часов, так как это может привести к повышению уровней концентрации аспартатаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ) и изменению других лабораторных показателей. В таблице 1 представлены процентные изменения уровней концентрации различных исследуемых компонентов сыворотки крови через 15 мин после выполнения физической нагрузки [5].

**Эффекты инфузионной и трансфузионной терапии.** Если пациент получает инфузионную терапию, венепункция для лабораторного исследования должна выполняться на противоположной руке. Пациентам, получающим парентеральное питание, необходимо брать кровь на исследование не ранее 8 часов после трансфузии, как и в случае приема пищи. Уровни концентрации калия, лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и гемоглобина могут возрастать в течение некоторого времени после проведения трансфузии крови. Отмечается искусственное понижение уровня концентрации кальция сыворотки крови после проведения трансфузии из-за его связывания с антикоагулянтом цитратом, который находится в переливаемой крови. Данный эффект не столь выражен при переливании только эритроцитарной массы.

Успех флеботомии зависит от соблюдения правил преаналитического этапа лабораторных исследований. Флеботомии, которые производятся хорошо обученным лабораторным персоналом, обычно более успешны, чем те, которые выполнялись персоналом других медицинских подразделений. Этот факт подтверждается значительно меньшим числом ошибок флеботомии, выполненной амбулаторным пациентам (0,039%), по сравнению с госпитализированными (0,6%). Самое большое количество ошибок в работе лаборатории происходит из-за гемолиза (18%), недостаточного количества взятого биоматериала (16%), свернувшейся крови (13,4%), потерянных или неполученных лабораториями образцов (11,5%) и неправильной маркировки доставленного биоматериала (5,8%).

В России нет образовательных программ по флеботомии. В медицинских училищах не обучают процедуре взятия крови с помощью вакуумных систем. Медицинские сестры перенимают опыт на рабочих местах у своих коллег или тренируются представителями компаний, поставляющих вакуумные системы в учреждения, при этом наблюдается спорадичность и не всегда правильная подача информации. Также у сестер существует психологический барьер сопротивления новым способам взятия крови. Очень часто в лечебных учреждениях администрация и заведующие лабораториями не до конца понимают важность преаналитической фазы лабораторных исследований и идут «на поводу» у сестер, мотивируя свой отказ от перехода на вакуумный способ взятия крови тем, что сестрам удобнее работать традиционным способом. Также лабораторный штат старается полностью отойти от ответственности за преаналитическую фазу, перекладывая ответственность за закупку вакуумных систем и подготовку медицинского персонала к флеботомии на главных и старших сестер.

Учитывая стремительное развитие преаналитического этапа с применением закрытых вакуумных систем взятия крови для лабораторного анализа, лабораторные специалисты должны распространять свое влияние на весь лабораторный процесс, который находится на территории клинических подразделений. Данная проблема требует совершенствования организационно-управленческих подходов не только в рамках лабораторной службы, но и в системе здравоохранения. Необходимо разработать эффективные методы взаимодействия специалистов лабораторной диагностики и клинических подразделений при процедуре взятия крови для лабораторного анализа. Лабораторные специалисты должны предоставлять необходимую информацию для подготовки и обучения флеботомистов, обеспечивая профессиональную помощь для того, чтобы преодолеть большинство преаналитических проблем, и распространять методические руководства, которые представляли бы собой ясное описание правильных процедур для взятия и обработки образцов. Это позволит усовершенствовать качество флеботомии в лабораториях и клинических подразделениях, уменьшить риск неправильной диагностики и количества медицинских ошибок из-за неправильно выполненных процедур.

Таким образом, флеботомия является очень серьезной и важной процедурой для получения качественных результатов лабораторного тестирования. Поэтому необходимо выработать четкие и ясные критерии проведения процедуры и возложить ответственность за их проведение и подготовку персонала не только на заведующих лабораториями, но и на администрацию лечебных учреждений.

**Список литературы**

1. Мошкин А. В., Долгов В. В. Обеспечение качества в клинической лабораторной диагностике: Руководство для специалистов клинической лабораторной диагностики. — М.: Медиздат, 2004. — 191 с.

2. Lippi G. et. al. Phlebotomy Issues and Quality Improvement in Results of laboratory testing Values // Scnd. J. Clin. Lab. — 2006. — Vol. 52. — P. 217–230.

3. Miller J. J. Specimen Collection, Handling, Preparation and Storage // Clinical Diagnostic Technology, edited by Ward-Cook K. M., Lehman C. A., Schoeff L. E., Williams R. H. — Washington: AACC Press, 2006. — Vol. 1: The preanalitical Phase. — 173 p.

4. Felding P., Tryding N., Hyltoft P. P. et al. Effects of posture of concentration of blood constituents in healthy adults: practical application of blood speciment collection procedures recommended by the Scandinavian Committee on Reference Values // Scnd. J. Clin. Lab. Invest. — 1980. — Vol. 40. — P. 616–621.

5. Tietz Fundaments of Clinical Chemistry. 5th edition // Edited by Burtis C. A., Ashwood E. R. W.B. — Philadelpia: W. B.Saunders Company, 2001. — 1091 p.

## КОНСИЛИУМ У ПОСТЕЛИ БОЛЬНОГО

# ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КАК ОСНОВА ДЛЯ ИНДИВИДУАЛИЗИРОВАННОГО ПОДХОДА К ЛЕКАРСТВЕННОЙ ТЕРАПИИ

**А. С. УЛИТИНА*, О. В. СИРОТКИНА*, **, С. Н. ПЧЕЛИНА*, **, М. В. ДУБИНА***
*** ГОУ ВПО СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова Росздрава**
**** Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова, РАН, Санкт-Петербург**

***Резюме.*** *Различия в индивидуальной чувствительности к лекарственным препаратам часто приводят к отсутствию эффекта от лечения или к нежелательным побочным действиям. Чувствительность к лекарству во многом определяется полиморфизмом генов, кодирующих ферменты, метаболизирующие данный препарат, его транспортеры и мишени. Фармакогенетика — это наука о роли генетических факторов в формировании фармакологического ответа организма на лекарство. Фармакогенетическое тестирование способно выявить пациентов с повышенной или пониженной чувствительностью к лекарственному средству, для которых стандартная дозировка окажется соответственно токсичной или неэффективной. По результатам тестирования клиницист может выбрать наиболее подходящий данному пациенту препарат и начать терапию с оптимальной дозы. В данном обзоре изложены основные понятия фармакогенетики, даны сведения о фармакогенетических тестах, доступных для использования в клинической практике, а также приведены доводы о целесообразности более широкого использования генетического тестирования для повышения эффективности и безопасности лекарственной терапии.*

***Ключевые слова:*** *фармакогенетика, индивидуализированная терапия, полиморфизм, генотипирование, резистентность.*

## CONSILIUM AT PATIENT'S WARD

# PHARMACOGENETIC TESTING: THE WAY TO INDIVIDUALIZED DRUG TREATMENT

**A. S. ULITINA*, O. V. SIROTKINA*, **, S. N. PCHELINA*, **, M. V. DUBINA***
*** I. P. Pavlov State Medical University, Saint-Petersburg**
**** Petersburg Nuclear Physics Institute, RAS, Saint-Petersburg**

***Summary.*** *There is wide variability in the clinical response of patients to standard drug doses. This is an important problem in clinical practice, where it often leads to therapeutic failures or adverse drug reactions. Polymorphisms in genes coding for drug metabolizing enzymes, drug transporters and drug targets are important determinants of drug response and toxicity, and may therefore aid in selection and dosage of drugs. Pharmacogenetics studies how inter-individual variations of specific genes affect drug responses. Pharmacogenetic testing aims to identify patients predisposed to high risk of toxicity or low response from standard drug doses. Consequences which arise from genotyping might be: adjustment of dose according to genotype, choice of therapeutic strategy or even choice of drug. The basic principles of pharmacogenetics and the list of main pharmacogenetic tests are clarified in present review. We report valid evidence of pharmacogenetics ability to improve the efficacy and safety of drug treatment.*

***Keywords:*** *pharmacogenetics, individualized treatment, polymorphism, genotyping, resistance.*

### Масштабы проблемы недостаточной эффективности и безопасности лекарственной терапии

Проблема недостаточной эффективности фармакотерапии и нежелательных лекарственных реакций (НЛР) становится все более актуальной во всех странах. Это обусловлено многими факторами, важнейшими из которых являются:

- внедрение в клиническую практику большого числа новых лекарственных средств (ЛС) с высокой биологической активностью;
- нерациональное использование ЛС;
- нарастающая сенсибилизация населения к различным ксенобиотикам, в том числе к ЛС;
- увеличение средней продолжительности жизни и, соответственно, значительное увеличение количества пожилых пациентов, нуждающихся в систематической фармакотерапии.

Только в США ежегодно госпитализируется от 3,5 до 8,8 млн и погибает до 100 000 человек вследствие развития НЛР. При этом осложнения лекарственной терапии занимают шестое место в общей структуре смертности [6, 17]. Количество серьезных НЛР в США

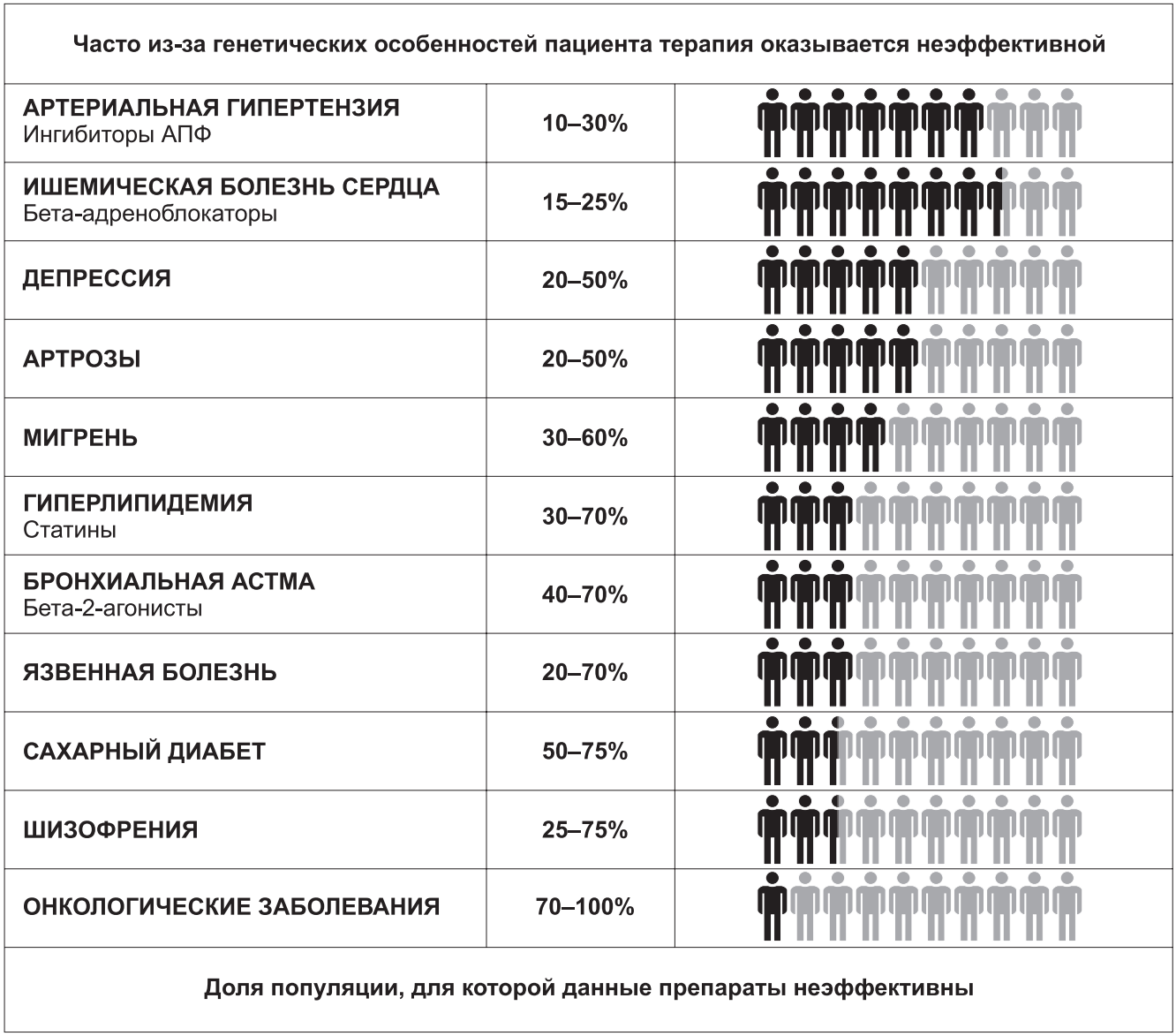



Рис. 1. Доля пациентов, для которых терапия оказывается неэффективной из-за их генетических особенностей. Разброс цифр в пределах каждого заболевания обусловлен межпопуляционными различиями у жителей разных стран [9, 28]

с 1998 по 2005 г. увеличилось в 2,6 раза [23]. Подобное положение отмечается и в других развитых странах [15, 24].

НЛР — это не только серьезная **медицинская, социальная**, но и **экономическая** проблема. Экономический ущерб от НЛР в США возрос с 76,6 (1997) до 177,4 (2001) млрд долларов в год [9, 17]. Затраты, связанные с НЛР, составляют в развитых странах от 5,5 до 17,0% общего бюджета больниц [22]. О ситуации в России можно лишь догадываться, поскольку аналогичные сведения в открытом доступе отсутствуют; но вряд ли она более утешительна, чем в странах Европы и США.

Для совершенствования фармакотерапии прежде всего необходим тщательный анализ всех факторов, способных влиять на взаимодействие ЛС и организма человека.

Ни одно ЛС не является одинаково эффективным и безопасным для всех пациентов, которым оно показано. Пациенты со сходной клинической картиной, получающие одинаковую терапию, демонстрируют различную степень положительной динамики и различную частоту НЛР. Возможных причин этому много: назначение ЛС в неправильной дозировке, межлекарственные взаимодействия в организме, аллергические реакции, ошибки при приеме ЛС. В этом ряду важное место занимают индивидуальные генетические особенности пациента (рис. 1). Ответ организма на ЛС определяется совокупностью генетических и внешних факторов. При этом для

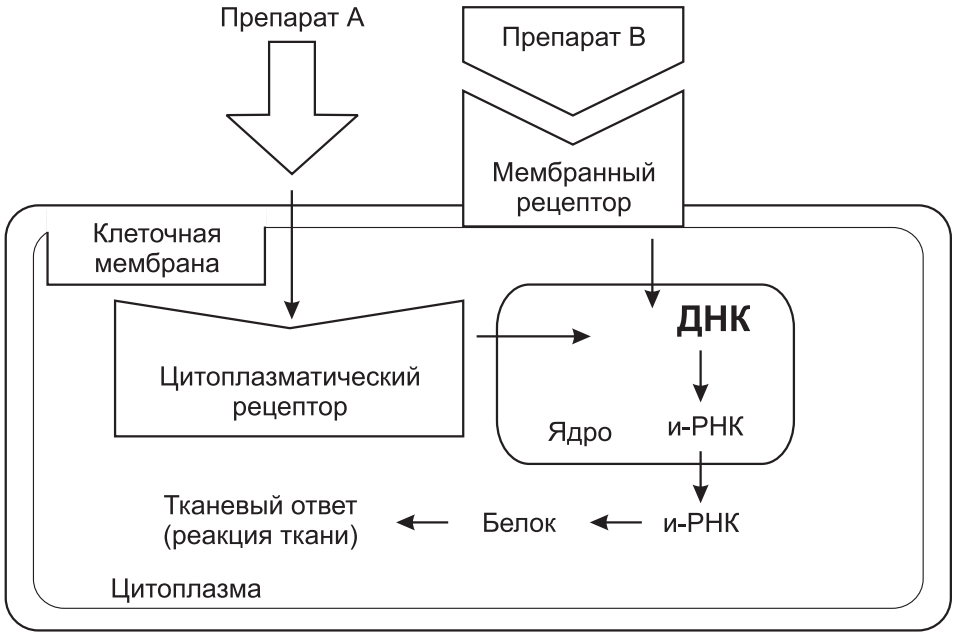



Рис. 2. Схема взаимодействия ЛС с организмом [6, с изменениями]

различных групп ЛС **20–95% неблагоприятных фармакологических ответов (развитие НЛР или недостаточная эффективность ЛС) обусловлены генетическими особенностями пациентов** [13]. По данным отечественных авторов, этот показатель составляет в среднем 50% [9].

В 2007 г. семь крупнейших фармацевтических компаний мира (Pfizer, GlaxoSmithKline, Abbott Laboratories, Johnson & Johnson, Roche, Sanofi-Aventis и Wyeth) основали некоммерческую организацию **Консорциум по опасным побочным эффектам (SAEC – the International Serious Adverse Events Consortium, *http://www.saeconsortium.org*)** для изучения генетических причин НЛР и разработки фармакогенетических тестов. Исследования проводятся совместно с американскими и европейскими научно-исследовательскими учреждениями за счет средств компаний-членов SAEC.

### Сущность и задачи фармакогенетики

**Фармакогенетика** – наука, изучающая роль генетических факторов в формировании фармакологического ответа организма человека на ЛС. Термин «фармакогенетика» был введен в 1959 г. немецким генетиком F. Vogel. Благодаря важности ЛС в жизнеобеспечении человека фармакогенетика выделилась в отдельное направление из более широкой научной дисциплины – экогенетики, которая изучает роль генетических факторов в формировании реакций организма на средовые воздействия.

Предположения о роли наследственности в эффектах экзогенных соединений были впервые сделаны в конце XIX века английским ученым Garrod A. Становление фармакогенетики связано с именами ученых F. Vogel, W. Kalow, A. Motulski. К середине XX века уже были опубликованы наблюдения случаев чрезмерной чувствительности к миорелаксанту сукцинилхолину, обусловленной дефектом псевдохолинэстеразы, гемолиза эритроцитов при лечении малярии примахином, обусловленного дефектом глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы эритроцитов и различий в эффективности лечения туберкулеза и развития НЛР у больных при приеме изониазида из-за различий в скорости его ацетилирования. В последующем были обнаружены 40-кратные варьирования в режиме дозирования адреноблокатора дебризохина у больных с артериальной гипертензией. И это было только началом последующих наблюдений для множества других ЛС.

Открытие **структуры ДНК** (1953) стало ключевым моментом в развитии фармакогенетики, так как позволило перейти от накопления клинических наблюдений к глубинному пониманию молекулярных механизмов взаимодействия организма с ЛС. С 1960-х годов фармакогенетические исследования стали развиваться в геометрической прогрессии. Первая международная конференция по фармакогенетике состоялась в 1967 г. в США. В 1992 г. W. Kalow выпустил энциклопедическую монографию "Pharmacogenetics of Drug Metabolism" [19], обобщившую все известные на тот момент данные по фармакогенетике человека. В 2000 г. Национальный институт здоровья США создал исследовательскую сеть по фармакогенетике (Pharmacogenetics Research Network, *http://www.nigms.nih.gov/Initiatives/PGRN*).

Рис. 3. Взаимосвязь фармакогенетики с другими разделами медицины и основные объекты фармакогенетических исследований

С позиций сегодняшних знаний о механизмах взаимодействия ЛС с организмом генетически обусловленные индивидуальные различия в эффектах ЛС являются очевидной закономерностью, поскольку **все фармакокинетические и фармакодинамические процессы опосредованы белками:** рецепторами, ионными каналами, переносчиками, системами вторичных мессенджеров, модуляторами и пр. **Структура белков находится под контролем соответствующих генов, что определяет ее индивидуальность** (рис. 2). В фармакологических исследованиях на животных также были обнаружены межлинейные различия в эффектах, свидетельствующие о генетической обусловленности индивидуальной чувствительности к ЛС [6].

В настоящее время основными **объектами фармакогенетических исследований** являются (рис. 3):

- ферменты биотрансформации ксенобиотиков;
- транспортные системы ЛС (транспортеры);
- молекулярные точки приложения ЛС (мишени).

Известно более 30 семейств ферментов, задействованных в метаболизме ЛС [13]. Большинству генов, участвующих в метаболизме ЛС, присущ **полиморфизм**, то есть наличие нескольких **аллельных вариантов (аллелей)**. Некоторые из этих аллелей кодируют ферменты с измененной активностью. Это приводит к нарушению скорости метаболизации ЛС и, следовательно, либо к недостаточной эффективности ЛС, либо (чаще) к его передозировке и НЛР. Фармакогенетические тесты, то есть **генотипирование** на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР), направлены на выявление этих мутантных аллелей у пациентов [3, 4].

Важно отметить, что сложившееся у ряда врачей предубеждение о высокой стоимости и технической сложности фармакогенетических тестов не соответствует действительности. Как правило, в их основе лежит

рутинная ПЦР, которую вполне реально наладить в условиях любого крупного ЛПУ. Материалом для исследования обычно служит венозная кровь пациента, причем забор крови можно проводить в любое время суток, независимо от обострения заболевания, времени начала лекарственной терапии и времени приема пищи. Стоимость выявления одного полиморфизма сопоставима со стоимостью любого другого рутинного ПЦР-анализа (например, ПЦР инфекций). Совершенствование технологии приводит к удешевлению обследования. В частности, в настоящее время активно разрабатываются генетические **микрочипы**, позволяющие одномоментно проводить большое число фармакогенетических тестов (microarray technology).

**Вариабельный ответ организма на действие ЛС часто связан не с одним, а с несколькими или даже многими генами**, кодирующими ферменты метаболизма, белки-транспортеры и молекулярные мишени [18]. В результате успешного завершения проекта «Геном человека» (2003) появилась возможность исследовать не единичные гены, а геном. Так было положено начало новой области исследований под названием **фармакогеномика**, которая призвана индивидуализировать лекарственную терапию на основе комплексного, полногеномного анализа лекарственного ответа. По мнению W. Kalow, термин «фармакогеномика» прежде всего подчеркивает усовершенствование технических методов в изучении вариабельности ДНК [20].

Комплексное тестирование генов внешней среды, в том числе и генов метаболизма ЛС, позволяет приблизиться к идеальной схеме индивидуального лечения, то есть к решению основной задачи фармакогенетики [1, 25].

В 2004 г. независимой группой экспертов Европейской комиссии была издана программная брошюра с рекомендациями по этическим, юридическим и социальным последствиям генетического тестирования. Один из разделов этого документа посвящен нормативному регулированию фармакогенетических тестов [12].

В сети Интернет представлена **база данных по фармакогеномике** (Pharmacogenomics Knowledge Base, *http://www.pharmgkb.org*) — англоязычный ресурс, на котором обобщаются результаты всех фармакогенетических исследований [29].

### Примеры практического использования фармакогенетических тестов

Целый ряд фармакогенетических тестов уже получил официальное одобрение и рекомендован к применению в клинической практике (табл. 1).

В России основным законодательным документом для использования фармакогенетических тестов в практическом здравоохранении является **приказ Минздрава РФ № 494 от 22.10.03 «О совершенствовании деятельности врачей-клинических фармакологов»**, в котором подчеркивается необходимость организации в крупных ЛПУ лабораторий фармакогенетики.

В России на данный момент исследования по фармакогенетике чаще всего применяются для индивидуализации терапии тромбозов и тромбоэмболических осложнений, рака молочной железы, лейкозов и ВИЧ/СПИДа.

В частности, отделом молекулярно-генетических технологий СПбГМУ им. И. П. Павлова совместно с лабораторией молекулярной генетики человека Петербургского института ядерной физики РАН выполнен ряд научных работ по выявлению ассоциации между носительством аллельных вариантов гена CYP2C9 и чувствительностью к варфарину [8, 26] (рис. 4). Фармакогенетическое тестирование аллельных вариантов гена CYP2C9, которые повышают чувствительность к вар-

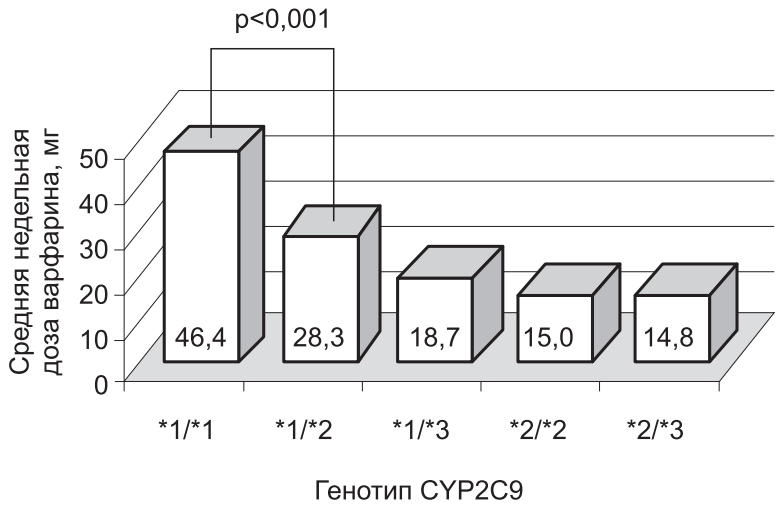



Рис. 4. Зависимость чувствительности к варфарину от генотипа цитохрома CYP2C9
(по результатам фармакогенетического тестирования 154 пациентов СПбГМУ им. И. П. Павлова)

*Таблица 1*

**Важнейшие фармакогенетические тесты, используемые в мировой клинической практике [2, 9, 11, 21, 28]**

| Лекарственное средство | Обозначение гена или название теста* | Показания к назначению ЛС | Область применения теста |
|---|---|---|---|
| Антиретровирусные препараты | TruGene® - HIV1 Genotyping Kit | ВИЧ/СПИД | Определение чувствительности к антиретровирусным препаратам |
| Химиопрепараты и гормоны для лечения рака молочной железы | Oncotype DX™ 21-gene assay | Рак молочной железы | Количественная оценка экспрессии 21 гена, ассоциированных с вероятностью рецидивирования рака молочной железы и чувствительностью к различным видам химио- и гормональной терапии |
| Камптозар (Camptosar, Irinotecan) | UGT1A1 | Рак толстой кишки | Определение чувствительности к камптозару |
| Препараты, метаболизируемые ферментами семейства цитохрома Р450 (в частности, метаболизируемые CYP2D6 тиоридазин, трициклические антидепрессанты, атомоксетин) | Amplichip® CYP2D6/CYP2C19 | Многие заболевания (в частности, шизофрения, депрессии, синдром гиперактивности и нарушения внимания у детей) | Определение чувствительности к препаратам, метаболизируемым ферментами семейства цитохрома Р450 (в частности, антидепрессанты и нейролептики) |
| Варфарин (Warfarin) | CYP2C9 | Тромбозы и тромбоэмболические осложнения | Определение чувствительности к варфарину |
| Гливек (Gleevec) | BCR-ABL | Хронический миелолейкоз | Определение чувствительности к гливеку |
| Гливек (Gleevec) | c-KIT | Злокачественные стромальные опухоли желудочно-кишечного тракта | Определение чувствительности к гливеку |
| Герцептин (Herceptin, Trastuzumab) | HER-2/neu receptor | Рак молочной железы | Определение чувствительности к герцептину |
| Пуринетол (Purinethol, Mercaptopurine) | TPMT | Острый лимфобластный лейкоз | Определение чувствительности к пуринетолу |
| Тамоксифен (Tamoxifen) | Estrogen receptor | Рак молочной железы | Определение чувствительности к тамоксифену |
| Иммуносупрессивные препараты | AlloMap® gene profile | Состояние после трансплантации сердца | Мониторинг иммунного ответа для оптимизации иммуносупрессивной терапии |
| Антиаритмические препараты | Familion® 5-gene profile | Синдром удлинения QT-интервала | Выявление мутаций в 5 генах для выбора оптимальной фармакотерапии |
| Сульфасалазин | NAT2 | Ревматоидный артрит, неспецифический язвенный колит | Определение чувствительности к сульфасалазину |
| Дитилин (суксаметония йодид) | BCHE | Миорелаксация при оперативных вмешательствах | Определение чувствительности к дитилину |

* Фармакогенетические тесты, получившие одобрение FDA (Food and Drug Administration — Управление США по контролю над качеством медикаментов и продуктов питания), отмечены подчеркиванием.

фарину и могут быть причиной геморрагических осложнений, рекомендовано к внедрению в практику клинической лабораторной диагностики [7].

**Клинический пример**, демонстрирующий зависимость чувствительности к варфарину от аллельных вариантов гена CYP2C9.

Больная К., 60 лет. Диагноз: Рецидивирующая ТЭЛА (1998, 2003). Кавакклипирование (2003).

После кавакклипирования на 20-й день амбулаторной терапии стандартной дозой варфарина, 5 мг в сутки, появились умеренные носовые кровотечения без видимой причины, кровоточивость десен при чистке зубов, макрогематурия. Больная обратилась в лабораторию гемостазиологии СПбГМУ, где было выявлено МНО 5,30. После отмены варфарина через 2 дня МНО снизилось до 4,85. Через 5 дней после отмены варфарина МНО

снизилось до 2,43, и геморрагические проявления прекратились. Прием варфарина был возобновлен в уменьшенной дозировке. После завершения периода индукции средняя недельная доза варфарина оказалась значительно ниже среднестатистической и составила 17,5 мг. В дальнейшем при терапии данной дозой состояние пациентки было удовлетворительным, геморрагические проявления отсутствовали, степень гипокоагуляции оставалась стабильной. При молекулярно-генетическом исследовании в СПбГМУ им. И. П. Павлова было выявлено гетерозиготное носительство мутантного аллеля CYP2C9*3, генотип CYP2C9*1/*3 (однонуклеотидная замена A1075T в экзоне 7 гена CYP2C9, приводящая к аминокислотной замене Ile359Leu в молекуле цитохрома CYP2C9).

### Дополнительные возможности фармакогенетики

Индивидуализация лекарственной терапии в клинической практике — важнейший, но не единственный аспект применения фармакогенетических тестов.

**Усовершенствование диагностики заболеваний.** Неодинаковая чувствительность к ЛС у пациентов со сходной клинической картиной иногда может быть следствием различий в этиопатогенезе заболевания. Оценку реакции на лекарственное воздействие в таких случаях можно рассматривать как диагностическую пробу, выделяя подгруппы реагирующих и резистентных к ЛС пациентов (в англоязычной литературе — responders and nonresponders). В частности, в этом направлении в психиатрии ведется активное изучение фармакогенетики нейрорецепторов [6].

**Усовершенствование методологии разработки новых ЛС.** Использование фармакогеномики на ранних этапах разработки ЛС может снизить процент неудач за счет предпочтительной работы с молекулами-кандидатами, потенциально обладающими максимальной эффективностью и безопасностью. Использование подобной информации позволит фармакологическим компаниям сэкономить до 335 млн долларов на разработке каждого нового ЛС [30].

**Уменьшение масштабов, времени и стоимости клинических испытаний новых ЛС.** Разработка нового ЛС — весьма дорогостоящий и длительный процесс. Предварительное генотипирование пациентов, участвующих в клинических испытаниях, позволит не включать в протокол тех, у кого велика вероятность неэффективности ЛС или развития НЛР. В результате такого «обогащения» групп участников можно ожидать увеличения доли успешных протоколов и ускорения выхода ЛС на рынок, а это позволит сэкономить миллиарды долларов, которые тратятся сейчас на неэффективные испытания [5]. Например, 3-я фаза клинических испытаний препарата тикерб (Tykerb, Iapatinib) была успешно завершена раньше запланированного срока благодаря выраженной эффективности данного ЛС при лечении генетически определенной группы пациентов с раком молочной железы [27].

**Сохранение новых ЛС, несмотря на неудачу в ходе первичных клинических испытаний.** При оценке эффективности и безопасности противоопухолевого препарата герцептин (Herceptin, Trastuzumab) была использована адаптация протокола клинических испытаний с учетом данных фармакогенетики, что положительно повлияло на судьбу нового лекарства. Результаты проведенной в 1997 г. 3-й фазы клинических испытаний свидетельствовали о неэффективности данного ЛС в отношении протестированной группы пациентов, однако повторная обработка результатов показала, что герцептин достоверно эффективен в отношении выборки из этой группы — женщин с положительным тестом на гиперэкспрессию гена HER2. В итоге комбинация герцептин + фармакогенетический тест быстро получила одобрение FDA [10].

### Заключение

Одним из путей повышения эффективности и безопасности лекарственной терапии является внедрение в клиническую практику индивидуализированного подхода к пациенту. При этом выбор ЛС, его дозы и режима дозирования должен производиться с учетом индивидуальной чувствительности пациента, предварительно определенной с помощью фармакогенетических тестов.

Следует отметить, что для многих ЛС индивидуальный ответ организма является мультифакторным, то есть зависит от множества параметров, среди которых не всегда можно выделить главный фактор риска развития НЛР. Таким образом, в ряде случаев выявление аллельных вариантов генов, модифицирующих чувствительность пациента к определенному ЛС, является сложной задачей.

Даже в «истинно фармакогенетических» случаях (ЛС, у которых точно известен метаболизм и доказано влияние на него аллельных вариантов одного из генов), среди пациентов с одинаковым генотипом по данному гену всегда будет наблюдаться градиент выраженности ответа на ЛС. Причиной этого является неизбежное прямое и/или опосредованное влияние на эффект ЛС полиморфизмов других генов, а также многих внешних факторов (возраст, особенности питания, сопутствующие заболевания и т. п.) [16].

**Фармакогенетические тесты позволяют оптимизировать начальный этап терапии**; в дальнейшем доза и режим приема ЛС могут быть скорректированы в зависимости от индивидуальной реакции организма. Таким образом, проведение фармакогенетического исследования перед назначением ЛС позволяет повысить эффективность терапии и снизить риск НЛР, но не уменьшает ответственность лечащего врача в отношении систематического наблюдения за пациентом и контроля его состояния здоровья.

**Медицинская, экономическая и социальная целесообразность фармакогенетических разработок не вызывает сомнений, поскольку их итогом является повышение эффективности фармакотерапии со снижением частоты НЛР, что сокращает обусловленные болезнями трудопотери, занятость госпитального фонда, расход ЛС и повышает качество жизни населения** [14].

Фармакогенетические разработки находятся на разных стадиях. Несколько тестов уже прошли необходимые проверки и рекомендованы к практическому использованию. Эффективность большого количества методик в данный момент уточняется и обсуждается в научных публикациях. **В ближайшие годы следует ожидать значительного увеличения числа фармакогенетических тестов, утвержденных к применению в клинической практике.**

**Литература**


1. Геномика — медицине. Научное издание / Под ред. академика РАМН В. И. Иванова и академика РАН Л. Л. Киселева. — М.: ИКЦ «Академкнига», 2005. — 392 с.: ил.
2. Клиническая фармакология: учебник / Под ред. В. Г. Кукеса. — 4-е изд., перераб. и доп. — М: ГЭОТАР-Медиа, 2008. — 1056 с.
3. Кукес В. Г. Метаболизм лекарственных средств: клинико-фармакологические аспекты. — М.: Издательство «Реафарм», 2004. — 144 с.
4. Миронова Ж. А., Трофимов В. И., Янчина Е. Д., Дубина М. В. Фармакогенетические аспекты стероидрезистентности у больных бронхиальной астмой // Клинико-лабораторный консилиум. — 2006. — № 13. — С. 60–63.
5. Рудык Ю. С. Фармакогенетика: от разработки новых лекарственных средств до индивидуализации лечения больных хронической сердечной недостаточностью // Здоровье Украины. — 2008. — № 5/1. — С. 60–62.
6. Середенин С. Б. Лекции по фармакогенетике. — М.: Медицинское информационное агентство, 2004. — 303 с.: ил.
7. Сироткина О. В., Вавилова Т. В., Кадинская М. И., Улитина А. С., Янчина Е. Д., Пчелина С. Н., Дубина М. В. Определение индивидуальной чувствительности к варфарину методом молекулярно-генетического анализа гена цитохрома Р450 2С9 / Пособие для врачей, 2006. — СПб.: Издательство СПбГМУ.
8. Сироткина О. В., Улитина А. С., Тараскина А. Е., Кадинская М. И., Вавилова Т. В., Пчелина С. Н., Шварц Е. И. Клиническое значение аллельных вариантов гена цитохрома CYP2C9 при антикоагулянтной терапии варфарином // Кардиология. — 2005. — Том 45. — № 4. — С. 61–63.
9. Сычев Д. А., Раменская Г. В., Игнатьев И. В., Кукес В. Г. Клиническая фармакогенетика: Учебное пособие / Под ред. В. Г. Кукеса, Н. П. Бочкова. — М: ГЭОТАР-Медиа, 2007. — 248 с.: ил.
10. Cobleigh M. A., Vogel C. L., Tripathy D. et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease // J. Clin. Oncol. — 1999. — Vol. 17. — N 9. — P. 2639–2648.
11. Elion G. B. The purine path to chemotherapy // Science. — 1989. — Vol. 7. — N 244. — P. 41–47.
12. European Commission: 25 recommendations on the ethical, legal and social implications of genetic testing / Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities. — 2004. — 25 p.
13. Evans W. E., McLeod H. L. Pharmacogenomics — drug disposition, drug targets, and side effects // The New England Journal of Medicine. — 2003. — Vol. 348. — N 6. — P. 538–549.
14. Higashi M. K., Veenstra D. L. Managed care in the genomics era: assessing the cost effectiveness of genetic tests // Am. J. Manag. Care. — 2003. — Vol. 9. — P. 493–500.
15. Imbs J. L., Pouyanne P., Haramburu F. et al. Jatrogenic medication: estimation of its prevalence in French public hospitals // Regional Centers of Pharmacuvigiaincc. Therapie. — 1999. — Vol. 54. — N 1. — P. 21–27.
16. Ingelman-Sundberg m. Pharmacogenetics: an opportunity for a safer and more efficient pharmacotherapy // J. Intern. Med. — 2001. — Vol. 250. — N 3. — P. 186–200.
17. Johnson J. A., Bootman J. L. Drug-related morbidity and mortality. A cost-of-illness model // J. Arch. Intern. Med. — 1995. — Vol. 155. — N 18. — P. 1949–1956.
18. Kalow W. Pharmacogenetics in biological perspective // Pharmacol. Rev. — 1997. — Vol. 49. — P. 369–379.
19. Kalow W. Pharmacogenetics of drug metabolism / N. Y. Oxford, Seoul, Tokyo: Pergamon Press, 1992.
20. Kalow W. Pharmacogenomics: historical perspective and current status // Methods Mol. Biol. — 2005. — Vol. 311. — P. 3–16.
21. Marra C. A., Esdaile J. M., Anis A. H. Practical pharmacogenetics: the cost-effectiveness of screeening for thiopurine s-methyltransferase polymorphisms in patients with rheumatological conditions treated with azathioprine // J. Rheumatol. — 2002. — Vol. 29. — P. 2507–2512.
22. Moore N. D., Lecaintre D., Noblet C. et al. Frequency and cost of serious adverse reactions in a department of general medicine // Br. J. Clin. Pharmacol. — 1998. — Vol. 45. — N 3. — P. 301–308.
23. Moore T. J., Cohen M. R., Furberg C. D. Serious adverse drug events reported to the Food and Drug Administration, 1998–2005 // Arch Intern Med. — 2007. — Vol. 167. — N 16. — P. 1752–1759.
24. Muehlberger N., Schneeweis S., Hasford J. ADRs monitoring // Pharmacoepidemiology and drug safety. — 1997. — Vol. 6. — Suppl. 3. — P. 71–77.
25. Nebert D. W. Polymorphisms in drug metabolizing enzymes: what is their clinical releavance and why do they exist? // Am. J. Genet. — 1997. — Vol. 60. — P. 265–271.
26. Pchelina Sofya N., Sirotkina Olga V., Taraskina Anastasiya E., Vavilova Tatyana V., Shwartsman Alexander L., Schwartz Eugene I. The frequency of cytochrome P450 2C9 genetic variants in Russian population and their associations with individual sensitivity to warfarin therapy // Thromb Res. — 2005. — Vol. 115. — N 3. — P. 199–203.
27. Pollack A. New drug holds promise for type of breast cancer // New York Times. — June 4, 2006.
28. The case for personalized medicine / The Personalized Medicine Coalition. — November 2006, Washington. Онлайн-версия брошюры: http://www.ageofpersonalizedmedicine.org/objects/pdfs/TheCaseforPersonalizedMedicine_11_13.pdf
29. Thorn C.F., Klein T.E., Altman R.B. PharmGKB: the pharmacogenetics and pharmacogenomics knowledge base // Methods Mol. Biol. — 2005. — Vol. 311. — P. 179–192.
30. Tollman P., Guy P., Altshuler J. et al. A revolution in r&d: how genomics and genetics are transforming the biopharmaceutical industry / The Boston Consulting Group. — 2001.

# БИОКРИСТАЛЛОМНАЯ МЕТАБОНОМИКА ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЫ

**А. К. МАРТУСЕВИЧ*, С. С. АЛЕКСАНИН**, А. А. ГРИШИНА***
*** ФГУ «Нижегородский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии Росмедтехнологий»**
**** ГУ «Всероссийский центр экстремальной и радиационной медицины МЧС»**

***Резюме.*** *Исследованы биофизические свойства дегидратируемых биосред больных с термическими поражениями: собственное и инициированное базисным веществом (0,9% раствор хлорида натрия) кристаллообразование сыворотки крови 32 пациентов с ожоговой болезнью (контактный ожог, площадь поражения кожных покровов — 15–45% поверхности тела; фаза острой токсемии; возраст 21–40 лет), а также 30 практически здоровых людей сопоставимого возраста.*

*Показано, что при термической травме существенные сдвиги претерпевают все оцениваемые показатели биокристаллоскопии и импедансометрии в отношении как собственного, так и инициированного кристаллообразования сыворотки крови. Эти изменения проявляются как во временных, так и в качественных параметрах. На основании этих результатов предполагается, что визуаметрия и исследование импедансометрических характеристик динамики высыхания капель сыворотки крови являются информативным инструментом диагностики состояния пациента в комбустиологии.*

***Ключевые слова:*** *термические поражения, кровь, кристаллоскопия, импедансометрия.*

# BIOCRYSTALLOMIC METABONOMICS OF THERMAL TRAUMA

**A. K. MARTUSEVICH *, S. S. ALEXANIN**, A. A. GRISHINA***
*** Federal State Institution "Nijni Novgorod Scientific Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Rosmedtechnologies"**
**** State Institution "All-Russian Center of Extreme and Radiation Medicine, Ministry of Emergency Situations "**

***Summary.*** *Biophysical properties of dehydrated biological mediums of patients with thermal injury was investigated. Crystal formation (basic and initiated by 0.9% sodium chloride solution) in serum of 32 patients with thermal injuries and 30 healthy controls was investigated. Age of patients was 21–40 years old, the age of individuals included in control group was comparable. In patients contact burns with the surface of skin affection 15–45% were present; all them were investigated in phase of acute toxemia.*

*All the evaluated indicators were shown to be changed in patients with thermal trauma (both biocrystalloscopy and impedansometry, basic and induced). Both time and quality parameters were found to be changed. The investigations showed that both crystal properties investigation and impedansometric properties changes during the process of serum drops drying up are the informative instrument for diagnostics of patient's condition in combustiology.*

***Key words:*** *thermal injuries, serum, crystalloscopy, impedansometry.*

**Введение**

Ожоговая болезнь — сложная и многогранная совокупность патологических реакций, превалирующими среди которых на организменном уровне являются метаболические изменения [1], обусловленные массивным поступлением в системный кровоток токсических субстанций преимущественно органического строения [1–3]: промежуточные (трактуемые и обнаруживаемые как «молекулы средней массы») и терминальные (мочевина, креатинин) метаболиты [2, 4]. Их присутствие существенно трансформирует биофизические свойства биожидкостей, и исследование этих изменений использовано для оценки глубины, тяжести и степени обратимости метаболических сдвигов организма при термической травме.

При этом принципиальное значение имеет выбор условий или модельных воздействий на биосреду, биофизические свойства которой исследуется. Одним из наиболее пристально изучаемых в настоящее время вариантов является дегидратационная самоорганизация биологических субстратов [5–8]. Превалирующим подходом к расшифровке кристаллогенных свойств биоматериала служит качественное описание с фотофиксацией изображения [8, 9], тогда как количественные способы изучения биокристаллогенеза используются недостаточно [5–7]. Иные химические и физические методы в биокристалломике применяются лишь ограниченным кругом специалистов [10, 11], а характер кристаллогенных и инициирующих свойств биосубстратов пациентов с ожоговой болезнью практически не изучен [12].

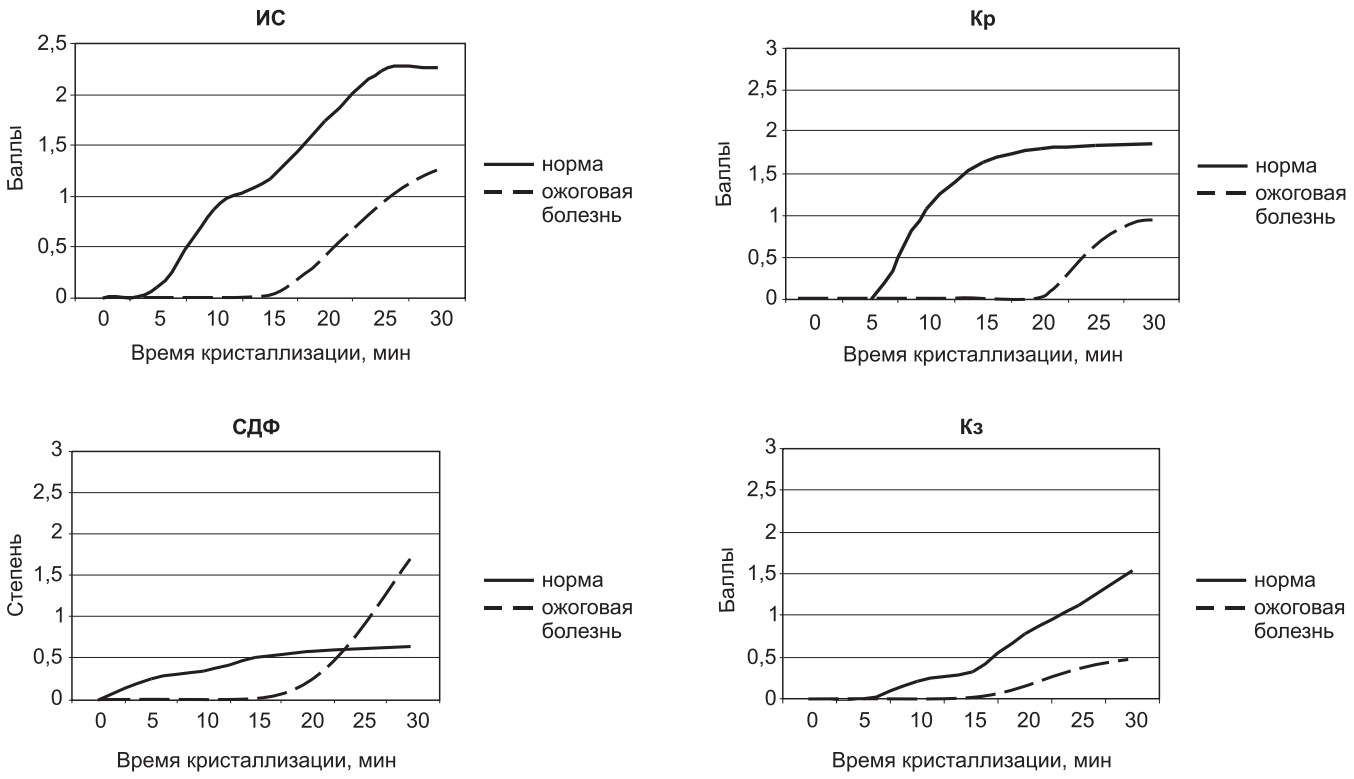



Рис. 1. Динамика основных показателей визуаметрии при свободном высушивании сыворотки крови здоровых людей и пациентов с термической травмой
(ИС — индекс структурности, Кр — кристаллизуемость, СДФ — степень деструкции фации, Кз — выраженность краевой зоны)

**Материал и методы исследования**

Нами изучено собственное и инициированное базисным веществом кристаллообразование сыворотки крови 32 пациентов с ожоговой болезнью (контактный ожог, площадь поражения кожных покровов — 15–45% поверхности тела; фаза острой токсемии; возраст 21–40 лет), а также 30 практически здоровых людей сопоставимого возраста. Препараты биосред приготавливались по собственной методике [5–7, 13]. В качестве базисного вещества для тезиграфии использовался 0,9% раствор хлорида натрия.

На протяжении всего времени высушивания микропрепаратов производилась регистрация динамики их биофизических показателей: изучение акустомеханического импеданса высыхающей капли (АМИ) с применением специального программно-аппаратного комплекса [11, 14], предоставленного ИПФ РАН, а также поминутная оценка основных количественных параметров тезиокристаллоскопии.

В спектр показателей визуаметрии микропрепаратов сыворотки крови были включены: для кристаллоскопического теста — индекс структурности, кристаллизуемость, тип взаимодействия крупных кристаллов и аморфных образований, степень деструкции фации, выраженность краевой зоны образца и др.; для тезиграфии использовались основной тезиграфический коэффициент Q, коэффициент поясности P, степень деструкции, кристалличность и относительная ширина краевой зоны микропрепарата [13].

Статистическая обработка полученных данных и корреляционный анализ выполнялись с применением электронных таблиц Microsoft Excel 2007, а также программы Primer of Biostatistics 4.03 [15].

**Результаты и обсуждение**

Результаты проведенного исследования показали, что в раннем периоде ожоговой болезни кристаллогенные свойства и инициаторный потенциал сыворотки крови претерпевают существенные преобразования (рис. 1 и 2). В соответствии с данными рисунка 1, общей тенденцией, обнаруженной относительно кристаллообразования рассматриваемой биосреды пациентов комбустиологического профиля, является значимое замедление темпов дегидратационной самоорганизации биоматериала. Так, стадия видимого начала структурообразования в высыхающих образцах биосреды практически здоровых людей начинается с 7–8 минуты (без термической стимуляции), тогда как при ожоговой болезни признаки кристаллизации обнаруживаются лишь на 17–19 минуте с момента нанесения биожидкости на стекло. Существенно отличаются также качественные и количественные характеристики кристаллоскопического образца. В частности, на протяжении всего периода наблюдения в микропрепаратах сыворот-

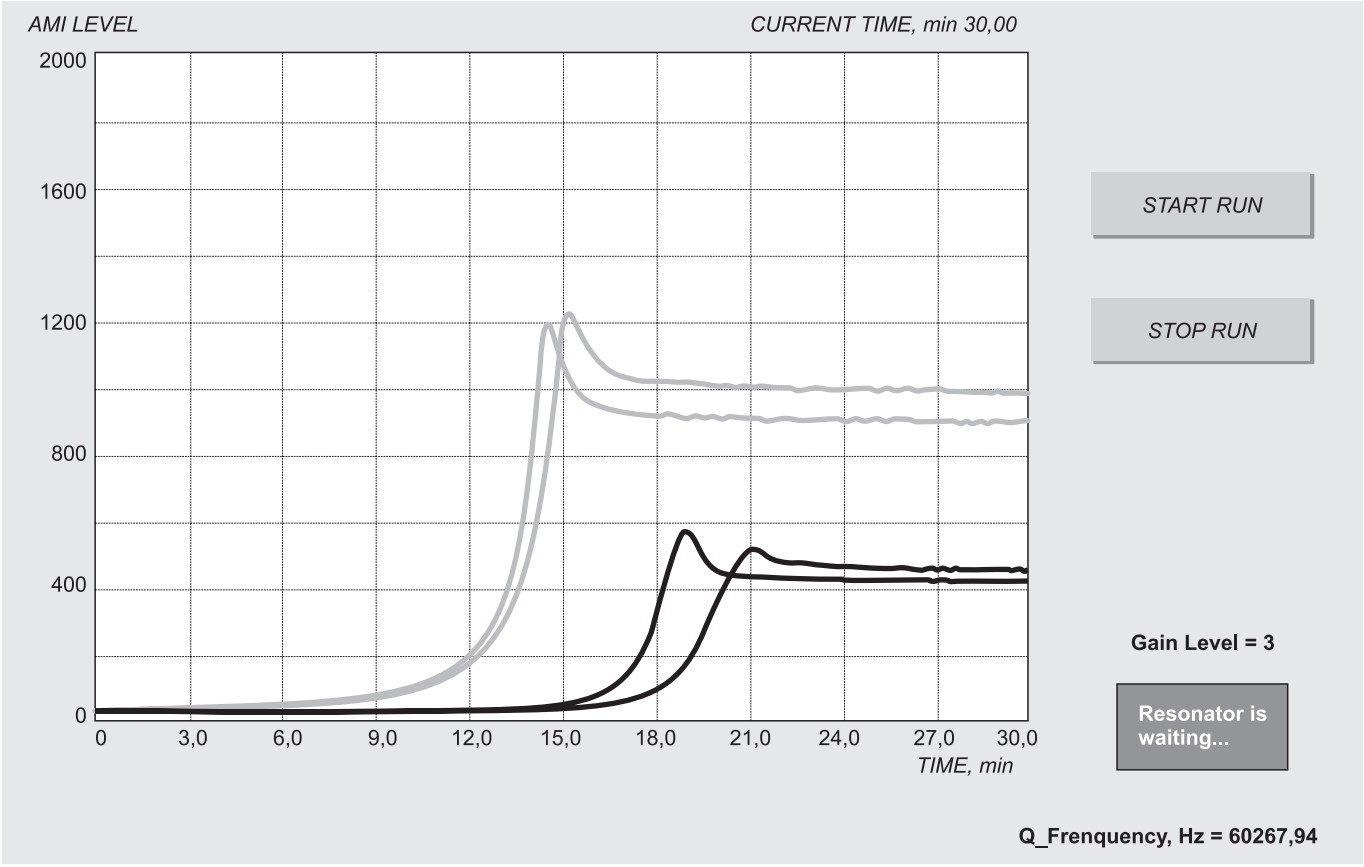



Рис. 2. Уровень акустомеханического импеданса собственной кристаллизации сыворотки крови представителей контрольной (1) и опытной (2) групп в процессе высушивания

ки крови выявлен достоверно более низкий уровень индекса структурности, кристаллизуемости и четкости краевой белковой зоны по сравнению с «паттерном», выявленным для лиц контрольной группы ($p < 0,05$).

Несколько иная динамика получена при оценке степени деструкции фаций: у пациентов с ожоговой болезнью, несмотря на значительно более позднее время начала кристаллизации, темпы нарастания деструктивных изменений несравненно выше контрольных цифр, и уже с 25-й минуты уровень данного показателя превышает значения, установленные для практически здоровых людей.

Выявленные изменения нашли отражение и при анализе АМИ-кривой представителей контрольной группы и больных с термическими поражениями (рис. 2), что служит подтверждением тезиса о замедлении темпов кристаллизации биожидкости при ожоговой болезни, а также трансформации его динамики.

Оценка инициирующих свойств биосубстрата в отношении изотонического и не изменяющего pH среды кристаллообразователя — 0,9% раствора хлорида натрия, выявила значимые преобразования динамики дегидратации биоматериала по всем основным оценочным показателям (рис. 3), вызываемые попаданием в биосреду токсических веществ [2, 4]. Очевиден их ингибирующий эффект, проявляющийся в замедлении темпов и снижении выраженности параметров, формирующих тезиграфическую фацию при ожоговой болезни по сравнению с уровнем лиц контрольной группы. Потенциальный механизм этого явления, с наших позиций, связан с тем, что при эндотоксикозе средней степени тяжести концентрация средне- и низкомолекулярных органических соединений-метаболитов стабилизирует биосреду в некристаллической форме (золь, гель). Это объясняет низкий уровень основного тезиграфического коэффициента на всем протяжении периода наблюдения. Имеющаяся у рассматриваемого контингента больных выраженная гипопротеинемия обеспечивает снижение значений коэффициента поясности и ширины краевой белковой зоны, а также может опосредовано (вследствие диспротеинемии и относительной гипопротеинемии) способствовать уменьшению инициирующих свойств биосубстрата при термической травме. Все вышеперечисленное объясняет высокие темпы и выраженность деструктивных (дестабилизационных) процессов в высыхающих каплях сыворотки крови.

Исследование импедансометрических характеристик биосреды подтвердило общую тенденцию к угнетению кристаллогенных и инициирующих свойств биожидкости при термической травме. В отношении данного метода это находит отражение во временных и амплитудных параметрах (рис. 4). Можно предполо-

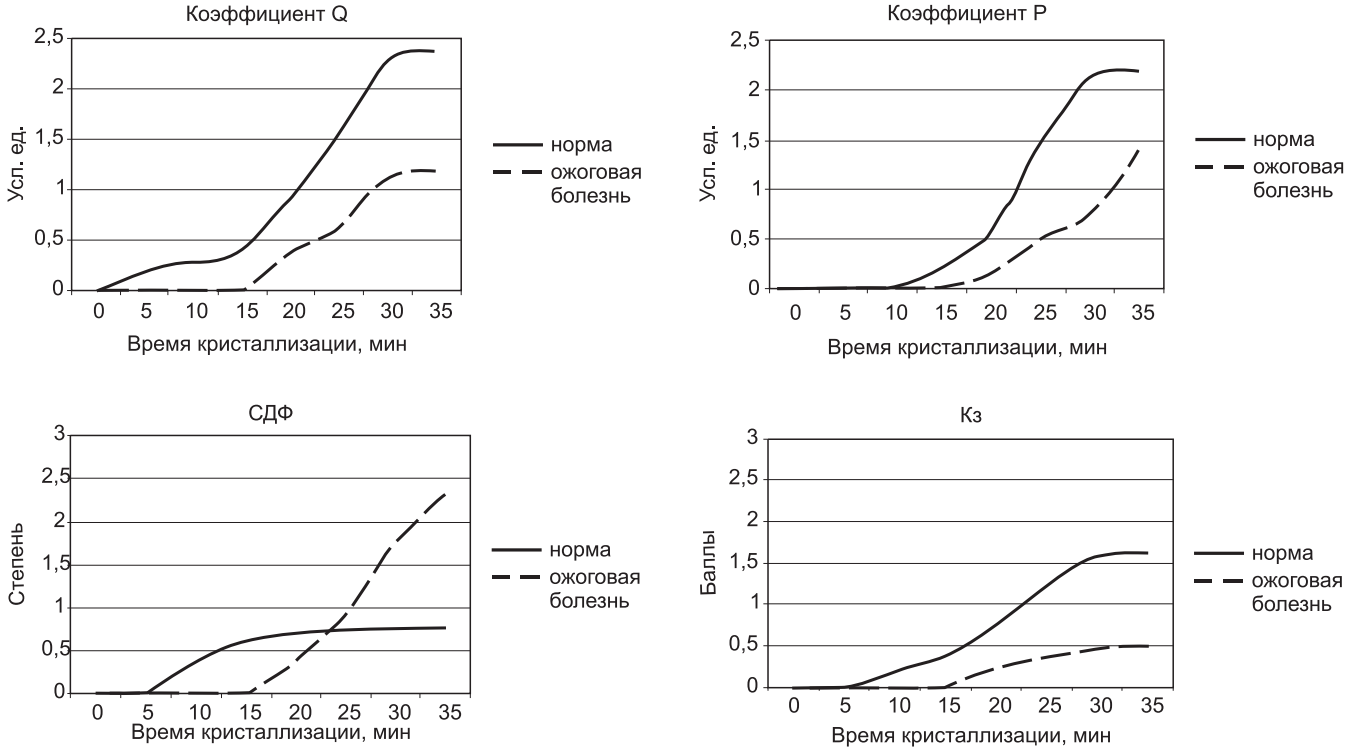



Рис. 3. Динамика основных показателей визуаметрии инициированного кристаллогенеза сыворотки крови здоровых людей и пациентов с термической травмой
(базисное вещество — 0,9% раствор хлорида натрия; СДФ — степень деструкции фации, Кз — выраженность краевой зоны)

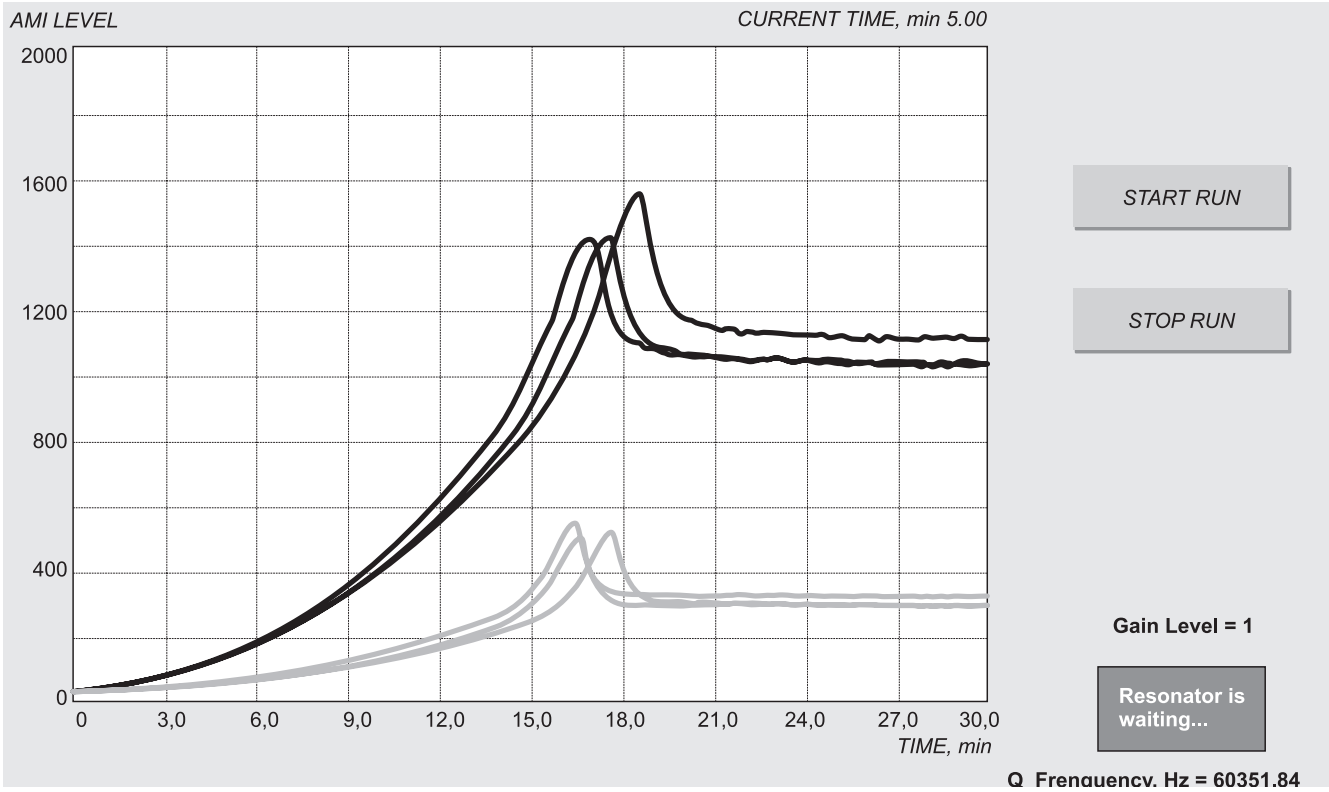



Рис. 4. Уровень акустомеханического импеданса инициированной кристаллизации сыворотки крови представителей контрольной (1) и опытной (2) групп в процессе высушивания (базисное вещество — 0,9% раствор хлорида натрия)

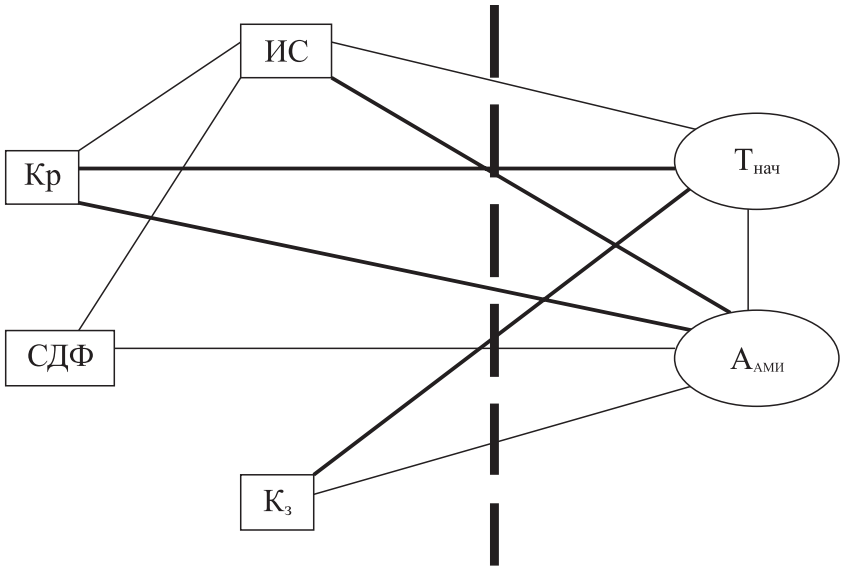



Рис. 5. Корреляционные взаимосвязи между показателями визуаметрии (обозначены прямоугольниками) и регистрации акустомеханического импеданса (обозначены овалами) кристаллоскопической фации у пациентов с термической травмой (ИС — индекс структурности, Кр — кристаллизуемость, СДФ — степень деструкции фации, Кз — выраженность краевой зоны, Тнач — время видимого начала кристаллообразования, $А_{АМИ}$ — максимальная амплитуда уровня АМИ; тонкие линии обозначают корреляции средней силы, жирные — высокой силы)

ния физико-химических характеристик изучаемого биоматериала в более поздние сроки посттермического периода, а также значимость уточнения вклада степени тяжести метаболических нарушений в изменение свободного и инициированного кристаллообразования биожидкостей организма при термических поражениях.

Все вышеперечисленное является предметом исследования новой биомедицинской синтетической науки — метабономики, сущность которой состоит в изучении возможностей мониторинга функционально-метаболического статуса человека на основании интегральной или парциальной оценки характеристик биосред. Таким образом, биофизическая метабономика ожоговой болезни посредством методов биокристаллломики способна предоставить большой объем информации о текущем состоянии пациента и его динамике, что ценно в плане первичной диагностики степени тяжести обменных нарушений и дальнейшего метаболического контроля.

жить, что появление в системном кровотоке субстратов ожоговой интоксикации (промежуточные и терминальные метаболиты) в совокупности с изменениями других компонентов биосреды изменяют его биофизические параметры, что способно найти отражение в форме кристаллодиагностики данного патологического состояния в динамике ведения пациентов рассматриваемого профиля.

Проведенный корреляционный анализ внутри и между группами показателей (визуаметрия и акустомеханический импеданс) позволил установить наличие множественных корреляционных связей средней ($r \in (0,3; 0,7)$) и высокой ($r \geq 0,7$) силы (рис. 5 и 6), что дополнительно подтверждает достоверность выделенных тенденций и согласованность изменений биофизических свойств сыворотки крови при термической травме. Эти сонаправленные сдвиги дают основание заключить, что при ожоговой болезни имеют место выраженные эндотоксикоз-зависимые перестройки состава и свойств биожидкостей [1, 2].

Отдельно необходимо подчеркнуть возможность дальнейшего преобразова-

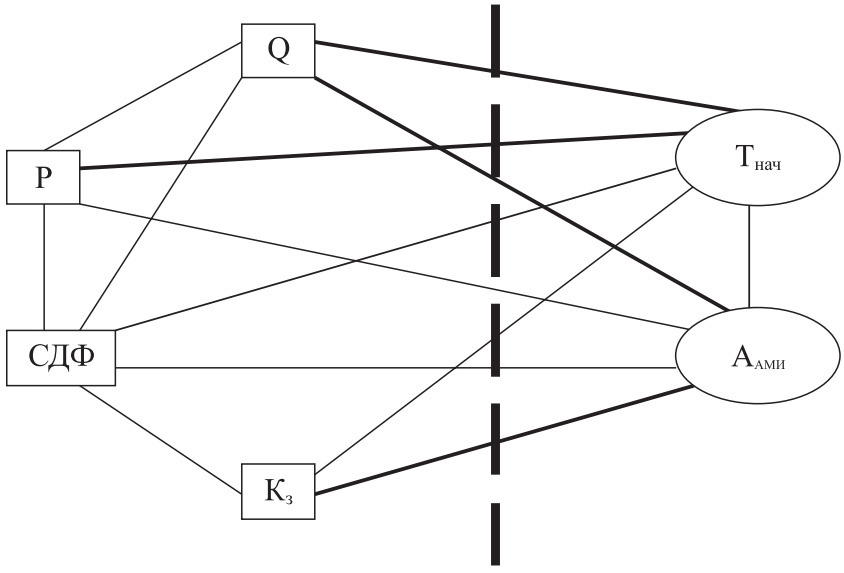



Рис. 6. Корреляционные взаимосвязи между показателями визуаметрии (обозначены прямоугольниками) и регистрации акустомеханического импеданса (обозначены овалами) тезиграфической фации у пациентов с термической травмой (базисное вещество — 0,9% раствор хлорида натрия; Q — основной тезиграфический коэффициент, Р — коэффициент поясности, СДФ — степень деструкции фации, Кз — выраженность краевой зоны, Тнач — время видимого начала кристаллообразования, $А_{АМИ}$ — максимальная амплитуда уровня АМИ; тонкие линии обозначают корреляции средней силы, жирные — высокой силы)

**Выводы**

1. Динамика дегидратационной самоорганизации сыворотки крови практически здоровых людей и больных с термическими поражениями существенно различается.
2. Установлено наличие взаимосвязей между параметрами визуаметрии и регистрации акустомеханического импеданса высыхающих капель данной биожидкости при ожоговой болезни.
3. Визуаметрия высушенных образцов биосреды и изучение ее акустомеханического импеданса способны выступить в качестве информативных инструментов биофизической метабономики термической травмы.

Авторы благодарят сотрудников лаборатории автоволновых процессов (зав. лаб. — д. ф.-м. н. В. Г. Яхно) Института прикладной физики РАН (дир. — акад. РАН А. Г. Литвак) за помощь в проведении исследований акустомеханического импеданса высыхающих образцов сыворотки крови.

**Литература**

1. Парамонов Б. А., Порембский Я. О., Яблонский В. Г. Ожоги: Руководство для врачей. — СПб.: СпецЛит, 2000. — 480 с.

2. Лифшиц Р. И., Сашенков С. Я. Среднемолекулярные пептиды крови как факторы модификации мембран эритроцитов при ожоговой болезни // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 1988. — Т. 106, № 12. — С. 666–668.

3. Ramzy P. I., Barret J. P., Herndon D. N. Thermal injury // Crit. Care Clinics. — 1999. — Vol. 15. — N 2. — P. 333–352.

4. Schlag G., Redl H. Mediators of injury and inflammation // World J. Surg. — 1996. — Vol. 20. — N 4. — P. 406–410.

5. Воробьев А. В., Мартусевич А. К., Перетягин С. П. Кристаллогенез биологических жидкостей и субстратов в оценке состояния организма. — Нижний Новгород: ФГУ «ННИИТО Росмедтехнологий», 2008. — 384 с.

6. Мартусевич А. К., Камакин Н. Ф. Кристаллография биологической жидкости как метод оценки ее физико-химических свойств // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2007. — Т. 143, № 3. — С. 358–360.

7. Мартусевич А. К., Камакин Н. Ф. Унифицированный алгоритм исследования свободного и инициированного кристаллогенеза биологических жидкостей // Клиническая лабораторная диагностика. — 2007. — № 6. — С. 21–24.

8. Шабалин В. Н., Шатохина С. Н. Морфология биологических жидкостей человека. — М.: Хризопраз, 2001. — 304 с.

9. Савина Л. В. Кристаллоскопические структуры сыворотки крови здорового и больного человека. — Краснодар, 1999. — 238 с.

10. Девяткин А. А., Шатохина С. Н., Малов В. М. с соавт. Результаты рентгеноспектрального микроанализа дегидратированных образцов водянистой влаги на различных стадиях развития старческой катаракты // Современные технологии в хирургии катаракты-2003: Сб. науч. ст. научно-практ. конф. — М., 2003. — С. 104–109.

11. Яхно Т. А., Яхно В. Г., Санин А. Г. с соавт. Белок и соль: пространственно-временные события в высыхающей капле // Журнал технической физики. — 2004. — Т. 74, вып. 8. — С. 100–108.

12. Мартусевич А. К., Перетягин С. П. Роль кристаллографии биосред при оценке эффективности лечения ожогового эндотоксикоза // Медицинская помощь. — 2008. — № 2. — С. 11–14.

13. Мартусевич А. К. Количественная оценка результата свободного и инициированного кристаллогенеза биологических субстратов. Учебное пособие. — Нижний Новгород: ФГУ «ННИИТО Росмедтехнологий», 2008. — 28 с.

14. Yakhno T. A., Yakhno V. G., Sanin A. G. et al. The informative-capacity phenomenon of drying drops // IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine. — 2004. — Vol. 24, N 2. — P. 96–104.

15. Сергиенко В. И., Бондарева И. Б. Математическая статистика в клинических исследованиях. — М.: Гэотар-медиа, 2006. — 303 с.

# МОНИТОРИНГ МИКРОБНОГО ПЕЙЗАЖА В ОТДЕЛЕНИИ ГНОЙНОЙ ХИРУРГИИ — ОСНОВА ДЛЯ РАЗРАБОТКИ РАЦИОНАЛЬНОЙ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ

**С. А. БОЖКОВА, Г. Е. АФИНОГЕНОВ, В. Л. РАЗОРЕНОВ, Т. М. ПЕТРОВА**
**ФГУ Российский НИИ травматологии и ортопедии им. Р. Р. Вредена, Санкт-Петербург**

***Резюме.*** *Изучался состав микрофлоры, выделенной из раневого отделяемого, содержимого пунктатов, отделяемого свищей пациентов отделения гнойной хирургии. Идентификацию и определение чувствительности выделенных микроорганизмов к антибиотикам осуществляли полуавтоматизированным методом. Проведенный мониторинг позволил установить спектр ведущих возбудителей раневой инфекции. На основании результатов анализа чувствительности выделенных патогенов к антибактериальным препаратам был сформирован формулярный перечень антибактериальных препаратов для эмпирической и этиотропной терапии инфекций костей и суставов.*

***Ключевые слова:*** *инфекция костей и суставов, мониторинг микрофлоры, чувствительность к антибиотикам, этиотропная терапия.*

# MICROBAL PICTURE MONITORING IN DEPARTMENT OF PURULENT SURGERY AS A BASE OF RATIONAL ANTIBACTERIAL THERAPY

**S. A. BOJKOVA, G. E. AFINOGENOV, V. L. RAZORYONOV, T. M. PETROVA**
**State Institution Russian R. R. Vreden Scientific Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Saint-Petersburg**

***Summary.*** *The microbial content of the wounds and fistules excudates and puncture fluids in patients of purulent surgery department. Identification of the microorganisms and determination of their sensitivity to antibiotics were performed by the partly automatic method. The monitoring gave possibility to determine the spectrum of the leading causative agents of the wound infection.*

*Basing on the results of sensitivity determination of the pathogens to antibacterial drugs the list of antibacterial drugs for empiric and ethiotropic therapy of bone and joints infections was worked out.*

***Key words:*** *bone and joints infections, microbial monitoring, sensitivity to antibiotics, antibacterial treatment.*

Проблема оптимизации использования антибактериальных препаратов в настоящее время приобрела особую актуальность, что обусловлено растущей резистентностью микрофлоры практически ко всем существующим группам антибиотиков. С одной стороны, это обусловлено значительными затратами на закупку антибактериальных средств на фоне недостатка финансирования ЛПУ в целом. С другой стороны, даже при наличии достаточного количества средств они не всегда используются рационально, так как не всегда самое дорогое лекарство является наиболее эффективным [7]. Одним из направлений развития и внедрения передовых технологий для лечения раневой инфекции является сотрудничество клиницистов со специалистами по клинической бактериологии и клинической фармакологии. Клиническая бактериология в данном случае является базисом не только для выбора рациональной антибактериальной терапии, но и для перспективной разработки новых противомикробных средств и методов их использования в лечении хирургических инфекций. Целью микробиологической диагностики, как и любого другого вида лабораторных исследований, является получение информации, необходимой для лечебного процесса [5].

Лечение инфекционно-воспалительных процессов принципиально отличается от терапии других болезней, где рассматривается обычно взаимодействие: организм пациента — лекарство. При назначении антибактериальных препаратов в этом взаимодействии обязательно участвует третья сторона — микробный агент. В связи с этим при лечении инфекционно-воспалительных процессов имеется ряд особенностей [1]:

1. Эффективность антибиотиков зависит от резистентности к ним микрофлоры, а следовательно, от частоты использования антибактериальных препаратов в отдельно взятом ЛПУ, иными словами — лечение конкретного больного зависит от того, чем лечат окружающих его пациентов;
2. Достаточно сложно предсказать эффективность назначаемого препарата, так как во многом это зависит от спектра возбудителей, но не исключает влияния таких факторов как возраст, тяжесть течения заболевания, сопутствующие патологии;
3. Назначение дешевых антибиотиков не определяет низкую стоимость лечения, а назначение дорогих препаратов не гарантирует их эффективность у данного пациента.

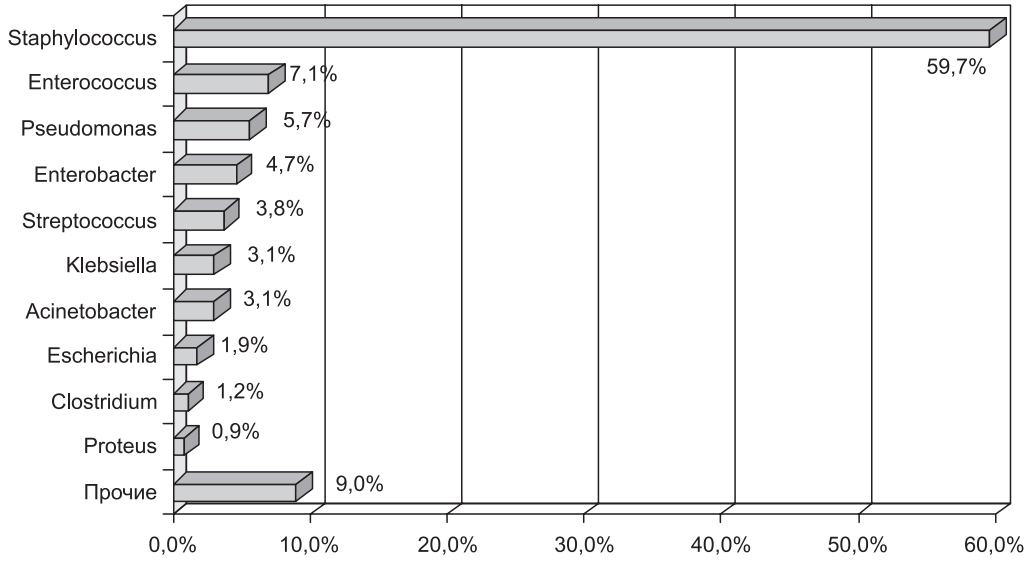



Рис. 1. Групповой спектр микроорганизмов, выделенных из раневого отделяемого в 2007 г.

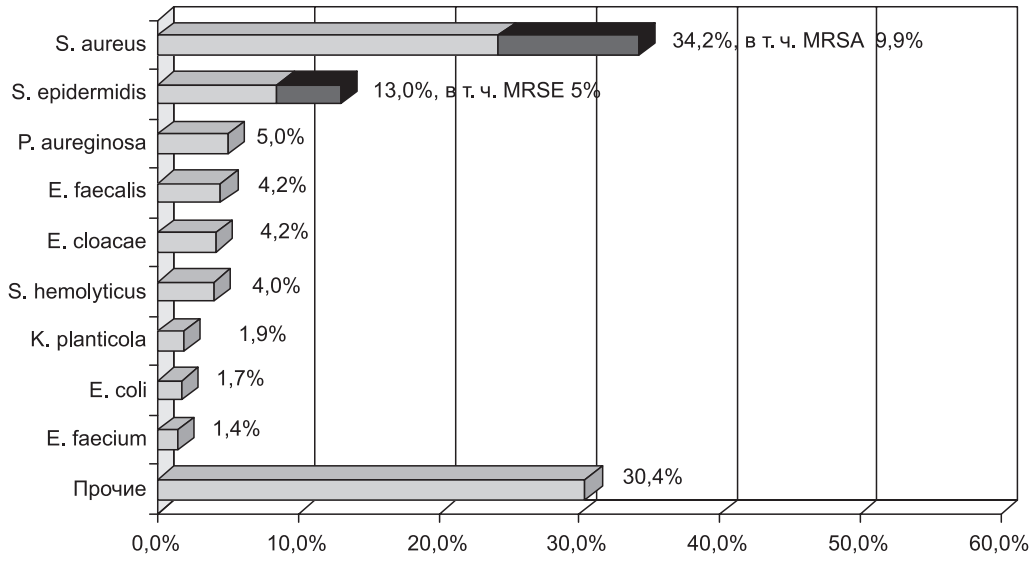



Рис. 2. Видовой спектр микроорганизмов, выделенных из раневого отделяемого в 2007 г.

Таким образом, для проведения эффективной антибактериальной терапии необходим постоянный мониторинг этиологических факторов инфекции. Публикуемые данные о многоцентровых исследованиях резистентности микрофлоры к антибактериальным препаратам представляют интерес скорее с фармакоэпидемиологических позиций, тогда как с позиции практического применения необходимо иметь собственные данные о спектре выделяемой микрофлоры и её резистентности не только в отдельно взятом стационаре, но и отделении [2].

Основная цель настоящего исследования заключается в формировании перечня антимикробных препаратов для лечения инфекций костей и суставов в отделении гнойной хирургии стационара ортопедо-травматологического профиля на основе микробиологического мониторинга и анализа антибиотикорезистентности ведущей микрофлоры.

**Материалы и методы**

В исследование включено 485 штаммов микроорганизмов, выделенных из раневого отделяемого, пунктатов, отделяемого из свищей 291 пациента отделения гнойной хирургии в 2007 г. В исследование включены пациенты с послеоперационными глубокими ИОХВ (инфекция области хирургического вмешательства) — в основном это инфекции протезированных суставов, а также пациенты с хроническим посттравматическим

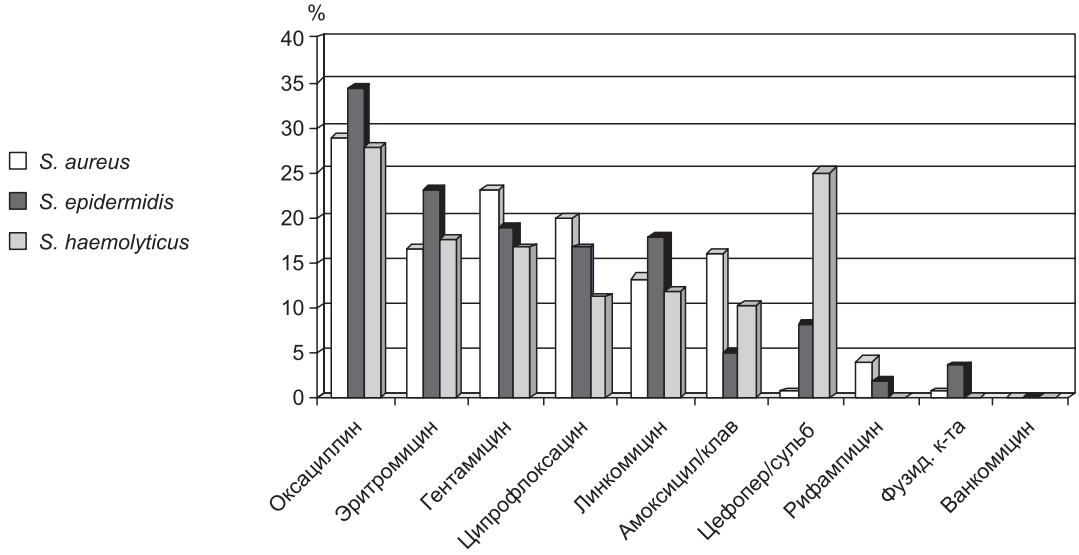



Рис. 3. Резистентность (%) госпитальных штаммов *S. aureus* и *S. epidermidis* в 2007 г.

и постоперационным остеомиелитом. Надо отметить, что по ряду параметров, важных с точки зрения антибактериальной терапии, имеется определенное сходство между инфекциями костей, суставов и раневой инфекцией [2], в связи с чем мы намеренно не проводили разделение пациентов на группы ИОХВ и хронического остеомиелита. Это в первую очередь обусловлено тем, что основными источниками микроорганизмов, попадающих в раны, являются окружающая среда (воздух и предметы, наносящие механические повреждения) и кожа, что делает схожим спектр этиологически значимой микрофлоры. В то же время, несмотря на преобладание Гр(+) микрофлоры в этиологии инфекции протезированных суставов и остеомиелитов, при хронических остеомиелитах возбудителями могут быть Гр(–) бактерии и микробные ассоциации [10].

Идентификацию и определение чувствительности выделенных микроорганизмов к антибиотикам осуществляли полуавтоматизированным методом на планшетном микрофотометре iEMS RM (Labsistems, Финляндия), включающем программу «Система микробиологического мониторинга “Микроб-2” и “Микроб-Автомат”».

## Результаты и обсуждение

Лидирующие позиции в спектре возбудителей инфекции костей и суставов (рис. 1 и 2) принадлежали группе стафилококков (59,7%), в том числе 34,2% — *S. aureus*, 13% — *S. epidermidis*, 1,9% — *S. haemolyticus*. Распространенность резистентных к оксациллину штаммов была 28,9% и 38,3% для *S. aureus* и *S. epidermidis* соответственно. Наиболее активными в отношении данных микроорганизмов были ванкомицин, амоксициллин/клавуланат, ципрофлоксацин, фузидиевая кислота и рифампицин (рис. 3). Устойчивость к оксациллину несколько чаще встречалась среди коагулазонегативных стафилококков (38,3%), чем *S. aureus* (28,9%), так же как к эритромицину (25% и 16,5% соответственно).

*Таблица 1*

**Резистентность (%) госпитальных штаммов *S. aureus*, *S. epidermidis* и *S. haemolyticus* в 2007 г.**

| Название лекарственного средства | Уровень резистентности (%) | | |
|---|---|---|---|
| | *S. aureus* (n = 145) | *S. epidermidis* (n = 55) | *S. haemolyticus* (n = 17) |
| Ванкомицин | 0 | 0 | 0 |
| Фузидиевая кислота | 0,7 | 3,6 | 0 |
| Рифампицин | 4,1 | 1,8 | 0 |
| Амоксициллин/клавуланат | 16,0 | 4,8 | 14,3 |
| Ципрофлоксацин | 20 | 16,7 | 0 |
| **Оксациллин** | **28,9** | **34,5** | **27,8** |
| **Гентамицин** | **23,2** | **18,8** | **16,7** |
| **Эритромицин** | **16,5** | **23,2** | **17,6** |

Доля *Enterococcus spp.* составила в этиологии инфекции костей и суставов 7,1%, из них 63,4% — штаммы *E. faecalis*, остальные — *E. fecium*. Наиболее активными в отношении энтерококков (рис. 4) были ванкомицин, имипенем/циластатин. Амоксициллин/клавуланат был более активен в отношении *E. faecalis*. В целом штаммы *E. faecium* отличались более высокой резистентностью к иссле-

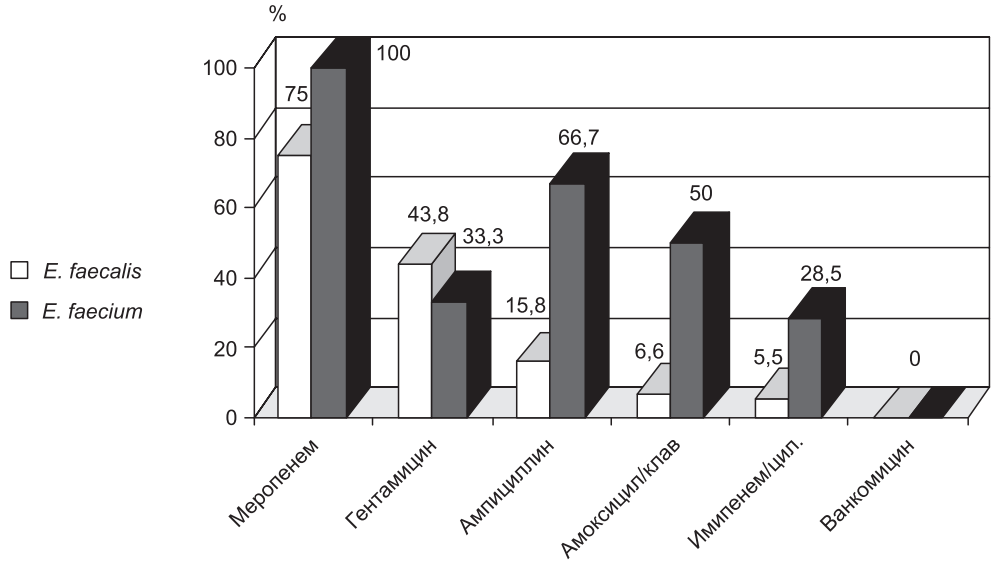



Рис. 4. Резистентность (%) госпитальных штаммов E.faecalis и E.faecium в 2007 г.

дуемым антибактериальным препаратам, что полностью соответствует данным литературы [11].

Представители семейства энтеробактерий выделены из биологического материала в 9,7% случаев (рис. 2), в том числе штаммы *E. cloacae* — 4,2%, *E. coli* — 1,7%, *K. planticola* — 1,9%. Высокая резистентность изолятов *E. cloacae* отмечена к ампициллину, амоксициллину/клавуланату, доксициклину (табл. 2). Наибольшая активность выявлена у ципрофлоксацина, цефоперазона/сульбактама и карбопенемов, сохраняется хорошая чувствительность выделенных штаммов *E. cloacae* к цефалоспоринам III поколения. Выделенные изоляты *E. coli* обладают наибольшей резистентностью к ампициллину и амоксициллину/клавуланату. Максимально активным в отношении *E. coli* был цефоперазон/сульбактам, к которому были чувствительны все штаммы данного микроорганизма. Большинство штаммов *E. coli* было чувствительно к цефалоспоринам III поколения и аминогликозидам. Обращает на себя внимание высокая резистентность штаммов *K. planticola*, выделенных из раневого отделяемого. Наибольшую активность против них сохраняют карбапенемы, цефоперазон/сульбактам, доксициклин.

*Таблица 2*

**Резистентность (%) госпитальных штаммов семейства *Enterobacteriacae* в 2007 г.**

| Название лекарственного средства | Уровень резистентности (%) | | |
|---|---|---|---|
| | *E. cloacae* (n = 18) | *E. coli* (n = 13) | *K. planticola* (n = 8) |
| Ампициллин | 66,7 | 87,5 | 100 |
| Амоксициллин/клавуланат | 62,5 | 85,7 | 75 |
| Цефотаксим | 19,3 | 0 | 100 |
| Цефтриаксон | 19,9 | 28,6 | 100 |
| Цефоперазон | 20 | 37,5 | 100 |
| Цефтазидим | 22,2 | 0 | 77,8 |
| Цефоперазон/сульбактам | 11,1 | 12,5 | 25 |
| Имипенем/циластатин | 0 | 0 | 0 |
| Меропенем | 0 | 0 | 0 |
| Ципрофлоксацин | 0 | 48,2 | 100 |
| Доксициклин | 60 | 0 | 20 |
| Амикацин | 0 | 12,5 | 75 |
| Нетилмицин | 13,3 | 14,3 | 100 |
| Гентамицин | 15 | 25 | 100 |

Группа неферментирующих микроорганизмов в спектре ведущей микрофлоры представлена *P. aeruginosa* (2,1%) (рис. 2). Выделенные штаммы синегнойной палочки отличались высоким уровнем резистентности к цефалоспоринам III–IV поколений, ципрофлоксацину, гентамицину (рис. 5). Наиболее активными в отношении *P. aeruginosa* являлись амикацин, цефоперазон.

**Обсуждение и заключение**

Надо отметить, что, как правило, антибактериальная терапия инфекции костей и суставов, глубокой ИОХВ и хронического остеомиелита имеет ряд особенностей:

1. Эффективна только в сочетании с хирургическим лечением, т. к. инфицированные, лишенные кровоснабжения костные фрагменты недоступны действию препаратов [10], а наличие имплантанта на фоне развивающегося гнойно-септического процесса является дополнительным фактором риска как генерализации, так и хронизации инфекции.

2. Является этиотропной, т. к. проводится целенаправленно против установленного возбудителя инфек-

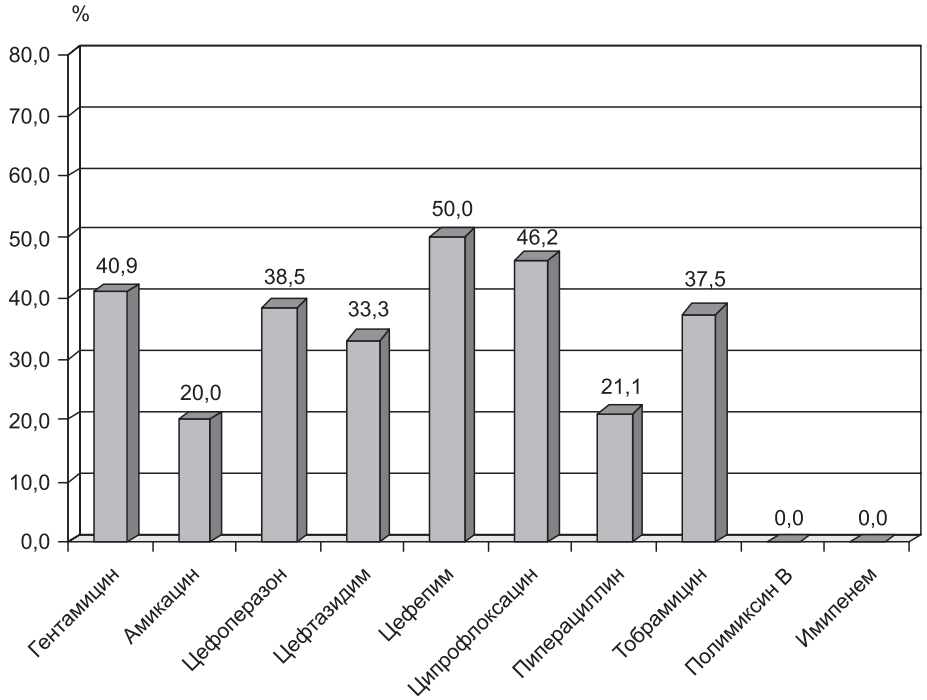



Рис. 5. Резистентность (%) госпитальных штаммов *P. aeruginosa* в 2007 г.

ции и его чувствительности к препарату [8], исключения составляют тяжелые септические состояния, когда от скорости назначения адекватной антибактериальной терапии зависит жизнь пациента [10].

3. Должна быть системной и длительной — при инфекции протезированных суставов 4–6 недель, хроническом остеомиелите — иногда более 3 мес. [8].

С учетом полученных результатов бактериологического мониторинга и анализа антибиотикорезистентности определен перечень антибактериальных препаратов для этиотропной терапии ГИОХВ (гнойной инфекции области хирургического вмешательства) и хронического остеомиелита (рис. 6).

**Бета-лактамные антибиотики**

***Пенициллины***

Среди всех антибактериальных препаратов β-лактамные антибиотики характеризуются наибольшим уровнем активности в отношении стафилококков и стрептококков. Различий в клинической эффективности пенициллиназоустойчивых (оксациллин) и ингибиторозащищенных пенициллинов, а также цефалоспоринов и карбапенемов не описано [5]. Однако, учитывая необходимость введения высоких доз оксациллина (8–12 г/сут) и его худшую переносимость, предпочтение было отдано цефалоспоринам I–II поколения и амоксициллину/клавуланату.

Амоксициллин/клавуланат за счет своего более широкого спектра и указанной выше чувствительности к нему ряда микроорганизмов может применяться при инфекциях, вызванных не только метициллинчувствительными стафилококками, но и *E. faecalis*.

***Цефалоспорины (ЦП)***

С учетом того, что до настоящего времени наиболее частым возбудителем раневой инфекции в данном стационаре являются именно стафилококки, основным препаратом для проведения антибактериальной профилактики раневой инфекции остается цефазолин, что не противоречит существующим рекомендациям [3, 4, 7]. При проведении нейрохирургических операций препаратом выбора для периоперационной профилактики рекомендован цефуроксим. В случаях развития раневой инфекции на фоне антибиотикопрофилактики указанными препаратами, они сразу исключаются из дальнейшей антибактериальной терапии.

Из большого перечня ЦП III поколения, на наш взгляд, преимущество имеет цефтриаксон, который за счет своих фармакокинетических свойств (введение 1 раз в сутки) снижает затраты труда медицинского персонала и более комфортен для пациента [9]. Отдельной группой стоят цефалоспорины с антисинегнойной активностью — цефтазидим, цефоперазон. Эти препараты отнесены к группе резерва и их назначение проводится только после консультации с клиническим фармакологом. Основными показаниями для назначения препаратов этой группы являются выделение из раневого отделяемого, отделяемого свища *P. aeruginosa*, *E. cloacae*, *E. coli* с доказанной бактериологически чувствительностью к данным препаратам. Единственным представителем группы ингибиторозащищенных ЦП

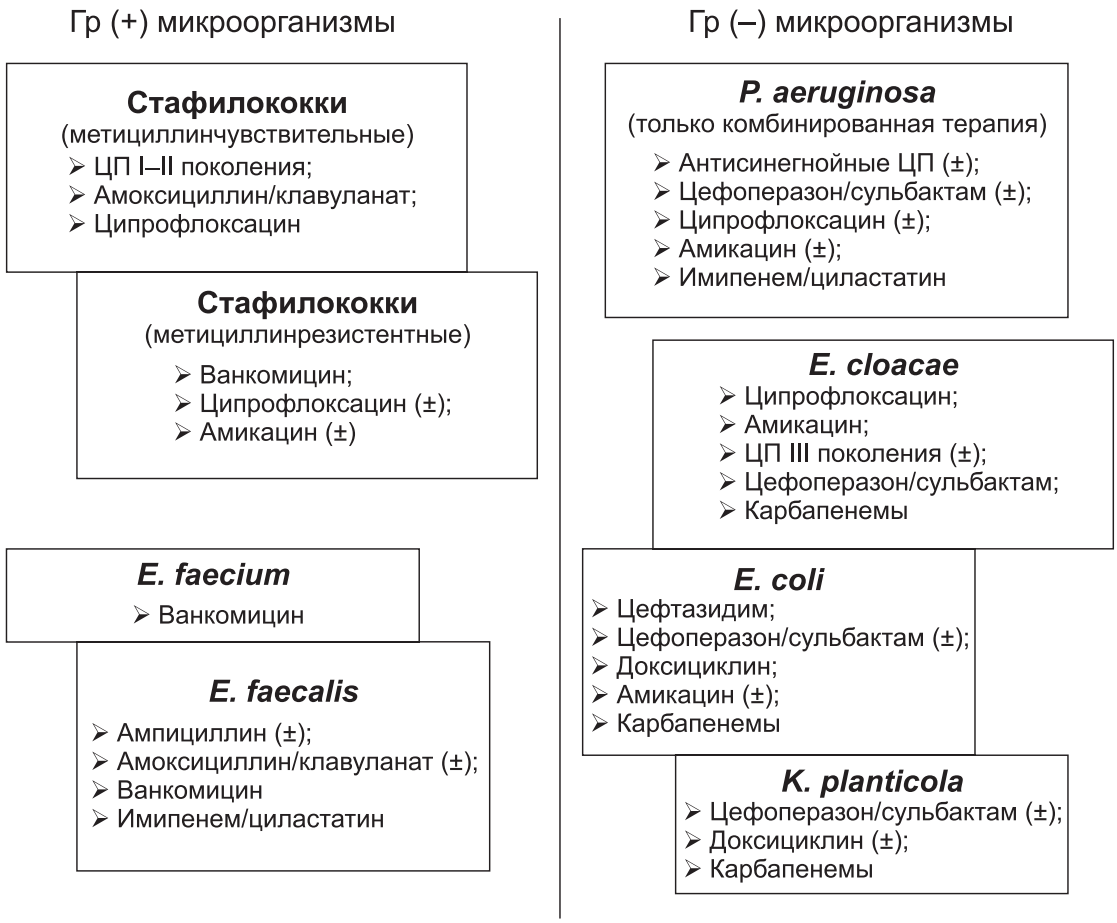



Рис. 6. Перечень антибактериальных препаратов для этиотропной терапии инфекций костей и суставов в отделении гнойной хирургии

является цефоперазон/сульбактам. По результатам проведенного анализа резистентности данный препарат сохраняет хорошую активность в отношении *K. planticola*. Кроме того, цефоперазон/сульбактам является препаратом выбора при развитии инфекционного процесса, вызванного *Acinetobacter spp.* за счет антибактериальной активности сульбактама.

***Карбапенемы***

Остаются препаратами выбора при тяжелых септических состояниях для эмпирической терапии:

— меропенем — при инфекциях, затрагивающих ЦНС (вентрикулит, менингит), развивающихся после хирургических вмешательств на голове, шейном отделе позвоночника;

— имепенем/циластатин — при инфекциях протезированных суставов; в случае острой клинической ситуации (открытые переломы с обширным повреждением мягких тканей).

Кроме того, назначение карбапенемов возможно при хронических процессах, вызванных Гр(–) микроорганизмами при доказанной бактериологически резистентности других антибактериальных препаратов.

**Фторхинолоны**

Фторхинолоны характеризуются широким спектром антимикробного действия, высокой бактерицидной активностью и хорошей фармакокинетикой [8]. Наибольшую активность сохраняет ципрофлоксацин, который, при наличии одинаковой чувствительности, к примеру, с ЦП III поколения, назначать предпочтительнее в силу его лучшей способности проникать в костную ткань, хорошей переносимости, возможности «ступенчатой терапии», что немаловажно при необходимости назначения длительного курса антибактериальной терапии.

**Гликопептиды**

В данном стационаре до настоящего времени ванкомицин полностью сохраняет свою активность в отношении стафилококков и энтерококков и является препаратом выбора при терапии инфекций, вызванных *E. aecium*, *E. faecalis* (резистентными к ампициллину и амоксициллину/клавуланату), а также метициллинрезистеными стафилококками (при отсутствии у них чувствительности к фторхинолонам).

**Аминогликозиды**

Основное клиническое значение аминогликозиды имеют при лечении нозокомиальных инфекций, вызванных аэробными грамотрицательными возбудителями [8]. Из этой группы рекомендован к использованию амикацин, но не в качестве монотерапии, а в комбинированной терапии тяжелых или рецидивирующих инфекций, в сочетании с препаратами других групп.

**Тетрациклины**

Тетрациклины считаются антимикробными препаратами широкого спектра, однако в процессе их многолетнего использования многие бактерии приобрели к ним резистентность. При бактериологически подтвержденной активности можно использовать доксициклин для комбинированной антибактериальной терапии хронических остеомиелитов. Данный препарат превосходит тетрациклин по своим фармакокинетическим свойствам: обладает большей биодоступностью при приеме внутрь, независимой от приема пищи; создает более высокие концентрации в тканях, в том числе костной; имеет более длительный период полувыведения; лучше переносится пациентами [8].

**Антианаэробные препараты**

Несмотря на то, что анаэробная флора не является ведущей в этиологии раневой инфекции и инфекций костей и суставов, наличие у пациента при поступлении инфицированной раны с обширным повреждением мягких тканей является показанием для назначения антианаэробных препаратов (метронидазол) или препаратов с антианаэробной активностью. В зависимости от тяжести состояния пациента это могут быть: амоксициллин/клавуланат, цефоперазон/сульбактам или карбапенемы.

## Заключение

Обобщая полученные данные, необходимо отметить, что ведущую позицию в этиологической структуре ГИОХВ и хронических остеомиелитов в отделении гнойной хирургии занимает грамположительная флора (70,6%), доля грамотрицательных микроорганизмов составила 26,6%, доля анаэробов — 1,9% случаев, штаммы дрожжеподобных грибов рода *Candida* — 0,9%. Микробные ассоциации, содержащие 2 и более культуры микроорганизмов в этиологически значимых количествах, выделены в 22,7% случаях.

Таким образом, в случае острой клинической ситуации (выраженный лейкоцитоз или лейкопения на фоне фебрильной лихорадки и признаков эндогенной интоксикации) сразу должна быть назначена эмпирическая антибактериальная терапия. По результатам проведенного исследования препаратами для нее могут быть сульперазон/сульбактам или карбапенемы, возможно, в сочетании с ванкомицином. После получения результатов бактериологического исследования, обычно на 3–5 сутки, эмпирическую терапию меняют на этиотропную.

При отсутствии выраженных признаков гнойного процесса и интоксикации назначение антибактериальной терапии без хирургического лечения является нерациональным и неэффективным. Применение противоинфекционных препаратов в таких случаях должно быть основано на результатах бактериологического исследования раневого, свищевого отделяемого, содержимого пунктата, в случае хронического остеомиелита — полученной интраоперационно костной ткани.

Благодаря микробиологическрму мониторингу можно оптимизировать использование антимикробных препаратов, снизить процент неблагоприятных исходов лечения инфекций и повысить выживаемость больных.

**Литература**

1. Богданов М. Б., Черненькая Т. В. Алгоритмы и организация антибиотикотерапии. — М.: Издательский дом Видар-М, 2004. — 224 с.

2. Ефименко Н. А., Гучев И. А, Сидоренко С. В. Инфекции в хирургии. Фармакотерапия и профилактика: Монография. — Смоленск, 2004. — 296 с.

3. Манграм А. Дж с соавт. Профилактика инфекции в области хирургического вмешательства: Руководство HICPAC (Консультативного комитета по контролю госпитальной инфекции США) // Клиническая микробиология и антимикробная терапия. — 2003. — Т. 5, № 1.

4. Руководство по инфекционному контролю в стационаре: Пер. с англ. / Под ред. Р. Венцеля, Т. Бревера, Ж-П. Бутцлера. — Смоленск: МАКМАХ, 2003. — 272 с.

5. Сидоренко С.В. Микробиологические аспекты хирургических инфекций // Инфекции в хирургии. — 2003. — № 1. — С. 22–27.

6. Страчунский Л. С. с соавт. Рекомендации по оптимизации антимикробной терапии нозокомиальных инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями в отделениях реанимации и интенсивной терапии: Пособие для врачей / Л. С. Страчунский, Г. К. Решедько, Е. Л. Рябкова и др. — Смоленск: Боргес, 2002. — 22 с.

7. Федеральное руководство по использованию лекарственных средств (формулярная система). Выпуск V / Под ред. А. Г. Чучалина, А. И. Вялкова, Ю. Б. Белоусова, В. В. Яснецова. — М.: Эхо, 2004. — 944 с.

8. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / Под ред. Л. С. Страчунского, Ю. Б. Белоусова, С. Н. Козлова. — Смоленск: МАКМАХ, 2007. — 464 с.

9. Хвещук П. Ф., Рудакова А. В. Основы доказательной фармакотерапии. — СПб., 2000. — 235 с.

10. Хирургические инфекции / Под ред. И. А. Ерюхина, Б. Р. Гельфанда, С. А. Шляпникова. — М.: Литтерра, 2006. — 736 с.

11. The Sanford guide to antimicrobial therapy 35-th edition, 2005. — P. 51–53.

# СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ ДИАГНОСТИКИ МОЧЕПОЛОВОЙ ХЛАМИДИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ

**А. Л. ПОЗНЯК*, С. Н. СИДОРЧУК*, Л. Б. ДРЫГИНА**, Т. В. ГОРЕЙКО***
*** Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова МО РФ**
**** ФГУЗ Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А. М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург**

***Резюме.*** *Анализируется собственный опыт диагностики хламидийной инфекции, а также приводятся данные других исследователей по этой проблеме. Представлены современные сведения по иммунофлюоресценции, иммуноферментному анализу, молекулярно-биологическим методам диагностики, культуральному исследованию, определению серотипов и молекулярно-биологических характеристик C. trachomatis, применяющимся в диагностике инфицирования. Для достоверной диагностики хламидиоза необходим комплекс лабораторных методов, позволяющих выявить возбудителя и стадию заболевания.*

***Ключевые слова:*** *хламидийная инфекция, диагностика, Chlamydia trachomatis.*

# MODERN ASPECTS OF UROGENITAL CHLAMYDIA DIAGNOSIS

**A. L. POZNYAK*, S. N. SIDORCHUK*, L. B. DRIGINA**, T. V. GOREIKO***
*** S. M. Kirov Military Medical Academy Federal State Health Care Institution**
**** "All-Russian A. M. Nikiphorov Center of Extreme and Radiation Medicine, Russian Ministry of Emergency Situations" Saint-Petersburg**

***Summary.*** *Author's experience of Chlamydia infection diagnosis is analyzed, the results obtained by other investigators are also discussed. Modern information is given, which concerns different methods used in infection diagnosis: immune fluorescence, immune enzyme analysis, molecular biological methods of diagnostics, cultural investigation, determination of serotypes and molecular biological characteristics of C. trachomatis. For precise diagnosis of chlamydiosis the complex of laboratory methods is necessary, these methods should give possibility both to determine the pathogen and evaluate the stage of the disease.*

***Key words:*** *Chlamydia infection, diagnostics, Chlamydia trachomatis.*

**Введение**

В структуре инфекционной патологии человека значительное место принадлежит хламидийной инфекции. Распространенность хламидийной инфекции в популяции варьирует от возраста, при этом наиболее высокая заболеваемость отмечается у лиц моложе 25 лет. Так, заболеваемость лиц в этом возрасте в Великобритании составляет 940‰, в Швеции 1000 ‰, а в США — 2500 на 100 000 населения. В течение последних лет в Российской Федерации заболеваемость урогенитальной хламидийной инфекцией вышла на первое место среди всех бактериальных инфекций, передаваемых половым путем, и составила в 2007 году 91,1 на 100 000 населения [25, 41, 42]. Однако эти цифры скорее отражают неполную регистрацию заболевания, чем реальную заболеваемость по стране. Выборочные исследования в отдельных регионах нашей страны свидетельствуют о том, что заболеваемость мочеполовым хламидиозом в настоящее время составляет не менее 250‰. На сегодняшний день в России урогенитальный хламидиоз — вторая по распространенности регистрируемая инфекция, передаваемая половым путем (ИППП) после трихомоноза [1, 22, 27]. За последнее десятилетие хламидийная инфекция (ХИ) как причинный фактор различных заболеваний человека стала объектом всестороннего изучения. Клинический спектр хламидийной инфекции включает более 20 синдромов и патологических состояний, которые зависят от времени инфицирования, локализации очагов поражения, выраженности местных и общих реакций макроорганизма. Многообразие клинических форм инфекционного процесса является причиной того, что ими занимаются различные специалисты: урологи, дерматовенерологи, акушеры-гинекологи, педиатры, оториноларингологи, офтальмологи, терапевты общего профиля и пульмонологи, невропатологи, ревматологи, инфекционисты и другие [17, 28, 35]. Это обстоятельство в значительной мере способствует разрозненности информации о различных клинических аспектах данной сложной инфекционной патологии [18, 40]. В настоящее время в России нет единого центра (органа), объединяющего усилия многочисленных организаций-производителей тест-систем, диагностикумов, ингредиентов и

потребителей — лабораторий и диагностических центров, осуществляющих постановку реакций, специалистов, разрабатывающих новые способы детекции возбудителя ХИ, а также врачей-клиницистов. Следует также отметить, что ежегодно в России количество лабораторных исследований, связанных с детекцией возбудителей ИППП и установлением диагноза, составляет несколько десятков миллионов анализов. Естественно, такой объем исследований требует значительных экономических, физических затрат и организационных мероприятий. Вместе с тем определенная часть лабораторных исследований не является научно обоснованной и может быть без какого-либо ущерба сокращена. Отсутствие нормативных алгоритмов обследования и ведения пациентов также является одной из причин недостоверных результатов при оценке эпидемической ситуации в различных регионах и в стране в целом. На сегодняшний день имеется не один десяток руководств и пособий по диагностике и лечению хламидийной инфекции, позволяющих получить представление как о спектре методических приемов, используемых в России и за рубежом, так и о проведении отдельных лабораторно-диагностических процедур. Однако большинство из них предоставляет сведения о принципах и стандартных возможностях различных методологий, но не ставит целью систематизированное освещение наиболее вероятных причин снижения эффективности лабораторной и, как следствие, клинической диагностики хламидиоза (в том числе и распространенных форм данной инфекции), которое часто встречается в практической работе лечебно-профилактических учреждений (ЛПУ) и снижает качество оказания медицинской помощи [5, 31].

### Показания к назначению обследования на мочеполовой хламидиоз

Обязательному обследованию на урогенитальный хламидиоз подлежат: больные с острым и хроническим воспалением органов малого таза (цистит, простатит), хроническими воспалительными заболеваниями мочеполовой системы (женщины — прежде всего с наличием поражения шейки матки); нарушениями менструального цикла по типу метроррагии, больные с бесплодием неясного генеза в анамнезе в течение 2–3 лет (как у женщин, так и у мужчин); пациентки с привычным невынашиванием; беременные с отягощенным акушерским анамнезом (неразвивающаяся беременность, самопроизвольные выкидыши, преждевременные роды, рождение детей с низкой массой тела, многоводие) и с осложненным течением данной беременности (угроза прерывания, многоводие, плацентит и т.д.), новорожденные при наличии диагностированной хламидийной инфекции у матери, женщины, планирующие прерывание беременности, перед проведением лечебных и диагностических выскабливаний слизистых оболочек шейки и тела матки, при других внутриматочных вмешательствах, при использовании внутриматочной контрацепции, обследовании доноров эякулята [29].

Кроме того, анализ на наличие *C.trachomatis* назначают с целью уточнения этиологии заболевания в следующих ситуациях: выявление хламидий у ВИЧ-инфицированных лиц, больных с недифференцированным артритом, хроническим конъюнктивитом, синдромом «сухого» глаза, лихорадкой неясного генеза, с вторичными иммунодефицитными состояниями, беспричинным снижением массы тела более чем на 5 кг в течение 3–6 месяцев, при изменениях в общем анализе крови (анемия, тромбоцитопения, лейкопения или лейкоцитоз, повышение СОЭ), изменениях в анализах мочи (лейкоцитурия, протеинурия), при необходимости уточнения характера органного поражения, наличии одномоментного поражения многих органов и систем (наблюдение у смежных специалистов) и др.; при контроле эффективности проведенного антибактериального лечения; с целью скринингового обследования групп населения по повышенному риску заболеваемости урогенитальным хламидиозом (лица с повышенной сексуальной активностью, частой сменой половых партнеров).

При изучении анамнестических данных выясняются: предполагаемый источник инфицирования пациента; время, прошедшее с момента сексуального контакта с предполагаемым источником инфицирования до появления субъективных симптомов; результаты обследования половых партнеров; данные акушерско-гинекологического, урологического и полового анамнезов; наличие ИППП в анамнезе и в настоящее время; данные аллергоанамнеза; наличие соматических заболеваний; данные о приеме лекарственных препаратов, в том числе антибактериальных, в течение последних 3 месяцев [8, 25].

### Методические аспекты лабораторной диагностики хламидиозов

Сегодня не существует единого алгоритма и схемы диагностического обследования пациентов с подозрением на хламидиоз, что обусловлено высокой зависимостью результатов диагностики от следующих факторов: правильной подготовки пациента к исследованию; правильного взятия врачом материала для исследования из первичных и вторичных очагов хламидийного поражения; получения образцов клинического материала из очагов максимальной концентрации возбудителя (с учетом пола, возраста пациента и возможных путей инфицирования); сроков получения клинического материала с учетом применения антибактериальных препаратов (до начала лечения или не ранее, чем через 1 месяц после окончания антибактериальной терапии); получения клинического материала из уретры не ранее чем через 3 часа после последнего мочеиспускания; получения клинического материала из цервикального канала перед менструацией или через 1–2 дня после ее окончания;

правильной предварительной подготовки забранного материала и своевременного проведения исследования; правильного хранения и доставки материала в лабораторию; выбора соответствующего метода лабораторного исследования; материально-технического обеспечения лабораторного исследования; уровня квалификации медицинского персонала, проводящего исследование [18, 20]. Многообразие методических возможностей, с одной стороны, способствует повышению качества диагностики, а с другой — приводит к неодинаковой трактовке специалистами результатов обследования пациентов. Для унификации трактовки результатов обследования предложено использовать диагностические алгоритмы, однако их вряд ли можно считать безупречными. Каких-то строгих алгоритмов диагностирования хламидиоза нет, а существуют правила, выработанные на основе клинико-диагностического опыта и представленные в отдельных научных публикациях [3, 7, 9, 13, 34]. Целесообразность применения биологических, химических и алиментарных провокаций с целью повышения эффективности диагностики хламидийной инфекции имеет место при прохождении пациентами неоднократных курсов терапии.

Клиническим материалом для исследования на присутствие хламидий в образцах могут быть соскобы эпителиальных клеток со слизистых оболочек уретры, цервикального канала, влагалища, задней стенки глотки, носа, конъюнктивы, прямой кишки, мокрота, бронхоальвеолярный смыв, ликвор, лейкоконцентрат крови, суставная жидкость, биоптаты из лимфоузлов, синовиальной оболочки суставов, гайморовых пазух, эякулят, секрет предстательной железы, первая порция утренней свободно выпущенной мочи у мужчин и отделяемое влагалища у женщин [11, 23].

Для верификации наличия воспалительного процесса в мочеполовых органах применяется микроскопическое исследование. Диагностическими критериями, подтверждающими наличие уретрита у мужчин, являются: обнаружение 5 и более лейкоцитов в поле зрения в мазках из уретры при увеличении х1000; обнаружение 10 и более лейкоцитов в осадке первой порции мочи. Диагностическим критерием, подтверждающим наличие уретрита у женщин, является: обнаружение 10 и более лейкоцитов в поле зрения в мазках из уретры при увеличении х1000. Диагностическим критерием, подтверждающим наличие цервицита у женщин, является: обнаружение 20 и более лейкоцитов в поле зрения в мазках из цервикального канала при увеличении х1000.

Лабораторная диагностика урогенитального хламидиоза включает целый ряд методических подходов. Наиболее распространен метод иммунофлюоресценции, реже используется полимеразная цепная реакция и лишь в отдельных лабораториях применяется культуральный метод выявления хламидий. Доступно также серологическое исследование крови на предмет определения иммуноглобулинов IgG, IgM, IgA к *C. trachomatis*. Другие методы диагностики урогенитальной хламидийной инфекции практически не используются. Сравнение методов и клинических материалов показало неоднозначность применяемых тестов в клинической практике. Поиск наиболее чувствительных и специфичных тестов, создание алгоритма исследования легли в основу многолетних трудов различных авторов. Многообразие методов лабораторной диагностики хламидийной инфекции и клинического материала, используемого для исследования, ставят перед лабораториями задачу оптимизации этих методов [2, 6, 12, 15].

На выбор метода для диагностики хламидиоза существенное влияние оказывает клиническая форма заболевания: характер течения воспаления (острое, подострое, хроническое) и топический диагноз (у мужчин — уретрит, эпидидимит, орхоэпидидимит, простатит, парауретрит и проктит; у женщин — цервицит, уретрит, бартолинит, цистит, сальпингит, сальпингоофорит, эндометрит, пельвиоперитонит; конъюнктивит, назофарингит, респираторный аллергоз у детей), степень распространенности воспалительного процесса — генерализованные формы хламидиоза (хламидия-индуцированная артропатия), цели обследования (лабораторное подтверждение диагноза или массовое скрининговое обследование групп риска). Ни один из перечисленных методических подходов не обеспечивает 100% достоверность получаемых результатов. Поэтому сегодня в качестве «золотого стандарта» рассматривают комплексное применение двух методик, основанных на различных принципах [21, 26].

Лабораторно-диагностические ситуации, возникающие при урогенитальном хламидиозе, можно разделить на две группы.

- К первой относятся те случаи, когда в материале из различных отделов генитального тракта и экстрагенитальной локализации обнаруживают маркеры самого возбудителя, независимо от того, присутствуют ли антитела против хламидий в крови. В эту группу входят результаты обследования, полученные с помощью методов иммунофлюоресценции, полимеразной цепной реакции и культурального исследования.
- Вторую группу составляют ситуации, при которых в крови больных определяются иммуноглобулины к *C. trachomatis* различных классов, а маркеры этих микроорганизмов в урогенитальном тракте не выявляются.

### Диагностическое значение результатов, полученных различными методами диагностики хламидийной инфекции

#### Метод прямой иммунофлюоресценции (ПИФ)

Известно, что при использовании метода ПИФ относительно часто получают ложноположительные ре-

зультаты. Получение ложноположительных результатов может быть обусловлено, прежде всего, низким качеством диагностических наборов, субъективным характером трактовки получаемых данных, использованием тест-систем с поликлональными антителами. Сведения о частоте ложноположительных результатов при использовании ПИФ различны, но указание на то, что ложноположительный диагноз урогенитального хламидиоза при применении ПИФ ставится в 85% случаев, вызывает обоснованные сомнения [26, 32, 37]. По наблюдениям В. В. Михайличенко и соавт. (2000), только у 36% пациентов положительный результат, полученный иммунофлюоресцентным методом, был в дальнейшем опровергнут. Тем не менее, положение о том, что необходимо дополнительное подтверждение положительных результатов ПИФ, остается неизменным [21]. В зарубежной практике установленный по ПИФ диагноз принято подтверждать с помощью культурального исследования. Существует и другой подход, который приемлемо использовать в качестве альтернативы при отсутствии возможности выполнения культурального исследования. Е. А. Шилова (1997) показала, что прогностическая ценность отрицательного и положительного результатов реакции иммунофлюоресценции по отношению к результатам, полученным в полимеразной цепной реакции, составляла, в зависимости от вида диагностического набора, 83,6–100% и 20–31% соответственно. В этой связи автор предлагает при невозможности применения альтернативных методик подтверждать положительный результат ПИФ повторной постановкой реакции с использованием другого диагностического набора [38]. Несмотря на появившееся скептическое отношение к использованию метода иммунофлюоресценции он остается весьма распространенным. Поэтому врачи-клиницисты должны исходить из того, что пациента, у которого этим методом установлен хламидиоз, необходимо обследовать комплексно, лучше всего с применением культурального метода и проведением серологического исследования. Использование ПИФ целесообразно для диагностики в группах высокого риска по УГХ, особенно у пациентов с клиническими проявлениями ИППП, и не оправдано для выявления АГ *C. trachomatis* в группах низкого риска, в том числе подлежащих скрининговому обследованию. Положительный результат изолированно проведенного ПИФ, по возможности, должен быть подтвержден в неродственном методе или хотя бы повторно в том же тесте с использованием различного клинического материала и/или проведением провокационных мероприятий [30].

Для постановки ПИФ с целью диагностики хламидий используются следующие диагностические наборы: «Chlamyset Antigen» (Orion diagnostica, Finland), «DFA Micro-Tract» (Siva USA), «Chlamydia direct IF» (Bio-Merieux UK), «ХлаМоноСкрин « (Нирамедик, Россия), «ХламиСлайт» (Лабдиагностика, Россия), «ХламиДиф» (Диамед, Россия) [23].

**Молекулярно-биологические методы диагностики *C. trachomatis***

В настоящее время в Российской Федерации для выявления нуклеиновых кислот хламидий в образцах биологического материала предлагается значительное количество тест-систем, основанных на различных молекулярно-биологических подходах. В этой связи выбор тест-систем для использования в конкретной лаборатории представляет собой достаточно трудную задачу. При этом решающими должны быть не такие очевидные параметры, как стоимость и удобство в повседневной работе, а чувствительность и специфичность. К сожалению, исследования, посвященные сравнительной оценке тест-систем отечественного производства, немногочисленны. В сложившейся ситуации резко возрастают требования к внутрилабораторной валидации тест-систем. Методы выявления нуклеиновых кислот можно разделить на две группы: связанные и не связанные с амплификацией нуклеиновых кислот. К основным методам, не связанным с амплификацией нуклеиновых кислот, относятся различные варианты методов, основанных на гибридизации нуклеиновых кислот-мишеней и комплементарных зондов, содержащих радиоактивные или другие метки. Лучшим примером такого метода является тест PACE® 2 CT (Gen-Probe, Inc. San Diego, CA), одобренный FDA в 1988 году. Тест основан на гибридизации ДНК-зонда со специфическим участком 16S рибосомальной РНК *C. trachomatis*. В последние годы МАНК (методы амплификации нуклеиновых кислот) постепенно вытесняют другие методы диагностики благодаря высокой чувствительности, специфичности, воспроизводимости и высокой пропускной способности. Проведенные T. J. Battle и соавт. расчеты показали, что при использовании неамплификационных методов диагностики хламидийной инфекции (культуральный метод, метод прямой иммунофлуоресценции, метод ИФА с определением антигена) пропускается от 20 до 40% случаев инфицирования *C. trachomatis* [41]. Все амплификационные методы можно разделить на три группы: основанные на амплификации сигнала, мишени и зонда.

При использовании методов амплификации сигнала в ходе реакции увеличения концентрации мишени или зонда не происходит. Значительное повышение аналитической чувствительности метода достигается за счет связывания с мишенью множества меченых молекул. Один из вариантов этого подхода (hybrid capture assay — метод захвата гибридных молекул) используется в коммерческих тест-системах для выявления *C. trachomatis* — HC2® CT ID (Qiagen Germantown, MD). Метод основан на гибридизации в растворе ДНК-мишени и РНК-зонда. Образовавшиеся гибридные молекулы захватываются иммобилизованными антигибридными антителами. Затем к иммобилизованным гибридным молекулам присоединяются антигибридные антитела, меченые щелочной фосфатазой. Реакция оценивается по интен-

сивности люминесценции, ее высокая чувствительность определяется тем, что к одной гибридной молекуле (ДНК+РНК) присоединяется множество молекул меченых антител.

При использовании амплификации зонда продукт амплификации представлен только нуклеотидными последовательностями, входящими в состав зонда. Наиболее известным вариантом этого метода является лигазная цепная реакция, реализованная в коммерческом продукте LCx Probe System (Abbot), однако в 2003 г. производитель отозвал тест-систему с рынка.

Все методы, относящиеся к этой группе амплификации мишени, основаны на проведении энзиматических реакций, в процессе которых один или несколько ферментов синтезируют множественные копии нуклеиновой кислоты — мишени [25].

**Классическая ПЦР**

Амплификация ДНК-мишени осуществляется в ходе повторяющихся циклов, каждый из которых включает: денатурацию (образование одноцепочечных молекул) ДНК-мишени при температуре более 90 °С; отжиг на каждой одноцепочечной молекуле ДНК комплементарного олигонуклеотидного праймера при понижении температуры до 55—65 °С; достройка (синтез) двухцепочечной молекулы ДНК с каждого праймера в результате энзиматической активности термостабильной ДНК-полимеразы при использовании содержащихся в реакционной смеси дезоксинуклеозидтрифосфатов при температуре 72 °С.

По окончании цикла происходит удвоение фрагментов ДНК-мишени. При проведении n циклов число фрагментов ДНК-мишени будет составлять $2^n$. На практике для получения продуктов амплификации (ампликонов) в количестве, достаточном для их детекции обычными аналитическими методами, проводят приблизительно 30 циклов амплификации. Первоначально в ходе ПЦР после каждого отжига праймеров в реакционную смесь приходилось добавлять новую порцию ДНК-полимеразы, так как ранее внесенный фермент инактивировался при высокой температуре на этапе денатурации. Высокую скорость реакции амплификации удалось получить при использовании термостабильной ДНК-полимеразы и благодаря созданию программируемых термоциклеров, обеспечивающих быстрое и точное изменение температуры реакционной смеси.

Для детекции продуктов амплификации применяют несколько методов. Наиболее распространенным методом детекции является горизонтальный электрофорез образца реакционной смеси, полученного после окончания амплификации, в агарозном геле. Результат ПЦР считается положительным при выявлении фрагмента ДНК, по своей молекулярной массе соответствующего молекулярной массе ампликона контрольного образца. Для этого при проведении электрофореза необходимо использовать маркеры (фрагменты ДНК известной молекулярной массы), положительный и отрицательный контроли. Существенными недостатками метода являются: субъективность оценки результатов электрофореза оператором, низкая производительность, невозможность автоматизации процесса, трудность количественной оценки продуктов ПЦР в каждом конкретном образце. Наибольшую опасность составляет возможность наработки в ходе ПЦР неспецифического продукта, сходного по размерам с детектируемым продуктом. При существующей системе детекции возможна выдача оператором ложноположительного результата.

Альтернативой электрофоретическим методам детекции ПЦР-амплифицированной ДНК являются методы гибридизационно-флуоресцентной детекции. В ходе такого способа детекции амплифицированная ДНК гибридизуется и с праймерами, и с мечеными флуоресцентным красителем олигонуклеотидными зондами, специфичными к внутренней последовательности анализируемого фрагмента. Образовавшийся гибрид автоматически регистрируется флуоресцентным или фотометрическим ридером. Таким образом, при гибридизационном способе детекции ДНК специфичность реакции амплификации обеспечивается, во-первых, за счет гибридизации с праймерами, во-вторых, за счет гибридизации со специфическими зондами.

Метод ПЦР в его классическом варианте первоначально использовался для детекции ДНК *C. trachomatis* с помощью тест-систем, сконструированных в каждой лаборатории самостоятельно (домашнее изготовление). К настоящему времени такие тест-системы вытесняются коммерческими тест-системами. В большинстве тест-систем мишенью является криптическая плазмида или 23S рРНК *C. trachomatis*.

ПЦР в классическом варианте используется в коммерческих тест-системах производства Roche Molecular Diagnostics Pleasanton, CA (AMPLICOR® CT/NG Test for Chlamydia trachomatis и COBAS AMPLICOR® CT/NG Test for Chlamydia trachomatis). Мишенью в указанных тест-системах является криптическая плазмида. Существует целый ряд отечественных ПЦР — тест-систем для детекции Chlamydia trachomatis, разрешенных к медицинскому применению. Тест-системы, основанные на принципе классической ПЦР, являются наименее удобными в повседневной работе (особенно при ручном исполнении), но отличаются относительно низкой стоимостью.

Для повышения чувствительности и специфичности классической ПЦР был разработан ее вариант, получивший название гнездной ПЦР. При этом используют две пары праймеров. После проведения амплификации с использованием первой пары праймеров полученные ампликоны используют во втором раунде ПЦР со второй парой праймеров. Вторая пара праймеров отжигается на внутренних участках ампликонов, таким образом продукт второго раунда амплификации оказывается короче, чем продукт первого раунда. Повышение чувствитель-

ности и специфичности гнездной ПЦР достигается за счет увеличения общего числа циклов амплификации (по 15–30 в каждом раунде) и отжига второй пары праймеров только на фрагментах, полученных в первом раунде. Метод гнездной ПЦР используется в основном в исследовательских целях и не нашел широкого применения в коммерческих тест-системах.

С практической точки зрения, весьма перспективной является мультиплексная ПЦР. При этом варианте в одной и той же пробирке находятся несколько пар праймеров, специфичных для различных мишеней, что позволяет проводить детекцию нескольких мишеней одновременно. Конструирование праймеров и оптимизация условий для мультиплексной ПЦР несколько сложнее, чем решение этих задач для классической ПЦР, так как необходимо исключить возможную комплементарность между различными праймерами и обеспечить для них одинаковую температуру отжига. Мультиплексная ПЦР по чувствительности несколько уступает обычной реакции.

**ПЦР в реальном времени (real-time PCR)**

Один из принципиальных недостатков, затрудняющих использование классической ПЦР в диагностике, связан с крайне высокой чувствительностью этого метода, что повышает вероятность ложноположительных результатов из-за перекрестной контаминации исследуемых образцов. Вероятность перекрестной контаминации удается предотвратить при использовании метода ПЦР в реальном времени, благодаря тому, что процессы амплификации и детекции продуктов амплификации происходят одновременно в одной и той же пробирке. Для детекции продуктов амплификации разработаны достаточно сложные технологии, основанные на комплексе ферментативных реакций, в результате которых в реакционной смеси возникает флуоресцентный сигнал, по интенсивности пропорциональный количеству образовавшегося продукта амплификации. Специфичность флуоресцентного сигнала удается получить при использовании ДНК-зондов, комплементарных внутренним участкам фрагмента ДНК, ограниченного праймерами. Наибольшее распространение получили TaqMan зонды и «молекулярные маяки».

ПЦР в реальном времени может быть использована для определения количественного содержания ДНК-мишени в биологическом образце. Целесообразность количественной детекции *C.trachomatis* при урогенитальной хламидийной инфекции в настоящее время не определена, однако определение концентрации ДНК *C.trachomatis* является важным дополнительным диагностическим приемом. Он, вероятно, позволяет оценить активность инфекционного процесса в зависимости от его характера, распространенности, сочетания с другими возбудителями урогенитальной патологии, наличием осложненных форм болезни (бесплодие, хламидия-индуцированная артропатия). Различия в показателях концентрации ДНК среди больных, объединенных одинаковым клиническим диагнозом, могут свидетельствовать о различиях иммунопатологических механизмов формирования хронических и осложненных форм хламидийной инфекции, что представляется важным для дальнейших исследований по изучению причин персистирования хламидий, неэффективности терапии.

Для проведения ПЦР в реальном времени необходимы специальные термоциклеры с прецизионной оптикой, позволяющие мониторировать интенсивность флюоресценции в реакционной смеси. Современные термоциклеры для ПЦР в реальном времени оснащены каналами для детекции флюоресценции в нескольких диапазонах длин волн (до 5–6), что позволяет разрабатывать мультиплексные форматы реакции.

Тест-системы для детекции *C.trachomatis* методом ПЦР в реальном времени, а также мультиплексные тест-системы для детекции возбудителей ИППП (включая *C.trachomatis*) разработаны и выпускаются некоторыми российскими производителями.

**Методы амплификации, основанные на транскрипции**

Помимо ПЦР — метода амплификации ДНК, все больше внимания стали привлекать методы амплификации РНК. Методы амплификации, основанные на транскрипции, относятся к изотермическим (амплификация мишени происходит при постоянной температуре), мишенью является РНК возбудителя. Прототипом указанных методов являются процессы, происходящие при репликации ретровирусов. На начальных этапах реакции при участии обратной транскриптазы на матрице РНК — мишени происходит синтез комплементарной ДНК, а затем с помощью РНК полимеразы синтезируются множественные копии РНК. В настоящее время распространены два варианта рассматриваемого метода амплификации, защищенных патентами компаний-производителей: амплификация, основанная на транскрипции (TMA — Transcription Mediated Amplification) — Gen-Probe, Inc. San Diego, CA, и амплификация, основанная на последовательности нуклеиновых кислот (NASBA — Nucleic Acid Sequence Based Amplification) — BioMerieux [39, 42]. Различия между приведенными вариантами связаны с различным происхождением используемых в реакциях ферментов и различными методами детекции продуктов амплификации. В тест-системах TMA (производства Gen-Probe) используются обратная транскриптаза с эндогенной РН-азной активностью и РНК полимераза бактериофага Т7. Для детекции продукта амплификации — одноцепочечной РНК используется гибридизация. Тест-системы выпускаются для детекции *C.trachomatis* (APTIMA CT® Assay) и для одновременной детекции *C.trachomatis* и *N.gonorrhoeae* (APTIMA Combo 2® Assay). В последней тест-системе применяется также предварительное обогащение РНК —

мишени на магнитных частицах, что позволяет в значительной степени преодолеть проблему наличия ингибиторов амплификации в клиническом образце. В тест-системах NASBA (производства BioMerieux) используют обратную транскриптазу вируса миелобластоза птиц, РН-азу Н и РНК полимеразу бактериофага Т7. Для детекции продуктов амплификации также используют гибридизацию, однако в несколько другом формате, чем в тест-системах ТМА. Так как мишенью для NASBA служат молекулы РНК рибосом (рибосомальные РНК) микроорганизмов, это дает целый ряд преимуществ перед ПЦР. Во-первых, количество рибосом: в одной клетке хламидии их содержится от нескольких тысяч до нескольких десятков тысяч. Для сравнения: даже многокопийные участки ДНК, используемые в качестве мишени для ПЦР, не превышают двух десятков на бактериальную клетку. Тем самым, с помощью NASBA можно выявлять возбудителей и в тех случаях, когда их число слишком мало и недостаточно для выявления методом ПЦР. Во-вторых, в то время как ДНК — достаточно стабильный материал и обнаружение его еще не означает наличия жизнеспособных микроорганизмов, РНК — наоборот, крайне нестабильный материал и достаточно быстро деградирует при гибели и разрушении клеток микроорганизмов. Это дает возможность не только более правильно судить о наличии текущей инфекции, но и более точно и надежно оценивать результаты проведенного лечения. Наконец, поскольку метод ПЦР обладает более высокой аналитической чувствительностью по сравнению с другими лабораторными методами — микроскопией, ПИФ, культуральным методом, — использование этих методов для подтверждения результатов ПЦР не всегда корректно. В этом случае NASBA может использоваться как подтверждающий тест результатов ПЦР, особенно на фоне отсутствия клинических признаков инфекции. Технология детекции продуктов амплификации в режиме реального времени (NASBA-Real-Time) с использованием специфических флуоресцентных зондов дополнительно увеличивает специфичность теста и объективность результатов лабораторного исследования. Основным недостатком тест-систем, основанных на транскрипции, является высокая стоимость и необходимость использования строго определенного оборудования.

### Амплификация со смещением цепочки (strand displacement)

Метод амплификации со смещением цепочки относится к изотермическим, концептуально он весьма сложный, но в техническом исполнении весьма прост. Метод является интеллектуальной собственностью Becton Dickinson, тест-системы выпускаются под названием «BD ProbeTec™ ET *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* amplified DNA Assay» для одновременной детекции *C. trachomatis* и *N. gonorrhoeae*.

Несмотря на растущую популярность у врачей молекулярно-биологических методов диагностики урогенитальной хламидийной инфекции они также небезупречны, поскольку не исключены ложноположительные и ложноотрицательные результаты. По данным В. В. Михайличенко и соавт. (2000), если *C. trachomatis* обнаружены методом ПЦР, то можно ограничиться только этим исследованием [21]. Мнение, что ПЦР даже при соблюдении всех технологических требований дает ложноположительные результаты вследствие контаминации в лаборатории, не подтверждается, хотя наблюдаются пациенты, у которых после курса терапии при контрольном обследовании ПЦР дает положительный результат, а ПИФ — отрицательный. Вероятно, именно такие случаи можно относить к ситуациям так называемого «субъективного характера учета результатов», полученных методом иммунофлюоресценции. Если у пациента имеются клинические симптомы заболевания и ранее он многократно лечился от хламидиоза, то при полигамном характере его сексуальных отношений даже отрицательный результат, полученный методом ПЦР, не дает основания для «диагностического успокоения». В таких случаях получение ложноотрицательных результатов, вероятно, обусловлено присутствием в анализируемых образцах ингибиторов полимеразной реакции. Безусловно, в подобных ситуациях необходимо проведение комплексного обследования, но использование только ПИФ и ПЦР, особенно для контроля излеченности, вряд ли можно считать удачным. Наоборот, при положительном результате ПЦР диагноз можно, безусловно, установить как до лечения, так и использовать ее для контроля излеченности. Подобные ситуации не редки, поэтому и лечащий врач, и врачи клинической лабораторной диагностики в каждом конкретном случае должны быть уверены в том, что погрешности в работе отсутствуют.

### Культуральный метод

При диагностике инфекций, вызванных *C. trachomatis*, в течение многих лет предпочтение отдавалось культуральному методу (КМ), позволяющему обнаружить жизнеспособные микроорганизмы. Однако данный метод не стандартизован, в результате чего отмечается несовпадение данных, полученных в различных диагностических центрах. В то же время высокая специфичность позволяет рекомендовать его применение для диагностики *C. trachomatis* в экстрагенитальных областях и, главное, в качестве оценки эффективности лечения. Большинство исследователей пришли к заключению, что при специфичности культурального метода в 100% чувствительность его остается очень низкой — от 40 до 60%. С внедрением в практику ПЦР посев на культуре клеток по-прежнему остается эталонным, но лишь для отдельных клинических ситуаций. Технические сложности и большая продолжительность выполнения этого исследования делают его менее удобным, хотя именно культуральным методом чаще выявляют возбудителя.

Поэтому применение данного метода, особенно в сложных случаях, безусловно, необходимо.

Для культуральных исследований используются различные типы клеток, обладающих большой чувствительностью к хламидиям: McCoy, Hela-229, Л-229, ВНК-221. Предпочтение при этом отдается смешанным линиям клеток (КК линии LLC-MK520, ВНК-21 и L59290). Учитывая существующие трудности при использовании данного метода для диагностики персистирующих форм хламидийной инфекции, нами применяется смешанная перевиваемая культура клеток LLC+MK2+L929+ВНК-21С, с предварительно сниженной резистентностью [23].

**Серологические исследования (иммуноферментный анализ, непрямая иммунофлюоресценция)**

Серологические методы являются вспомогательными в диагностике урогенитального хламидиоза. В настоящее время с помощью серологического метода удается выявить в биологических жидкостях (кровь, эякулят, синовиальная жидкость, ликвор) IgM, IgG и IgA к *C.trachomatis*. Особенностью УГХ является значительная индивидуальная вариабельность начала формирования, выраженности и продолжительности гуморального иммунного ответа, что существенно осложняет трактовку как положительных, так и отрицательных результатов серологических тестов [19, 36]. Это связано с неабсолютной видоспецифичностью хламидийных антигенов (АГ) наружной мембраны, низкой иммуногенностью отдельных штаммов *C.trachomatis*, индивидуальными отличиями динамики и силы иммунного ответа на различных стадиях инфекции. По наличию или отсутствию антител к хламидиям выделяют серологически позитивных и негативных пациентов. Считается, что результаты анализов на наличие антихламидийных IgM в крови не совпадают с клинической картиной. Возможно, что обнаружение антител этого класса имеет большее практическое значение при обследовании беременных; при мужском хламидиозе какие-либо закономерности определения IgM не описаны. Выявление данных иммуноглобулинов диагностически является ценным лишь при обследовании людей, впервые инфицированных *C.trachomatis*. Среди основных причин несостоятельности видоспецифической IgM-диагностики УГХ следует выделить невысокий уровень синтеза этого класса АТ к мембранным белкам *C.trachomatis* при первичной инфекции и его непродолжительность. Последнее, с учетом преимущественно стертой симптоматики первичного хламидийного поражения органов мочеполовой системы и, соответственно, преобладания поздней обращаемости за медицинской помощью, оставляет минимальные шансы на регистрацию видоспецифических IgM. Более выраженный иммунный ответ формируется на родоспецифический липополисахарид, однако в данном случае в ИФА регистрируются сывороточные IgM ко всем представителям рода *Chlamydia*, что затрудняет установление доказательной взаимосвязи положительного результата такого серологического анализа с ранней стадией инфекции, вызванной именно *C.trachomatis*. Кроме высокой вероятности получения ложноположительного клинического заключения о наличии УГХ на основании позитивного результата IgM-тестирования в ИФА с ЛПС-АГ, применение таких тест-систем обусловливает и риск ложноотрицательных ответов при действительно имеющемся первичном инфицировании *C.trachomatis*. Если первичной инфекции, вызванной *C.trachomatis*, ранее предшествовали эпизоды заражения другими представителями рода *Chlamydia*, повторный синтез IgM к родоспецифическому ЛПС с большой вероятностью не будет инициирован.

Для IgG к *C.trachomatis* установлены величины диагностических титров. Согласно наблюдениям В. В. Михайличенко и соавт. (2000), определение антихламидийных IgG может считаться скрининговым исследованием, но по величине титра IgG диагноз ставить нельзя. Обнаружение антихламидийных IgG в крови независимо от их титра свидетельствует лишь о двух фактах: пациент болел хламидиозом и к моменту обследования излечился, или пациент какое-то время уже болеет хламидиозом. Последнее можно доказать только выявлением у пациента возбудителя. Если в ПЦР и культуральном посеве хламидии не обнаруживаются, то даже высокий или, что еще важнее, возрастающий титр IgG (при отсутствии IgA), не всегда является основанием для установления диагноза «хламидиоз». Увеличение титра более чем в 4 раза наблюдается редко, а изменение величины в 2 раза находится в пределах ошибки метода. Сложнее интерпретировать ситуацию, при которой положительный результат прямой иммунофлюоресценции, не подтвержденный полимеразной цепной реакцией и культуральным исследованием, сочетается с обнаружением в крови только антихламидийных IgG. В этом случае целесообразно избрать тактику динамического наблюдения за пациентом, в ходе которого диагноз будет конкретизирован.

В отличие от IgG, обнаружение в крови IgA к *C.trachomatis* позволяет поставить диагноз. Известно, что выявление антихламидийных IgA — это признак острого воспалительного процесса, вызванного хламидиями. Наличие IgA всегда сочетается с присутствием в крови IgG, хотя величина их соотношения может быть различна. Наличие IgA в крови, даже когда не удается обнаружить возбудителя в ПЦР и культуральным методом, многими авторами расценивается как проявление активно протекающего хламидийного процесса. Вероятно, это относится и к тем случаям, когда титр IgA ниже диагностического. В такой ситуации учитываются возможность перекрестной реакции при низких титрах антихламидийных иммуноглобулинов, клинические проявления у пациента и его полового партнера, а также социальные обстоятельства. Минимум необходимых

мероприятий включает динамическое клинико-лабораторное наблюдение, позволяющее окончательно исключить инфекцию или своевременно начать антибактериальную терапию. Наиболее целесообразно проводить одновременное определение IgA и IgG к видоспецифическим АГ *C.trachomatis*, получаемым, как правило, на основе рекомбинантных или синтетических белков внешней мембраны (MOMP) возбудителя УГХ. Применение таких ИФА-тест-систем обеспечивает выявление циркулирующих в сыворотке крови хламидийных АТ и наряду с этим существенно снижает риск перекрестных взаимодействий с АТ к другим представителям хламидий, в частности к *C.pneumoniae*. В противоположность этому использование ИФА-тест-систем на основе родоспецифического липополисахарида (ЛПС) хламидий способно значительно осложнять дифференциальную диагностику УГХ с другими хламидиозами, прежде всего с инфекцией, вызванной *C.pneumoniae*, особенно при отсутствии симптомов инфекции респираторного или урогенитального тракта.

В то же время в связи с рассмотренными недостатками IgM-серодиагностики УГХ уместна оценка надежности и практической применимости предлагаемых в некоторых пособиях для врачей сложных и детальных алгоритмов оценки результатов определения различных классов хламидийных АТ. В основу их положены существующие представления о закономерностях типового иммунного ответа организма на присутствие *C.trachomatis*, которые заключаются в том, что при первичном инфицировании инициируется последовательный синтез специфических АТ классов M, A и G. Считается также, что при реинфекции возбудителем УГХ или при реактивации УГХ имеется возможность регистрации в основном специфических IgG и IgA при минимальной вероятности выявления IgM. На основании оценки вариантов комбинаций положительных и отрицательных результатов серологических исследований на различные классы АТ к *C.trachomatis* предлагается проведение углубленной трактовки и установления формы УГХ у пациента — первичного или повторного инфицирования, хронического течения, рецидива УГХ или персистенции, а также перенесенной инфекции в анамнезе. Помимо учета особенностей сочетания позитивных и негативных ответов на IgM, IgG и IgA в качестве объективной основы для дифференциальной клинической диагностики УГХ выступает оценка титров этих АТ в позитивных сыворотках. Однако диапазоны титров АТ различных классов, рекомендуемые для серологической идентификации каждого из перечисленных клинических вариантов УГХ, определены с 4-кратным и более размахом, в связи с чем они неизбежно перекрываются и сводят возможности серологического дифференцирования форм острой и хронической хламидийной инфекции к минимуму. При этом следует учитывать и многофакторные сложности надежного IgM-тестирования УГХ, согласующиеся с указаниями на необходимость крайне осторожной интерпретации результатов серологических исследований, особенно при выявлении IgM. Очевидно, что при наиболее часто выполняемом на практике однократном исследовании обеспечивается удовлетворительная серологическая дифференциальная диагностика только двух противоположных состояний — «инфекция есть» или «инфекции нет, но есть остаточная серопозитивность». Основанием для первого заключения являются одновременно позитивные ответы тестов на IgA и IgG или только на IgA в любых титрах, для второго — только на IgG. Следует отметить, что практическому врачу целесообразно оперировать именно этими обобщенными выводами, поскольку уточнение вариантов свежей или хронической хламидийной инфекции нельзя провести без учета клинико-анамнестических данных. С другой стороны, международная классификация болезней МКБ-10 предлагает дифференцировать УГХ только с позиций топической диагностики без уточнения стадии инфекции. Простота и рациональность данной классификации УГХ вполне адекватно отражают реальные возможности и сложности объективной клинической и лабораторной диагностики хламидийной инфекции, предотвращая необоснованные решения и действия врача, в том числе по установлению и нередким попыткам лечения трудно доказуемой персистирующей хламидийной инфекции.

Таким образом, когда в материале из различных сегментов генитального тракта человека обнаруживают с помощью методов иммунофлюоресценции, полимеразной цепной реакции и культурального исследования антиген возбудителя, независимо от того, присутствуют ли антитела против хламидий в крови, необходимо выставлять диагноз «хламидиоз». Отсутствие хламидийных антител в данной ситуации свидетельствует о возможном серонегативном варианте течения инфекции. В случаях, когда в крови больных определяются иммуноглобулины к *C.trachomatis*, а маркеры этих микроорганизмов в урогенитальном тракте не выявляются, нет оснований для выставления диагноза «хламидиоз». Не вызывает сомнения, что серологические методы по информативности уступают ПЦР, КМ и даже ПИФ при свежем клинически выраженном УГХ и при любых других вариантах инфекции, сопровождающихся выделением возбудителя или его молекулярных маркеров из отделов полового тракта, доступных для взятия соскобного материала. Именно с такими пациентами наиболее часто встречаются дерматовенерологи и урологи. Однако акушерам-гинекологам нередко приходится устанавливать или исключать роль *C.trachomatis* в развитии трубного бесплодия и воспалительных заболеваний органов малого таза (ВЗОМТ). Причиной неэффективности диагностики может явиться и развитие рубцовых изменений в очагах хронического инфекционного поражения. В подобных случаях возбудитель, его ДНК или АГ не всегда присутствуют в материале, полученном из нижних отделов мочеполового тракта, и отрицательные

результаты КМ, ПЦР и ПИФ не исключают диагноза ВЗОМТ хламидийной этиологии. При этом единственным способом получения материала для достоверного прямого исследования является лапароскопия, которая, однако, в обычной практике широко не применяется даже за рубежом в связи с высокой стоимостью процедуры и возможными трудностями идентификации слабо выраженного воспаления в фаллопиевой трубе. В данной ситуации ценность обнаружения хламидийных АТ значительно возрастает, поскольку результаты иммуносерологии являются недорогой альтернативой лабораторного подтверждения клинических подозрений на ВЗОМТ хламидийной этиологии.

Несмотря на ряд сложностей в интерпретации результатов иммуносерологических исследований, проводимых для диагностики УГХ, тест-системы для выявления АТ к *C. trachomatis* находят широкое применение в практике отечественного здравоохранения. Имеется ряд отечественных тест-систем, предназначенных для выявления видоспецифических антител класса А и/или G к *C. trachomatis* методом иммуноферментного анализа (ИФА) и аттестованных в Государственном НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича: «Хлами-IgG-ДС-Tr», «Хлами-IgA-ДС-Tr», «КомбиХлами-IgG/IgA-ДС-Tr» производства ЗАО «Медико-биологический Союз» (Новосибирск); «ЭКОлаб — Хламидия-IgG» и «ЭКОлаб — Хламидия-IgA» производства ООО «ЭКОлаб» (г. Электрогорск); «ХламиБест C. trachomatis-IgG-стрип» и «ХламиБест C. trachomatis-IgA-стрип» производства ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск); «ИФА-Анти-Хламидия Tr-G» и «ИФА-Анти-Хламидия Tr-A» производства НПО «Диагностические системы» (Нижний Новгород), а также тест-системы зарубежного производства "Chlamydia trachomatis IgG EIA Test" (фирма "Labsystems", Финляндия), "Chlamydia trachomatis IgA pELISA medac", "Chlamydia trachomatis IgG pELISA medac" (фирма "Medac", Германия). Для определения хламидийных антител методом непрямой иммунофлюоресценции (НРИФ) используются следующие коммерческие тест-системы: "MIF" (MRL diagnostics, France), "MIF" ("Labsystems", Finland), «ХламиФлюоСкрин» (Ниармедик, Россия). Подобное признание во многом объясняется доступной ценой и приемлемым качеством российских ИФА-тест-систем в сравнении с зарубежными аналогами, а также возможностью многоцелевого использования оборудования для ИФА, позволяющей ЛПУ решать разноплановые лабораторно-диагностические задачи [4, 23].

### Определение серотипов и молекулярно-биологических характеристик *C. trachomatis*

Основные проблемы, связанные с диагностикой воспалительных синдромов, ассоциированных с хламидиями, в практическом здравоохранении обусловлены, прежде всего, недостаточной информацией о молекулярной организации этих микроорганизмов и их отличительных свойствах, а также о молекулярных механизмах взаимоотношения микроорганизм — клетка-хозяин. Серологически вид *C. trachomatis* подразделяется на 18 основных сероваров, маркируемых буквами английского алфавита от A до L. Серовары D-K выделяются при различных клинических формах урогенитальной патологии человека. От 60 до 80% всех штаммов приходится на долю серотипа D, E и F с небольшими вариациями в мире. Серотип может определить инфекционность возбудителя, которая измеряется количеством включения образующих единиц (ВОЕ) хламидий в клинических образцах. Существуют публикации, устанавливающие взаимосвязь между серотипами, молекулярно-биологическими характеристиками *C. trachomatis* и различными клиническими проявлениями хламидийной инфекции. Так, по данным Д. Ф. Хворика (2008), сопоставительный анализ серологического варианта возбудителя с клиническими проявлениями показал, что более частыми причинами воспалительных процессов урогенитального тракта являются серотипы D и K *C. trachomatis*, вызывающие развитие уретрита, аднексита, эндоцервицита и другой патологии [33].

### Особенности диагностики мочеполового хламидиоза, ассоциированного с трихомонадной инвазией

Вызывает тревогу резкое увеличение числа смешанных форм, сочетание хламидиоза с другими патогенными и условно-патогенными бактериями. На основании нашего многолетнего опыта обследования и лечения пациентов с ИППП, данных литературы при разработке принципов комплексной терапии таких больных целесообразно учитывать следующие аспекты. При распространенных формах хламидийной урогенитальной инфекции частота обнаружения *T. vaginalis* может достигать 70–80% [23]. При этом в большинстве случаев обнаруживаются атипичные формы трихомонад с измененным метаболизмом и морфологией. Появились новые сведения о внутриклеточном поглощении и возможности внутриклеточного резервирования влагалищными трихомонадами хламидий in vitro, которые, несмотря на это, сохраняли способность к размножению и не утрачивали свою инфекционность. Данные особенности способствуют поддержанию хронического воспалительного процесса в мочеполовом тракте, что проявляется умеренной общей инфекционной интоксикацией, субфебрилитетом, незначительно выраженными признаками местного воспалительного процесса в различных отделах мочеполового тракта (уретрит, простатит, уретропростатит, цистит, цервицит, кольпит). Эти факты в большинстве случаев являются причинами неудачных курсов терапии больных мочеполовым хламидиозом. При лизисе трихомонад (например, в результате воздействия антипротозойных препаратов) хламидии освобождаются из них и способствуют поддержанию хронического воспалительного процесса в окружающих тканях. Неэффектив-

ность лечения мочеполового трихомоноза антитрихомонадными препаратами из группы нитроимидазолов чаще всего связана, по мнению ряда авторов, с низким содержанием цинка в крови, низкой абсорбцией препарата, низкой концентрацией препарата в очагах воспаления или инактивацией препарата под воздействием микрофлоры влагалища, а также с широким распространением устойчивых штаммов *T. vaginalis* к антитрихомонадным препаратам из группы нитроимидазолов. По нашим данным, последнее обстоятельство обуславливает частые рецидивы хламидийной инфекции, совпадающие с клинико-лабораторными признаками рецидивов урогенитального трихомоноза у 23,4% больных [17, 23]. Важно отметить, что при микст-ифекции часто хламидии остаются не выявленными. Использование при лечении сопутствующей инфекции антибиотиков приводит к изменениям антигенной структуры клеточной стенки хламидий, затрудняя диагностику и, соответственно, лечение хламидиоза.

### Диагностика распространенных форм хламидийной инфекции

Несмотря на многочисленные публикации об изучении различных проблем, ассоциированных с мочеполовой хламидийной инфекцией, наше понимание особенностей течения данной инфекции у лиц молодого возраста и связанных с ней заболеваний остается весьма ограниченным. Для мочеполового хламидиоза характерны самые разнообразные формы клинических проявлений. Однако в основном клиническая картина обуславливается формированием у больного первичных очагов инфекции в мочеполовом тракте, а в более отдаленные периоды болезни — и вторичных (экстраурогенитальных) очагов инфекции. При этом локализация первичных очагов в мочеполовом тракте обусловлена тропностью *C. trachomatis* к эпителию мочеполового тракта. При локализованных формах первичные очаги формируются в мочеполовом тракте, а в дальнейшем — в органах малого таза, лимфоузлах, дистальном отделе толстого кишечника, суставах, глазах, придаточных пазухах носа, центральной нервной системе. Таким образом, в зависимости от локализации первичных и вторичных очагов мочеполовой хламидийной инфекции развиваются те или иные ее клинические формы. Внедрение новых методов диагностики позволило не только расширить спектр патологии, вызываемой *C. trachomatis*, но и убедится в том, что возможны варианты диагностики не только ограниченных (локализованных) форм данной инфекции, но также и более сложных форм ее развития с поражением органов опорно-двигательного аппарата, центральной нервной системы, респираторного тракта, ЛОР-органов, органа зрения, сердечно-сосудистой системы. Однако среди исследователей не существует единого мнения о природе развития данных форм хламидийной инфекции. До сих пор не разработан единый алгоритм лабораторной диагностики различных клинических форм мочеполовых хламидиозов. Кроме того, несмотря на многочисленные усилия ученых, с помощью современных методов микробиологических исследований не удается объяснить типичные симптомы и признаки заболевания, которые наблюдаются у многих пациентов с мочеполовой хламидийной инфекцией. В связи с возникшими трудностями в клинико-лабораторной диагностике различных форм данной инфекции у исследователей в последнее время растет интерес к изучению патогенеза данной патологии, в том числе — к особенностям её иммунопатологии и патоморфологии, а также к применению современных инструментальных методов для выявления экстраурогенитальных (вторичных) очагов инфекции.

С целью изучения отличительных клинических особенностей течения локализованных (ЛФХИ) и распространенных форм (РФХИ) хронической мочеполовой хламидийной инфекции нами была проанализирована частота основных клинических синдромов у 650 пациентов. Из них 298 — с локализованными (уретриты, простатиты) и 352 — с распространенными формами хламидийной инфекции (мочеполовые хламидиозы, осложнившиеся нейрохламидиозом, хламидия-индуцированной артропатией, васкулитом, миокардитом, проктосигмоидитом). Результаты исследований представлены на рисунке 1.

Из представленных данных видно, что наиболее типичными синдромами у больных мочеполовым хламидиозом были синдром общей инфекционной интоксикации (41,2%), астеновегетативный синдром (40,9%), паховый лимфаденит (40,8%) и синдром иммунодефицита (63,1%). Оказалось, что для больных ЛФХИ наиболее типичными, наряду с синдромами поражения органов мочеполового тракта (уретрит, простатит), являлись общая инфекционная интоксикация (27,2%), паховый лимфаденит (31,2%), астеновегетативный синдром (75,8%), а также проявления иммунодефицита (32,9%). Однако данные синдромы значительно чаще диагностировались у больных РФХИ. Кроме них, для данной категории больных были характерны такие синдромы, как дисбактериоз кишечника (92,1%), хронический конъюнктивит (84,4%), артралгический синдром (33,2%), менингеальный синдром (27,6%), гепатолиенальный синдром (23,6%), аллергический синдром (32,6%), а также синдром анемии (12,2%). Наиболее характерным для данной формы инфекции был феномен обнаружения хламидий в крови (хламидемия) (63,4%).

Таким образом, выявленные нами отличительные особенности в диагностике основных клинических синдромов у больных с ЛФХИ и РФХИ были, вероятно, обусловлены влиянием хламидий на различные органы и системы инфицированных лиц. Обнаруженные при этом клинические отличительные особенности целесообразно использовать для дифференциальной клинико-лабораторной диагностики данных форм мочеполовой

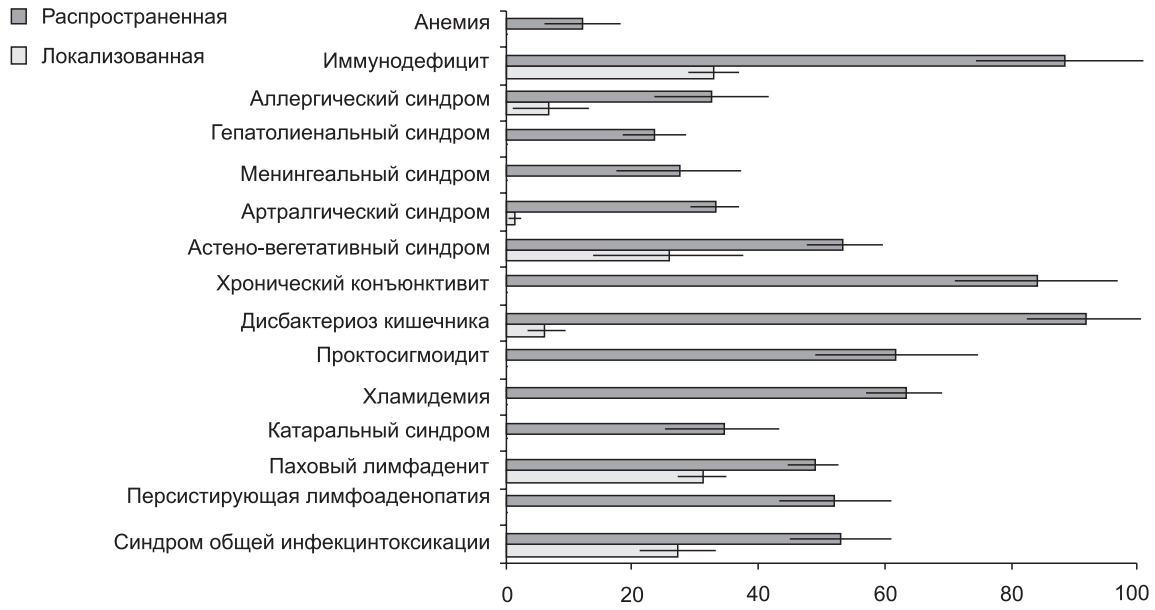



Рис. 1. Частота основных клинических синдромов у больных локализованными и распространенными формами мочеполового хламидиоза (%)

хламидийной инфекции. Применение новых методов диагностики ХИ на протяжении последнего десятилетия позволило существенно расширить представления о диапазоне хламидийных поражений (поражения глаз, придаточных пазух носа, синовиальных оболочек крупных суставов, центральной и периферической нервной системы, сосудов) у больных мочеполовым хламидиозом. Однако единого мнения о природе развития таких поражений у исследователей до настоящего времени не сложилось. Именно поэтому в последние годы существенным образом возрос интерес к совершенствованию методов как лабораторной, так и клинико-инструментальной диагностики экстраурогенитальных очагов ХИ. Учитывая вышеизложенное, мы сочли целесообразным провести комплексную диагностику хламидийных поражений с помощью современных лабораторных и клинико-инструментальных методов исследования. Для этой цели был существенным образом расширен перечень клинического материала от больных с подозрением на наличие у них экстраурогенитальных очагов ХИ. Для обоснования формирования у больных РФХИ мы применили дополнительно методы гистохимической оценки морфофункционального состояния слизистых оболочек, пораженных хламидиями, а также метод электронной микроскопии. Для уточнения локализации очагов хронической инфекции данным больным дополнительно применяли УЗИ органов малого таза и радиоизотопную стинциграфию. Анализ результатов диагностики *C.trachomatis* в различных клинических материалах от больных ЛФХИ и РФХИ позволил выявить ряд отличительных особенностей. Так, у больных ЛФХИ хламидии диагностировались только в мочеполовом тракте. Частота их обнаружения достоверно повышалась после применения биологической провокации с беталейкином. Наиболее информативным клиническим материалом у таких больных оказались: секрет предстательной железы, эякулят и центрифугат I порции мочи. Применение биологической провокации с беталейкином повышало частоту обнаружения хламидий в соскобном материале из уретры в 1,5–2 раза. У больных РФХИ *C.trachomatis* обнаруживалась как в мочеполовом тракте, так и за его пределами: в ротоглотке, конъюнктиве, придаточных пазухах носа, синовиальной жидкости и периферической крови. Применение биологической провокации с беталейкином также достоверно увеличивало частоту обнаружения хламидий в различных клинических материалах. У пациентов с РФХИ, протекающей по типу моноинфекции, хламидемия диагностировалась в 69,1% случаев, а у аналогичных больных с микст-ИППП с участием хламидий — в 84,9%. В то же время с помощью культурального метода из периферической крови удалось выделить «жизнеспособные» хламидии у 47,1% лиц с монохламидиозом и у 30,1% — с микст-ИППП с участием хламидий. Низкий процент обнаружения «жизнеспособных» хламидий в крови у пациентов с микст-инфекцией был, вероятно, обусловлен их преимущественной внутриклеточной локализацией в нейтрофилах и макрофагах, а также антагонистическим взаимодействием хламидий с микоплазмами, уреаплазмами и бактероидами. Изучение морфофункционального состояния слизистой оболочки уретры у больных ЛФХИ и РФХИ помогло выявить ряд особенностей, которые позволяют в какой-то степени объяснить механизмы взаимодействия хламидий с эпителиальными клетками, а также формирования в тканях участков склерозирования. Результаты данных

исследований позволили сделать предположение о том, что формирование экстраурогенитальных очагов ХИ происходит на фоне необратимых склеротических и дистрофических изменений в слизистой мочеполового тракта. Вероятно, эти изменения способствуют в какой-то степени транслокации хламидий через измененную слизистую оболочку в кровь и лимфу. Применение трансабдоминального и трансректального ультразвукового сканирования малого таза у мужчин с ЛФХИ и РФХИ позволило установить, что у 76,2% пациентов с хроническим простатитом хламидийной этиологии определяются УЗИ-признаки различных патологических процессов в предстательной железе. При этом у пациентов с РФХИ данные изменения диагностировались достоверно чаще. Вероятно, обнаруженные УЗИ-изменения в предстательной железе были следствием склеротических и дистрофических процессов, обусловленных влиянием хламидий на железистую ткань железы. Нельзя при этом исключить, что данные патологические изменения также могли способствовать транслокации хламидий в кровь и лимфу. Применение электронной микроскопии позволило также выявить ряд особенностей в морфофункциональном состоянии слизистой гайморовых пазух и клетках ликвора, инфицированных хламидиями у больных распространенной формой мочеполового хламидиоза. Полученные результаты позволили обнаружить убедительные доказательства присутствия хламидий в данных клинических материалах, а также их размножения на фоне формирования в инфицированных хламидиями клетках склеротических и дистрофических изменений. Наиболее убедительные данные о формировании у больных хроническим мочеполовым хламидиозом экстраурогенитальных очагов были получены с помощью радиоизотопной сцинтиграфии. Данный метод позволил выявить множественные места повышенного накопления аутолейкоцитов (АЛ), меченых 99Tc-ГМПАО как у мужчин, так и у женщин с подозрением на РФХИ. Результаты применения радиоизотопной сцинтиграфии позволили обнаружить очаги хронического воспаления у больных РФХИ не только в области мочеполовых органов, но и в стенке проктосигмоидального отдела кишечника, в области ротоглотки, сердца, придаточных пазух носа, лимфоузлах малого таза, крупных суставах. Этиологическая расшифровка выявленных очагов хронической инфекции у обследованных с применением современных лабораторных методов (ПИФ, ПЦР, КМ) позволила выявить в них *C. trachomatis*, что доказывает их хламидийную природу.

### Диагностика персистируюших форм хламидийной инфекции

Немаловажное значение при выборе диагностической стратегии в диагностике хламидиоза имеет топический диагноз и его клиническое течение. Учет этих факторов определяет и очаг исследования при заборе биологического материала. При выраженных клинических проявлениях, например, уретрита, цервицита, вагинита такое решение не представляет сложностей. Доступность и ограниченность очага воспаления позволяет решить вопрос без сомнений. Значительные трудности возникают при персистирующей форме инфекции, когда получение материала для прямой детекции возбудителя оказывается затруднено или невозможно. При персистенции *C. trachomatis* культуральный метод также затруднителен. Использование культуры клеток требует многократного пассажа, так как при персистирующей инфекции хламидии не культивируются вследствие неинфекционности и непродуктивности персистирующих включений в результате минимального обмена веществ в самой клетке возбудителя. Метод прямой иммунофлюоресценции также малоинформативен для диагностики персистирующей инфекции. При персистенции продукция МОМР и ЛПС блокирована, и выявление антигена на поверхности элементарных телец (ЭТ) *C. trachomatis* с помощью моноклональных антител не представляется возможным. Кроме того, персистенция обычно подразумевает относительно небольшую концентрацию инфекционных телец в эпителиоцитах, что, учитывая упомянутый выше «количественый ценз» для флюоресцирующих телец, необходимый для положительного результата, делает диагноз ещё более проблематичным. Диагностика персистирующего хламидиоза затруднена независимо от пола. При хроническом хламидийном цервиците у женщин, осложненном поражением верхних отделов урогенитального тракта, использование методов культуры клеток и прямой иммунофлюоресценции также неприемлемо для подтверждения этиологического диагноза. Метод ПЦР за счет высокой чувствительности и контролируемой специфичности позволяет выявлять персистирующие инфекции, но требует проведения провокационных мероприятий в подготовке пациентов перед забором материала. Альтернативными методами диагностики персистирующей формы хламидиоза могут быть серологические методы с определением антител против возбудителя и динамика их титра. В частности, уровень хламидийных антител класса IgG оказывается в 2–4 раза выше при экстрагенитальных проявлениях хламидийной инфекции, чем при неосложненном хламидиозе нижних отделов урогенитального тракта [10, 14, 16].

### Заключение

Таким образом, в лабораторной диагностике хламидийной инфекции сложилась своеобразная ситуация: с одной стороны, применяется значительное количество тест-систем и диагностикумов, с другой — имеются трудности с регламентацией лабораторных исследований, интерпретацией полученных результатов. Все это свидетельствует в пользу создания единых клинико-

лабораторных алгоритмов обследования больных с воспалительными урогенитальными заболеваниями, необходимости одновременного определения сопутствующей условно-патогенной микрофлоры. Существующие методы диагностики хламидийной инфекции различаются между собой по времени проведения анализа, чувствительности, специфичности, воспроизводимости и достоверности, соотношению «цена–качество» и другим показателям. Достоверные данные о наличии (отсутствии) *C.trachomatis* можно получить лишь на основании результатов комплексного обследования больных. При подозрении на урогенитальный хламидиоз предпочтительным является ПИФ с культурой клеток или ПЦР-анализ. Серологические тесты (ИФА) имеют вспомогательное значение и для диагностики хламидиоза должны обязательно использоваться в комплексе с культурой клеток или ПЦР-анализом. Отсутствие антител обоих классов (или их низкие титры) при положительной ПЦР может свидетельствовать о неадекватном иммунном ответе, длительном хроническом течении хламидиоза, персистирующей инфекции, хламидия-индуцированной артропатии, поражениях мочеполовых органов склеротического и фиброзного характера.

В мировой практике накоплен огромный опыт, свидетельствующий о необходимости реализации комплексного подхода при клинико-лабораторном обследовании пациентов, так как использование разноплановых методологий, которые дополняют и подтверждают друг друга, повышает достоверность диагноза и нивелирует технические ошибки. На наш взгляд, необходимо основное внимание сконцентрировать на анализе практически достижимой информативности отдельных методов или их комбинаций, а также на причинах получения недостоверных результатов тех или иных диагностических исследований. Такой подход, по нашему мнению, может способствовать формированию критического отношения специалистов к результатам лабораторно-диагностических исследований и выбору ими правильной тактики ведения обследуемых пациентов. Эффективное выявление возбудителя для успешной борьбы с ним является чрезвычайно актуальным, в связи с чем специалисты, занимающиеся этой проблемой, нуждаются в совершенных методологиях диагностики.

Надежность лабораторных данных и обоснованность клинических заключений могут быть достигнуты только при сочетании высокого качества выбранных средств лабораторной диагностики, достаточной квалификации персонала лаборатории и необходимого уровня подготовки врачей, способных к критическому анализу совокупности лабораторных и клинико-анамнестических данных.

**Литература**

1. Абакарова П. Р. Урогенитальный хламидиоз: принципы диагностики и лечения / Гинекология: журнал для практических врачей. — 2006. — Том 8, № 2. — С. 21–23.

2. Баткаев Э. А., Липова Е. В. Урогенитальный хламидиоз: Пособие для врачей. — М., 2004. — 60 с.

3. Богуш П. Г., Скрипкин Ю. К. Диагностика микроуреаплазмозов и хламидийной инфекции в условиях московского кожно-венерологического клинического диспансера // Клиническая дерматология и венерология. — 2005. — № 3. — С. 87–91.

4. Бойцов А. Г., Порин А. А., Ластовка О. Н. и др. Оценка эффективности серодиагностики хламидийной инфекции с помощью иммуноферментного анализа // Вестник дерматологии и венерологии, 2002. — № 1. — С. 43–45.

5. Возианов А. Ф., Ващенко В. В., Дранник Г. Н., Руденко А. В., Дриянская В. В., Горпинченко И. И. Методические аспекты диагностики урогенитального хламидиоза: Методические рекомендации. — Киев. — 2002. — 18 с.

6. Гаспаров А. С., Летучих А. А., Хилькевич Е. Г., Флоров В. С. Современные методы диагностики и лечения урогенитального хламидиоза // Акушерство и гинекология: Научно-практический журнал. Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии РАМН. — 2003. — № 3. — С. 59–60.

7. Глазкова Л. К., Башмакова Н. В., Моторнюк Ю. И., Ремизова И. И. Особенности течения хламидийной инфекции у беременных. Совершенствование диагностики и лечения // ИППП. — 2002. — № 2. — С. 15–20.

8. Гомберг М. А., Соловьев А. М. Современная тактика лечения больных различными формами урогенитального хламидиоза // Лечащий врач. — 2003. — № 7. — С. 50–53.

9. Дмитриев Г. А. Урогенитальная хламидийная инфекция: подходы к диагностике и терапии // Клиническая дерматология и венерология. — 2003. — № 2. — С. 24–28.

10. Епифановский А. И., Сидорович С. Ю., Бармина Г. В. и др. Диагностическое значение маркеров хламидийной инфекции при осложненной, неосложненной и бессимптомной формах урогенитального хламидиоза // Инфекции, передаваемые половым путем: Журнал сексуального здоровья и ВИЧ-инфекция. — 2003. — № 3. — С. 18–23.

11. Кишкун А. А., Миколаускас В. П., Аснис Н. П. Диагностическая эффективность методов лабораторной диагностики урогенитального хламидиоза // Клиническая лабораторная диагностика. — 2004. — № 9. — С. 31.

12. Копнина Е. О. Современные подходы к диагностике хламидиоза: Обзор литературы / Лабораторная диагностика инфекционных заболеваний. — 2006. — № 1 (3). — С. 23–26.

13. Костюк С. А., Заборонок Э. Н. Клинико-лабораторные аспекты диагностики урогенитального хламидиоза у мужчин / Медицина: науч.-практ. мед. журн. в Беларуси. — 2007. — № 2. — С. 64–68.

14. Кубанова А. А., Васильев М. М., Говорун В. М. и др. Современные подходы к диагностике и терапии латентной хламидийной инфекции урогенитального тракта / Вестник дерматологии и венерологии: Научно-практический рецензируемый журнал. — 2004. — № 3. — С. 6–10.

15. Кузьмин В. Н. Современные аспекты диагностики и лечения хламидийной инфекции / Лечащий врач. — 2007. — № 9. — С. 18–20.

16. Куляш Г. Ю. Персистирующая урогенитальная хламидийная инфекция: возможности и нерешенные вопросы лабораторной и клинической диагностики // ИППП. — 2003. — № 3. — С. 3–8.

17. Лобзин Ю. В., Волжанин В. М., Позняк А. Л. Новое в диагностике и лечении распространенных форм мочеполового хламидиоза // Вестник Российской Академии медицинских наук: ежемесячный научно-теоретический журнал. — 2003. — № 10. — С. 29–34.

18. Лобзин Ю. В., Ляшенко Ю. И., Позняк А. Л. Хламидийные инфекции: руководство для врачей. — СПб: Фолиант, 2003. — 400 с.

19. Манзенюк И. Н., Воробьева М. С., Никитюк Н. М., Васильев М. М. Иммуноферментный анализ в серодиагностике инфекций, вызываемых *C.trachomatis* // Вестник дерматологии и венерологии. — 2004. — № 1. — С. 23–27.

20. Марданлы С. Г., Куляш Г. Ю. Проблемы достоверности и объективной оценки результатов лабораторной диагностики гонореи, трихомониаза и урогенитального хламидиоза: Учебно-методическое пособие. — Электрогорск, 2007. — 38 с.

21. Михайличенко В. В., Бойцов А. Г., Есипов А. С. Клиническая интерпретация результатов лабораторного обследования пациентов с урогенитальным хламидиозом // Terra Medica nova. — СПб., 2000.– № 4. — С. 6–10.

22. Молочков В. А. Урогенитальный хламидиоз. — М.: БИНОМ, 2006. — 208 с.

23. Позняк А. Л. Распространенные формы мочеполового хламидиоза у лиц молодого возраста: диагностика, клиника, лечение. Автореф. дис. … д-ра мед. наук. — СПб., 2003. — 39 с.

24. Приказ Минздрава РФ от 30 июля 2001 г. № 291. «О мерах по предупреждению распространения инфекций, передаваемых половым путем» (с изменениями от 15 ноября 2001 г.).

25. Протоколы лабораторной диагностики инфекции, вызванной *Chlamydia trachomatis* (урогенитальной хламидийной инфекции) в Российской Федерации (проект). — ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологий». — 2008 г. — 39 с.

26. Радзивил Т. Т., Дружинина Т. В., Павлюк А. В., Королева И. В. Эффективность диагностики урогенитального хламидиоза с помощью различных лабораторных методов / «Новости “Вектор-Бест”». — Кольцово, 2005. — № 4(38). — С. 3–5.

27. Савенкова М. С. Хламидийная инфекция на пороге третьего тысячелетия / Детские инфекции: научно-практический журнал Ассоциации педиатров-инфекционистов. — 2004. — № 1. — С. 36–42.

28. Савичева А. М. Этиологическая диагностика и терапия репродуктивно значимых инфекций / Трудный пациент. — М., 2007. — № 1. — С. 21–28.

29. Семенов В. М., Семенов Д. М., Хворик Д. Ф. и др. Хламидийная инфекция: Витебский государственный медицинский университет. — Витебск, 2006. — 205 с.

30. Сидорович С. Ю., Латыпова М. Ф., Коликова Т. Г. и др. Сравнительный анализ методов лабораторной диагностики урогенитального хламидиоза / Вестник дерматологии и венерологии. — 2001. — № 1. — С. 9–10.

31. Смирнова Т. А., Покатович О. К. Современный алгоритм диагностики хламидийной инфекции / Медицинская панорама. — 2004. — № 8. — С. 13–16.

32. Федорова В. А., Банникова В. А., Аликберов Ш. А., Елисеев Ю. Ю., Трошкин В. А. Сравнительная эффективность обнаружения возбудителя урогенитального хламидиоза методами иммунофлюоресценции, ПЦР и дот-иммуноанализа // Клиническая лабораторная диагностика. — М., 2007. — № 7. — С. 30–35.

33. Хворик Д. Ф. Серотипы и молекулярно-биологические характеристики *C. trachomatis*. Актуальные вопросы инфекционной патологии / Под ред. проф. В. М. Семенова. Материалы международного Евро-Азиатского конгресса по инфекционным болезням. — Витебск, 2008. — С. 30.

34. Хрянин А. А., Решетников О. В., Кривенчук Н. А. и др. Хламидиоз у женщин: сопоставление разных методов диагностики, факторы риска и клинические проявления // Вестник дерматологии и венерологии. — 2006. — № 2. — С. 40–43.

35. Ченцова О. Б., Межевова И. Ю., Качков И. А. Метод специфической диагностики гематогенных форм офтальмохламидиоза // Клиническая офтальмология. — 2007. — Том 8, № 2. — С. 52–55.

36. Чураков А. А., Куличенко А. Н., Казакова Е. С. К вопросу о лабораторной диагностике урогенитального хламидиоза // Клиническая лабораторная диагностика. — 2005. — № 2. — С. 43–47.

37. Шалепо К. В., Шипицина Е. В., Савичева А. М., Домейка М. Сравнение методов лабораторной диагностики урогенитальных инфекций, вызываемых *Chlamydia trachomatis* // Акушерство и женские болезни. — 2001. — № 4. — С. 8–11.

38. Шилова Е. А. Сравнительная оценка экспрессных методов диагностики урогенитального хламидиоза. Автореф. дис. … канд. мед. наук. — СПб., 1997. — 22 с.

39. Шипицына Е. В., Воробьева Н. Е., Савичева А. М., Соколовский Е. В., Гущин А. Е., Рыжих П. Г., Шипулин Г. А. Применение метода NASBA (nucleic acid sequence-based amplification) в реальном времени (NASBA-real-time) для диагностики урогенитальной хламидийной инфекции // Журнал акушерства и женских болезней. — 2005. — Т. 54, № 4. — С. 17–21.

40. Якубович А. И., Корепанов А. Р. Урогенитальный хламидиоз. — Иркутск. — 2007. — 67 с.

41. Battle T. J., Golden M. R., Suchland K. L., et al. Evaluation of laboratory testing methods for Chlamydia trachomatis infection in the era of nucleic acid amplification // J. Clin. Microbiol., 2001. — Vol. 39. — P. 2924–2927.

42. Deiman B., van Aarle P., Sillekens P. Characteristics and applications of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) // Mol. Biotech., 2002. — Vol. 20. — P. 163–179.

43. Center for Diseases Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2006. MMWR 2006; Vol. (No. RR-11).

44. Meyers D. S., Luckhaupt S. Screening for Chlamydial Infection: An Evidence Update for the U.S. Preventive Services Task Force // Ann. Intern. Med., 2007; 147: 128–141.

# ВЛИЯНИЕ СУХОГО ВЫСОКОДИСПЕРСНОГО АЭРОЗОЛЯ ХЛОРИДА НАТРИЯ НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА *STREPTHOCOCCUS PNEUMONIAE*, ПЕРСИСТИРУЮЩЕГО НА СЛИЗИСТОЙ ЛАРИНГОФАРИНГЕАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ, В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

**А. В. ЧЕРВИНСКАЯ*, А. С. КВЕТНАЯ**, Т. Б. КОРЖЕНЕВСКАЯ****
*** Респираторный центр ФГУЗ Клинической больницы №122 им. Л. Г. Соколова Федерального медико-биологического агентства**
**** ФГУ НИИ детских инфекций Росздрава, Санкт-Петербург, Россия**

***Резюме.*** *Проведено экспериментальное исследование, позволившее изучить воздействие сухого высокодисперсного аэрозоля хлорида натрия на жизнеспособность и биологические свойства и персистентные характеристики микроорганизмов, функциональное состояние ларинготрахеального эпителия слизистой передней и заднемедиальной поверхности ротоглотки.*

*В качестве тест-культуры использовался стандартный штамм S. pneumoniae, свойства которого исследовались в экспериментальной аэрозольной камере. Свойства эпителия дыхательного тракта изучались на модели клеток фарингеального эпителия, полученных у 10 волонтеров, до и после ингаляции сухого аэрозоля хлорида натрия. В качестве контроля использован аэрозоль 0,9% раствора хлорида натрия.*

*Установлено, что сухой высокодисперсный аэрозоль хлорида натрия оказывает ингибирующий эффект на рост и жизнеспособность микроорганизмов, изменяет их биологические свойства. После экспозиции аэрозоля наблюдалось усиление электрофизиологической функциональной активности эпителиальных клеток и возрастание их колонизационной резистентности. Полученные данные свидетельствует о благоприятном воздействии сухого высокодисперсного аэрозоля хлорида натрия на защитные свойства клеток респираторного тракта и повышении неспецифической защиты организма.*

***Ключевые слова:*** *сухой аэрозоль хлорида натрия, ингаляции, галотерапия, микроорганизмы, фарингеальный эпителий.*

# EFFECT OF THE DRY SODIUM CHLORIDE AEROSOL ON PHYSIOLOGICAL PROPERTIES OF *S. PNEUMONIAE* AND THE MUCOSA EPITHELIUM AT THE EXPERIMENT

**A. V. CHERVINSKAYA*, A. S. KVETNAYA**, T. B. KORZHENEVSKAYA****
*** Respiratory Center; Federal State Institution of Health Care, Clinical Hospital N 122 of Russian Federal Medical Biological Agency;**
**** Federal State Institution "Scientific Research Institute of Pediatric Infections; Federal Agency for Health Care and Social Development"; St. Petersburg, Russia**

***Summary.*** *The dry aerosol of sodium chloride with a predominant fraction of respirable particles is the main factor of action of the inhalation therapy which was given the name of halotherapy. The goal of this work was to study effects of the dry, fine-grained sodium chloride aerosol on the functional state of mucosal epithelium as well as on vital capability and biological properties of microorganisms.*

*As a test culture, we used the standard S. pneumoniae strain, whose properties were studied in an experimental aerosol chamber. Properties of the respiratory tract epithelium were studied using a model of pharyngeal epithelium cells obtained from 10 healthy volunteers before and after inhalation of the dry sodium chloride aerosol. As a control, an aerosol of 0,9% sodium chloride solution was used.*

*It has been established that the dry, fine-grained sodium chloride aerosol produces an inhibitory effect on growth and vital capability of microorganisms and changes their biological properties. After exposition to the aerosol there was observed an increase of the electrophysiological functional activity of the epithelial cells and a rise of their colonizational resistance.*

***Keywords:*** *dry sodium chloride aerosol, inhalations, halotherapy, respiratory diseases, microorganisms, mucosa epithelium.*

Аэродисперсная среда сухого аэрозоля хлорида натрия с преобладающей фракцией респирабельных частиц является основным действующим фактором галотерапии, широко применяемой для лечения и реабилитации больных с болезнями органов дыхания (БОД) [1, 16, 18]. В патогенезе острых и хронических БОД значимая роль принадлежит бактериальному воспалительному процессу [3, 14, 20, 21].

Бактериальная инфекция на клеточном уровне представляет собой результат взаимодействия бактериальной клетки с клеткой организма хозяина. Поскольку эпителиальные клетки выстилают поверхности, имеющие контакт с внешней средой, в том числе и эпителиальные клетки респираторного тракта, то они поражаются в первую очередь. Патогенный микроб обладает функцией защиты от фагоцитоза, функцией колонизации и поражающей, или токсической функцией. Завершенный инфекционный процесс осуществляется только при наличии всего комплекса детерминант патогенности микроба [9]. Начало инфекционного процесса отождествляется с прикреплением возбудителя к клеткам-мишеням. Прикрепление бактерии к эпителиальной поверхности является необходимым условием для колонизации [5, 12, 28]. Клетка-клеточное взаимодействие на начальном этапе развития инфекционного процесса проявляется в нескольких видах связей, отличающихся по природе и по уровню специфичности: 1) связи, основанные на взаимодействии электростатических сил; 2) связи, определяющиеся гидрофобными свойствами поверхности; 3) связи, в основе которых лежит лиганд-рецепторное взаимодействие. Именно первые два этапа характеризуются низким уровнем специфичности [9].

Условия и факторы, влияющие на характер взаимодействия микроорганизма с клеткой хозяина, определяют особенности течения инфекционного процесса. В связи с этим представляется значимой оценка влияния сухого высокодисперсного аэрозоля хлорида натрия на клетки возбудителя с одной стороны, и клетки эпителия — с другой, для раскрытия механизмов действия этого лечебного фактора.

**Материалы и методы исследования**

Влияние сухого высокодисперсного аэрозоля хлорида натрия на жизнеспособность и биологические свойства микроорганизмов исследовалось в аэрозольной камере объемом 5,5 л. В качестве тест-культуры использовался штамм *S. pneumoniae*, микроорганизмы которого являются наиболее распространенным этиологическим фактором БОД [3, 14, 19, 20]. Использовался тест-штамм *S. pneumoniae* T1N1, T2N2, T3N3, типичный по морфологическим и биохимическим свойствам. Штамм получен из ГИСК им. Тарасевича (Москва). Суточную культуру *S. pneumoniae* выращивали на 5% кровяном агаре в режиме повышенного содержания $CO_2$ при 37 °С в течение 18–24 часов. Определенное число микробных клеток в 1 мл (м.кл/мл) суспензии — колониеобразующих единиц (КОЕ) 105 м. кл/мл — наносилось на чашки Петри, которые помещались в аэрозольную камеру.

Аэродисперсная среда создавалась с помощью галоингалятора ГИСА-01 «Галонеб» (ЗАО «Аэромед»). Плотность сухого высокодисперсного аэрозоля хлорида натрия составляла 3–5 мг/м$^3$, что соответствовало средней концентрации аэрозоля в галокамере при проведении процедур для больных БОД [17]. Более 80% частиц сухого солевого аэрозоля имели размеры от 1 до 5 мкм (респирабельная фракция). Длительность экспозиции аэрозоля на тест-культуры была 5, 15 и 30 минут. В каждом тесте использовалось по 10 чашек Петри. После воздействия аэрозоля чашки Петри с тест-штаммами инкубировали в термостате при 37 °С в течение 18–24 часов, затем подсчитывали КОЕ и изучали культуральные биологические свойства *S. pneumoniae*.

В качестве контроля использована аэродисперсная среда 0,9% раствора хлорида натрия, создаваемая в аэрозольной камере с помощью компрессорного ингалятора “PARI-Boy” (Германия). Тест-культура, процедуры длительности воздействия и контроля не отличались по параметрам, использованным в опыте.

Действие сухого высокодисперсного аэрозоля хлорида натрия на свойства эпителия дыхательного тракта изучалось на модели клеток фарингеального эпителия, отличающегося сравнительной мономорфностью и высокой чувствительностью к пневмококку и другой условно-патогенной микрофлоре [22, 27]. Браш-биоптаты получали со слизистой переднемедиальной поверхности миндалин с помощью щеточки от эндоскопа, укрепленной на держателе, что позволяло при однократном заборе получать достаточное количество эпителиальных клеток (> 1 000 000 клеток/мл). Взятый со щеточки биоптат суспензировали в центрифужной пробирке в 1 мл стерильного фосфатно-солевого буферного раствора, а затем готовили препараты-отпечатки на предметных стеклах.

Исследование клеток фарингеального эпителия проведено у 10 волонтеров (условно здоровых людей) в возрасте от 18 до 58 лет (средний возраст 39,6 ± 3,5 лет).

Электрофизиологическое состояние эпителиальных клеток оценивали по методу М. С. Гончаренко [4]. Оценка показателя электрокинетической активности (ЭЛА) проводилась с помощью прибора БЭ-1 (Харьковский НИИ дерматологии и венерологии). Полученный материал наносили на покровное стекло, которое помещали в камеру между электродами. Проводилось тестирование клеток фарингеального эпителия по характеристике их поведения в переменном электрическом поле, проявляющееся в электрокинетических реакциях, то есть подвижности выраженных структур цитоплазматической мембраны, цитоплазмы и ядра. ЭЛА клеток определена процентным отношением клеток с подвижными структурами на 100 просмотренных в поле зрения клеток.

Адгезивную активность на модели фарингеального эпителия изучали по методу А. С. Кветной [12], в основу которого заложены способы, описанные Gibbons et al. [22], К. Б. Грабовской и А. А. Тотоляном [6]. Совместную инкубацию эпителиоцитов и пневмококка (в соотношении 1 : 100) проводили в течение 1 часа при 37 °С.

Степень адгезивности штамма оценивалась по индексу адгезии (ИА) микроорганизмами тест-штамма —

среднему числу микробных клеток на один эпителиоцит, учитывая 50 участвующих в адгезивном процессе эпителиальных клеток. Колонизационная активность оценивалась по индексу инфицирования (ИИ) — % эпителиоцитов с адгезированными клетками пневмококка из 50 сосчитанных.

Показатели ЭЛА, ИА и ИИ определялись до и после 10-минутной ингаляции сухого высокодисперсного аэрозоля хлорида натрия с плотностью 3–5 мг/м$^3$ с помощью галоингалятора «Галонеб». В качестве контроля использовался аэрозоль физиологического раствора, подаваемый с помощью компрессорного ингалятора "PARI-Boy" (Германия).

**Результаты исследования**

Показатель КОЕ пневмококка достоверно снизился уже после 5-минутного пребывания штамма в аэродисперсной среде сухого высокодисперсного аэрозоля хлорида натрия (табл. 1). Жизнеспособность штамма ухудшалась по мере увеличения экспозиции аэрозоля. Различия статистически достоверны между 5-, 15- и 30-минутным пребыванием пневмоккокка в аэродисперсной солевой среде ($p < 0,001$).

*Таблица 1*

**Жизнеспособность тест-штамма пневмококка в моделированной среде сухого высокодисперсного аэрозоля хлорида натрия**

| | КОЕ *S. pneumoniae* (м. кл./мл), M ± m | |
|---|---|---|
| Время экспозиции | Сухой аэрозоль NaCl | Влажный аэрозоль 0,9% NaCl |
| Число исследований | 10 для каждого опыта | 10 для каждого опыта |
| До воздействия | $7,1 \cdot 10^5 \pm 6,0 \cdot 10^4$ | $6,8 \cdot 10^5 \pm 6,9 \cdot 10^4$ |
| 5 минут | $6,0 \cdot 10^4 \pm 7,1 \cdot 10^{3*\#}$ | $6,5 \cdot 10^5 \pm 5,8 \cdot 10^4$ |
| 15 минут | $5,2 \cdot 10^3 \pm 6,8 \cdot 10^{2*\#}$ | $5,4 \cdot 10^5 \pm 7,1 \cdot 10^4$ |
| 30 минут | $3,0 \cdot 10^2 \pm 8,6 \cdot 10^{1*\#}$ | $5,1 \cdot 10^5 \pm 6,5 \cdot 10^4$ |

Примечание: * — достоверное различие по сравнению с исходным уровнем при $p < 0,001$; # — достоверное различие по сравнению с предыдущим измерением при $p < 0,001$.

После каждой экспозиции сухого аэрозоля хлорида натрия у популяции микробов каждого опыта, включающего 10 образцов, изучалась морфология, чувствительность к оптохину, способность лизироваться 20% желчью и гидролизировать инулин. Используемые в эксперименте тест-штаммы были типичными грамположительными диплококками с хорошо выраженной капсулой, которые на кровяном агаре росли в виде плоских, прозрачных, блестящих колоний, диаметром 1–2 мм. Все культуры были чувствительны к оптохину, обладали α- и β-гемолитической активностью. В процессе проведения эксперимента после каждого опыта наблюдался рост шероховатых колоний пневмококка (R-формы). С увеличением времени экспозиции аэрозоля число таких колоний увеличивалось, возникали более глубокие изменения культуральных и морфологических свойств *S. pneumoniae*.

Колонии R-форм пневмококка, в отличие от исходных S-форм, были более мелкими (0,5–1,0 мм в диаметре), мутными, с шероховатой поверхностью и сильно изрезанными краями. В процессе старения (через 48–72 часа) колонии приобретали серовато-коричневатый пигмент. Для них было характерно образование выраженного α- и β-гемолиза на 5% кровяном агаре. В мазках таких колоний, окрашенных по Граму, наблюдали образование длинных цепей диплококков, полиморфизм клеток пневмококка, значительно различавшихся как по форме, так и по диаметру. Отмечалось увеличение размеров диплококков и истончение их капсулы, у большинства клеток капсула едва определялась. Эти культуры, также как и исходные S-формы, активно гидролизировали инулин, но не лизировались желчью и проявляли устойчивость к оптохину (6 мкг/мл). Выживаемость штамма пневмококка и свойства его колоний практически не претерпевали изменений при пребывании в аэрозольной среде физиологического раствора хлорида натрия при различном времени его экспозиции (табл. 1).

Полученные результаты эксперимента свидетельствуют об ингибирующем эффекте сухого высокодисперсного аэрозоля хлорида натрия на жизнеспособность пневмококка. Действие аэрозоля вызывало выраженные изменения морфологических и культуральных свойств оставшихся жизнеспособными клеток микроорганизмов. Происходила трансформация штамма *S. pneumoniae* из исходной капсульной S-формы в бескапсульную R-форму. Ингибирующий жизнеспособность эффект и культуральные и морфологические изменения прогрессировали по мере увеличения длительности действия сухого аэрозоля хлорида натрия.

При исследовании исходного уровня ЭЛА у здоровых лиц нами были отмечены колебания этого показателя в пределах от 18 до 88% (табл. 2).

Исследование электрофизиологической активности клеток фарингеального эпителия после экспозиции сухого высокодисперсного аэрозоля хлорида натрия показало значимое увеличение числа активных клеток у всех испытуемых ($p < 0,01$) (рис. 1). Среднее значение показателя ЭЛА клеток по группе до и после воздействия имело достоверные различия — 33,9 ± 7,4 и 54,9 ± 6,0% соответственно ($p < 0,05$). ЭЛА клеток фарингеального эпителия после воздействия аэрозолем 0,9% раствора хлорида натрия (контроль) существенно не изменилось (29,6 ± 3,1%; $p > 0,05$).

При исследовании адгезивной активности тест-штамма пневмококка к клеткам фарингеального эпителия до и после обработки слизистой сухим аэрозолем хлорида натрия выявлено значительное снижение пока-

зателя ИА по сравнению с исходным уровнем (29,3 ± 4,3 и 8,3 ± 4,1 соответственно, $p < 0,01$). Показатели ИА у тех же испытуемых после ингаляций физиологического раствора существенно не изменились (среднее значение 27,9 ± 5,6; $p > 0,05$).

*Таблица 2*

**Показатели электрокинетической активности клеток фарингеального эпителия у взрослых доноров**

| Обследованные | Возраст | Число тестов | % эпителиоцитов с подвижными структурами (ЭЛА), M ± m |
|---|---|---|---|
| 1 | 57 | 5 | 21,0 ± 1,2 |
| 2 | 45 | 5 | 18,0 ± 1,3 |
| 3 | 47 | 5 | 20,8 ± 3,2 |
| 4 | 31 | 5 | 25,4 ± 1,7 |
| 5 | 25 | 5 | 27,2 ± 1,9 |
| 6 | 36 | 5 | 20,1 ± 2,4 |
| 7 | 40 | 5 | 25,2 ± 3,4 |
| 8 | 18 | 5 | 87,6 ± 5,1 |
| 9 | 25 | 5 | 58,4 ± 1,8 |
| 10 | 47 | 5 | 35,5 ± 2,8 |

При изучении взаимосвязи электрофизиологической активности клеток фарингеальной слизистой с показателями колонизации обнаружена обратная корреляционная зависимость между показателями ЭЛА, адгезивной и колонизационной активностью тест-штаммов *S. pneumoniae* (r = –1,0 и –1,0 соответственно). Для дальнейшего сопоставления с показателями ИА были использованы три условных уровня ЭЛА: низкий — < 20%, средний — 20–50% и высокий — > 50%. Так, адгезивная и колонизационная активность тест-штаммов пневмококка к клеткам фарингеального эпителия с высоким уровнем ЭЛА была минимальной и составила 4,3 ± 3,6 и 1,9 ± 0,7 соответственно, и наоборот, при низком уровне ЭЛА эти показатели для пневмококка были максимальным и составили 103 ± 1,2 и 57,2 ± 0,7 соответственно (рис. 2). Полученные данные свидетельствуют о взаимосвязи ЭЛА клеток фарингеального эпителия с показателями колонизационной активности микрофлоры.

## Обсуждение

Экспериментально установлено, что аэродисперсная среда сухого аэрозоля хлорида натрия с преобладающей респирабельной фракцией частиц оказывает ингибирующий эффект на жизнеспособность *S.pneumoniae*, наиболее значимого микроорганизма в развитии инфекционного процесса дыхательных путей. Под действием аэрозоля выжившие микроорганизмы изменяют свои тинкториальные и культуральные свойства, теряют капсулу, трансформируясь в R-формы. Процесс диссоциации и потери капсулы сопровождается снижением их вирулентности и гиалуронидазной активности и повышением адгезивной активности [12]. Основываясь на физических свойствах активного сухого высокодисперсного аэрозоля хлорида натрия, можно утверждать, что процесс его воздействия на клетки пневмококка сопровождается обезвоживанием последних и усилением их гидрофобных свойств.

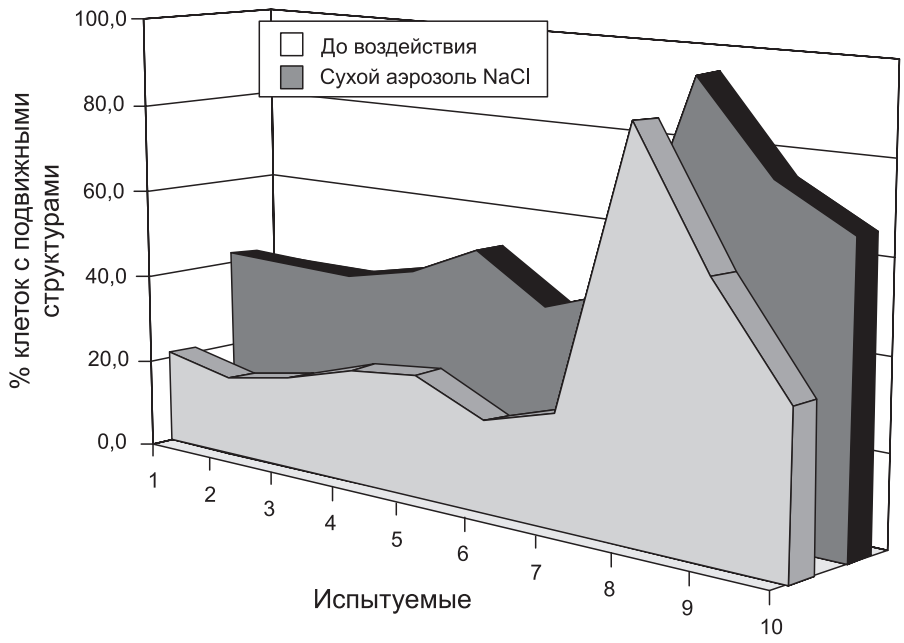



Рис. 1. Электрокинетическая подвижность клеток фарингеального эпителия при воздействии сухого высокодисперсного аэрозоля хлорида натрия

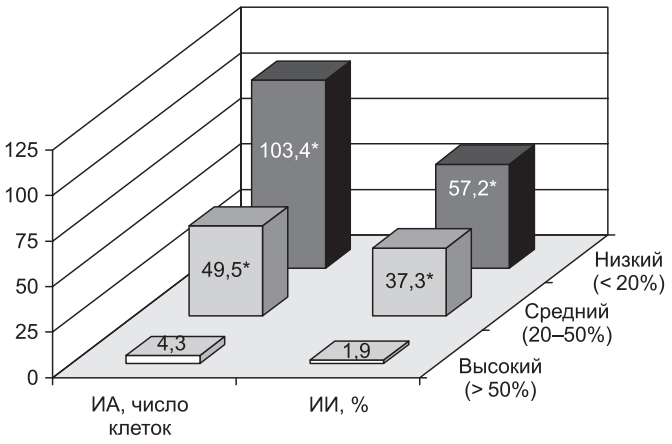



Рис. 2. Колонизационная активность *S. pneumoniae* к клеткам фарингеального эпителия с различным уровнем электрокинетической активности (ЭЛА)

Гидрофобность — фактор, который имеет важное значение для клетка-клеточного взаимодействия. Известно, что бескапсульные формы бактерий обладают высокой гидрофобностью; капсулирование придает бактериальной клетке гидрофильные свойства. Установлено, что чем выше степень гидрофобности, тем больше способность бактериальных клеток к прикреплению к клеткам-мишеням [12, 29]. При этом гидрофобные участки бактериальной поверхности обладают выраженным сродством к соответствующим структурам на клетке-мишени, что придает образовавшимся связям достаточную прочность [9]. Ключевая роль гидрофобности бактериальных клеток заключается еще и в том, что это свойство микроорганизма является значимым в самом начале каскада молекулярно-генетической взаимосвязи возбудителя с клеткой хозяина. Гидрофобные свойства поверхности клеток бактерий дают им возможность преодолеть электростатический барьер эпителия и обусловливают таким образом первый неспецифический этап их взаимодействия с эукариотическими клетками [7, 10, 11].

Изменение гидрофобности и связанных с ней адгезивных свойств сохранившихся в процессе действия сухого высокодисперсного аэрозоля хлорида натрия микроорганизмов в биологическом смысле можно рассматривать как адаптационный процесс при взаимодействии «паразит–хозяин». Именно поэтому весьма значимой являлась оценка влияния изучаемого лечебного аэрозольного фактора на состояние клеток эпителия слизистой респираторного тракта. В настоящее время большинством исследователей признается, что почти все бактерии не прикрепляются к интактным, функционально активным клеткам эпителия респираторного тракта [3, 13, 15, 25]. Электрофизиологическая активность клеток эпителия слизистой, наряду с гидрофобной активностью бактериальных клеток, имеет определяющее значение на начальных этапах неспецифического взаимодействия эпителиоцита с микробной клеткой. Бактериальная клетка и клетки эукариот имеют отрицательный заряд. Казалось бы, в основе их взаимодействия должны лежать силы отталкивания. Однако изучение анатомии бактериальных клеток показало, что на их поверхности имеются фимбриальные структуры, которые снижают отрицательный заряд клетки и способствуют уменьшению электростатических сил отталкивания [23]. Гидрофобные участки бактериальной поверхности обладают более выраженным сродством к соответствующим структурам эпителиоцита со сниженной ЭЛА, что способствует более прочному прикреплению возбудителя к эпителиоцитам [2]. Наличие заряда на поверхности частицы приводит к образованию двойного электрического слоя из зарядов частицы и зарядов противоионной атмосферы вокруг частицы [8]. По современным представлениям, на клеточной поверхности существует мозаика из зарядов катионных и анионных групп. Общий отрицательный заряд клеток есть результат суммирования 107–108 отрицательных зарядов, приходящихся на одну клетку, и 106–107 положительных зарядов [26, 30]. Предполагается, что изменение способности к миграции, фагоцитозу, устойчивости к адгезии, переходу из крови в ткани связаны с изменением заряда клеточной мембраны [24]. Причины возникновения заряда на границе раздела фаз «частица–среда» могут быть различными. Величина заряда частиц зависит от физико-химической структуры на поверхности: от собственного заряда, возникающего из-за диссоциации ионогенных групп под влиянием полярной дисперсной среды, от ионов, адсорбированных на поверхности частицы в случае разных коэффициентов адсорбции, а также от концентрации и валентности ионов, добавленных к дисперсионной среде [8].

В связи с этим представляла интерес оценка воздействия сухого высокодисперсного аэрозоля хлорида натрия, имеющего отрицательный заряд частиц, на электрофизиологическое состояние клеток слизистого эпителия. Полученные нами данные свидетельствуют о значительном повышении электрофизиологической активности эпителиальных клеток после экспозиции сухого высокодисперсного аэрозоля хлорида натрия, что может быть связано с физическими свойствами этого аэрозоля, его высоким ионным потенциалом и особенностями взаимодействия с клетками эпителия.

В настоящем исследовании нашел подтверждение факт существования взаимосвязи электрофизиологической активности клеток эпителия с адгезивными свойствами микроорганизмов. Ранее было показано, что электрофизиологическое состояние клеток буккального эпителия является фактором, отражающим уровень неспецифической резистентности организма, и влияет на длительность бактерионосительства токсигенных коринебактерий дифтерии [2]. По нашим данным, электрофизиологическая активность клеток фарингеального эпителия имела тесную взаимосвязь с показателями колонизационной резистентности к пневмококку и от-

ражала устойчивость эпителия к адгезии и колонизации пневмококка. Чем больше активных клеток, тем лучше эпителий защищается от микроорганизмов. Полученные данные подтверждают, что показатель ЭЛА является одним из маркеров колонизационной резистентности фарингеального эпителия к пневмококковой инфекции. Результаты исследования указывают на определенную роль электрофизиологического состояния клеток слизистого эпителия в обеспечении неспецифической резистентности макроорганизма.

### Заключение

Таким образом, можно заключить, что сухой высокодисперсный аэрозоль хлорида натрия оказывает влияние на клетки микро- и макроорганизма. Ингибирующий эффект на рост и жизнеспособность микробов сопровождается процессом потери ими патогенных свойств и адаптацией к изменившимся условиям, которая выражается, в связи с потерей жидкости, усилением гидрофобных свойств, способствующих прикреплению к клеткам эпителия. Однако активации процессов адгезии микробов не происходит вследствие усиления электрофизиологической функциональной активности эпителиальных клеток. Более того, колонизационная резистентность клеток эпителия усиливается под влиянием сухого высокодисперсного аэрозоля хлорида натрия, что свидетельствует о его благоприятном воздействии на защитные свойства клеток респираторного тракта и повышении неспецифической защиты организма.

Medical Service
Joint Stock Company
Закрытое Акционерное Общество
Медицинский Сервис

Комплексное оснащение лабораторий ЛПУ и научных центров мебелью, медицинским оборудованием, расходными материалами и технологиями

10 лет успешной работы
на службе современной лаборатории

ЗАО "Медицинский сервис" осуществляет поставки оборудования по различным разделам лабораторной диагностики.

Предлагает широкий выбор реагентов и расходных материалов для клинических, биохимических, иммунологических, микробиологических исследований.

Располагает собственной производственной базой по изготовлению медицинской, лабораторной, офисной и домашней мебели.

Мы располагаем собственными складами, укомплектованными расходными материалами и реагентами, условия хранения которых соответствуют всем санитарным нормам и требованиям.

За последние годы ЗАО "Медицинский сервис" признано лучшей фирмой на территории России и стран СНГ по продажам и внедрению систем вакуумного забора крови фирмы "GREINER bio-one" (Австрия).

Мы гарантируем качество, четкость поставок и корректность в деловых отношениях.

тел./факс: (812) 365-60-20, 322-56-52
e-mail: info@med-serv.ru
www.med-serv.ru

# ПОКАЗАТЕЛИ УГЛЕВОДНОГО И ЛИПИДНОГО МЕТАБОЛИЗМА В СОПОСТАВЛЕНИИ С КОЛИЧЕСТВОМ И РАСПРЕДЕЛЕНИЕМ ЖИРОВОЙ ТКАНИ У ЖЕНЩИН С АБДОМИНАЛЬНЫМ ОЖИРЕНИЕМ

**Т. Л. КАРОНОВА*, О. Д. БЕЛЯЕВА*, Е. И. КРАСИЛЬНИКОВА*, М. В. БУДАНОВА**, Н. С. КАТЫШЕВА*, Е. А. БАЖЕНОВА*, А. В. БЕРЕЗИНА**, Е. И. БАРАНОВА*, Е. Н. ГРИНЕВА***

*** ГОУ ВПО СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова Росздрава**

**** ФГУ «Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова» Росмедтехнологии, Санкт-Петербург**

***Резюме.*** *При обследовании 60 женщин в возрасте от 40 до 51 года (средний возраст 44,9 ± 1,0 года) выявлена высокая частота избыточного веса или ожирения (83,3%) с преобладанием абдоминального типа распределения жировой ткани. Установлено, что только треть из обследованных имели нормальные показатели липидного спектра и глюкозы крови, у остальных выявлены предиабет или сахарный диабет тип 2, а также гиперлипидемия. При сопоставлении показателей композиции тела, оцененных методом двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии (% общего жира, количество жира в абдоминальной зоне), выявлены достоверные корреляционные связи между количеством и типом распределения жировой ткани и показателями уровня глюкозы, атерогенных фракций липидов сыворотки крови, а также индексом инсулинорезистентности. Показано, что использование двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии хотя и позволяет более точно оценить количество жира и его распределение в организме, но существенного преимущества перед стандартным определением показателя окружности талии не имеет.*

***Ключевые слова:*** *абдоминальное ожирение, чувствительность тканей к инсулину, двухэнергетическая рентгеновская абсорбциометрия, композиция тела.*

# CARBOHYDRATE AND LIPID METABOLISM AND QUANTITY AND DISTRIBUTION OF FAT TISSUE IN FEMALES WITH ABDOMINAL OBESITY

**T. L. KARONOVA*, O. D. BELYAEVA*, E. I. KRASILNIKOVA*, M. V. BUDANOVA**, N. S. KATISHEVA*, E. A. BAJENOVA*, A. V. BERESINA**, E. I. BARANOVA*, E. N. GRINEVA***

*** S.-Petersburg State I. Pavlov Medical University, Federal Agency for Health Care and Social Development**

**** Federal State Institution "Federal V. A. Almazov Center of Heart, Blood and Endocrinology", Rosmedtechnologies, Saint-Petersburg**

***Summary.*** *A total of 60 women 40–51 years old (mean age 44,9 ± 1,0) were examined. Overweight or obesity were observed in 83,3% of patients with mainly abdominal fat distribution. Only one third of subjects had normal glucose and lipid levels, the others had either impaired glucose tolerance or diabetes type 2 and hyperlipidemia. Results of body composition dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) showed a clear correlation between the quality and type of fat distribution, and the plasma glucose and serum lipid levels, as well as HOMA-IR. Although percent android fat by DXA is a useful measure of abdominal type of fat distribution, it seems to have no advantage over the traditional measurement of waist circumference.*

***Key words:*** *abdominal obesity, insulin tissue sensitivity, dual-energy X-ray absorptiometry, body composition.*

**Введение**

Наиболее частым заболеванием, выявляемым при обследовании практически здоровых женщин, является ожирение, распространенность которого в последние годы достигла масштабов эпидемии [1]. Опасность ожирения состоит, прежде всего, в том, что оно способствует развитию практически всех заболеваний сердечно-сосудистой системы, сахарного диабета тип 2, а также ряда опухолевых заболеваний [2, 3]. При этом установлено, что при оценке риска развития всех вышеперечисленных заболеваний основное значение имеет тип ожирения, а не его степень.

В повседневной клинической практике для диагностики типа ожирения наиболее часто используется такой антропометрический показатель как окружность талии. Необходимо отметить тот факт, что несмотря на простоту и удобство, данный показатель не позволяет оценить количество жировой ткани.

Золотым стандартом количественной оценки подкожного и интраабдоминального жира является магнит-

но-резонансная томография (МРТ) или компьютерная томография (КТ) [4]. Однако высокая стоимость этих методов исследования ограничивает их широкое применение в повседневной клинической практике.

Исследования последних лет показали, что для количественной оценки жировой ткани может быть использована двухэнергетическая рентгеновская абсорбциометрия (денситометрия), которая в большинстве случаев используется для диагностики остеопороза, но в последние годы нашла свое применение и в других областях. Данный метод позволяет не только достоверно определить количество жировой ткани, но и оценить характер ее распределения (висцеро-абдоминальный или глютеофеморальный).

В связи с этим целью настоящего исследования явилось: изучить показатели липидного спектра, уровень инсулина сыворотки и глюкозы плазмы крови, а также индекс инсулинорезистентности у женщин, страдающих абдоминальным ожирением, и сопоставить полученные данные с антропометрическими показателями, а также количеством и распределением жировой ткани, измеренными с помощью двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии.

**Материалы и методы**

В исследование было включено 60 женщин в возрасте от 40 до 51 года (средний возраст 44,9 ± 1,0 лет), не имеющих серьезной патологии со стороны внутренних органов, а также указаний на наличие сахарного диабета.

Всем обследованным произведена оценка таких антропометрических показателей, как рост, вес, окружность талии и бедер, а также рассчитаны соотношение окружности талии к окружности бедер (ОТ/ОБ) и индекс массы тела (ИМТ). Рост и вес пациентов определялся стандартными методами с использованием стадиометра и электронных весов. Индекс массы тела (ИМТ) рассчитывали по формуле A. Quetelet: масса тела/рост$^2$ (кг/м$^2$) [5]. При этом за нормальную массу тела принимали значения ИМТ от 18,5 до 25 кг/м$^2$, избыточная масса тела — от 25 до 30 кг/м$^2$, а ожирение — более 30 кг/м$^2$. Окружность талии измерялась между нижним краем реберной дуги и гребнем подвздошной кости параллельно полу.

Всем женщинам было проведено определение: глюкозы плазмы крови натощак, уровня инсулина и показателей липидного спектра сыворотки крови. Уровень глюкозы плазмы крови определяли стандартным биохимическим методом. Уровень инсулина сыворотки крови определяли иммуноферментным методом (наборы фирмы DRG, США). Показатели липидного спектра сыворотки крови определяли методом иммуноферментного анализа. Для оценки степени резистентности тканей к инсулину использовали малую модель гомеостаза (Homeostasis Model Assessment — HOMA) с определением показателя HOMA-IR [6]. Практически всем обследованным был выполнен стандартный глюкозотолерантный тест (ГТТ) с 75 г глюкозы [9].

Для количественной оценки жировой ткани и характера ее распределения всем пациентам была выполнена двухэнергетическая рентгеновская абсорбциометрия с использованием программы «сканирование всего тела». Распределение жировой, соединительной и мышечной тканей, а также количество костной ткани были рассчитаны автоматически (GE Lunar Prodigy DXA). По результатам исследования абдоминальной зоной локализации жировой ткани считалась область от гребней подвздошных костей вверх на 20% расстояния от гребня подвздошных костей до основания черепа, глютеофеморальной — область от большого вертела вниз на двойное расстояние величины абдоминальной зоны (рис. 1).

Количество жировой ткани рассчитывалось как *процент жировой ткани = количество жировой ткани/* (*жировая ткань + соединительная – мышечная ткань + костная ткань*) (рис. 2).

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью программы SPSS 12.0RU для Windows.

**Результаты исследования**

При обследовании 60 женщин, не имеющих клинически значимых заболеваний, средний возраст которых составил 44,9 ± 1,0 года (от 40 до 51 года), установлено,

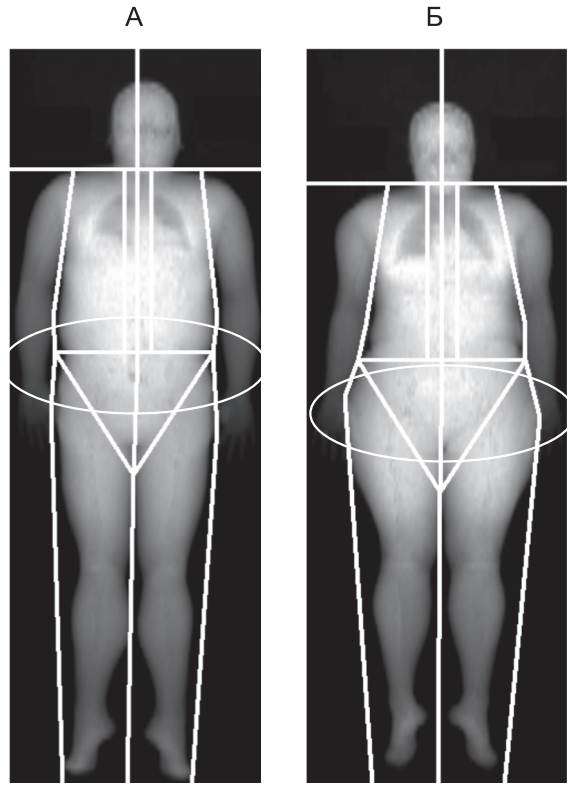
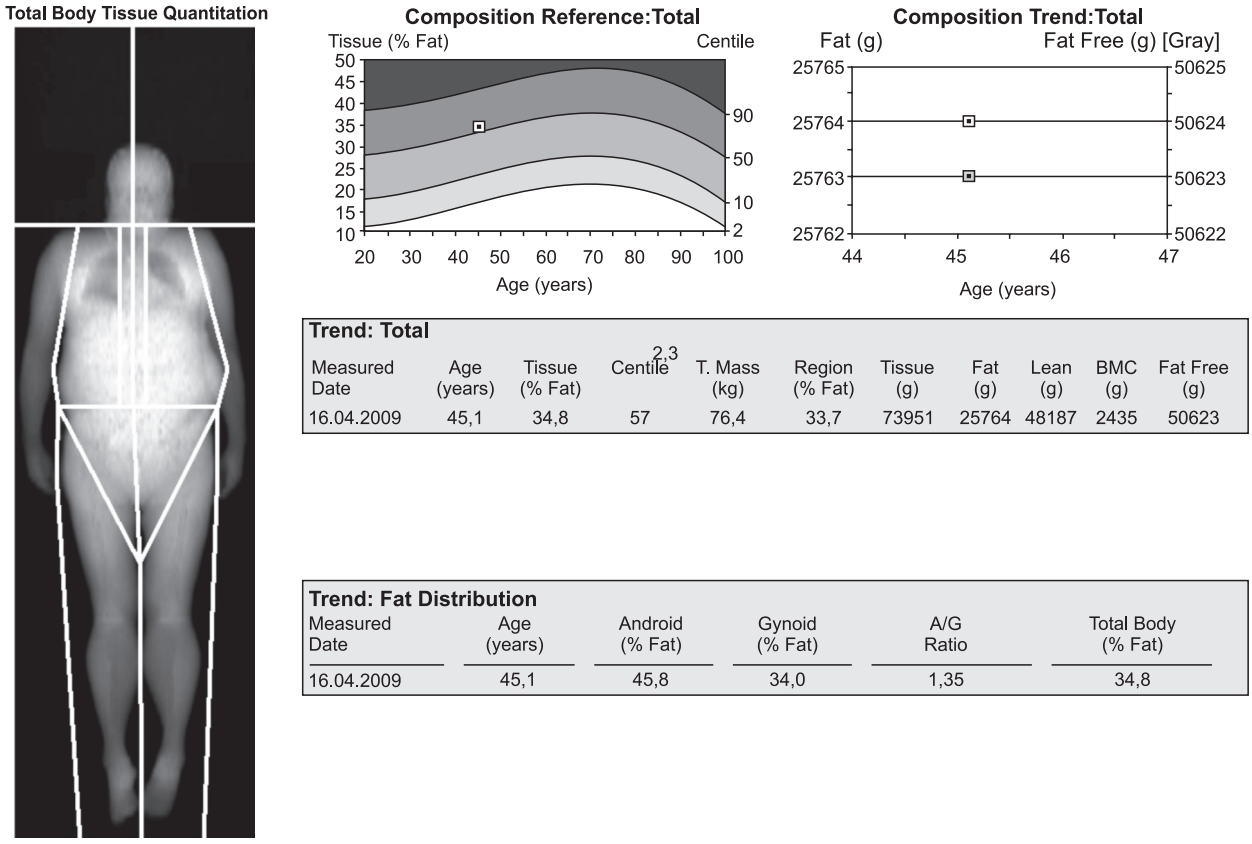



Рис. 1. Пример отчета композиции тела по результатам двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии: абдоминальное (А) и глютеофеморальное (Б) распределение жировой ткани у обследованных женщин




**Trend: Total**

| Measured Date | Age (years) | Tissue (% Fat) | Centile[2,3] | T. Mass (kg) | Region (% Fat) | Tissue (g) | Fat (g) | Lean (g) | BMC (g) | Fat Free (g) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 16.04.2009 | 45,1 | 34,8 | 57 | 76,4 | 33,7 | 73951 | 25764 | 48187 | 2435 | 50623 |

**Trend: Fat Distribution**

| Measured Date | Age (years) | Android (% Fat) | Gynoid (% Fat) | A/G Ratio | Total Body (% Fat) |
|---|---|---|---|---|---|
| 16.04.2009 | 45,1 | 45,8 | 34,0 | 1,35 | 34,8 |

Рис. 2. Пример отчета двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии «сканирование всего тела» (количество жировой, соединительно-мышечной, костной тканей, % общего жира, % распределения жира в абдоминальной и глютеофеморальной зонах и их соотношение) у обследованной женщины

что у 83,3% обследованных (47 человек) ИМТ превышал нормальные значения. У 43% (26 человек) женщин имелся избыточный вес, 27% (13 человек) — ожирение 1 ст., у 8,3% (5 человек) — 2 ст. и у 5% (3 человека) — 3 ст.

При измерении окружности талии и расчета показателя ОТ/ОБ выявлено, что у 92% (55 человек) обследованных имел место висцеро-абдоминальный тип ожирения (ОТ более 80 см) и соотношение ОТ/ОБ более 0,9. Если ориентироваться на критерии абдоминального ожирения по рекомендациям Американской ассоциации кардиологов [7], то у 76% (42 человека) женщин ОТ превышала 88 см.

Средний уровень гликемии натощак у обследованных женщин составил 6,48 ± 0,15 мМоль/л. При этом у четырех был впервые поставлен диагноз сахарного диабета тип 2. По результатам ГТТ нормальные показатели были выявлены у 30,9% (22 человека) женщин, а у 69,1% (38 человек) имели место различной степени выраженности нарушения толерантности к глюкозе. У 49,1% (27 человек) имелось нарушение толерантности к глюкозе, а у 20% (11 человек) — сахарный диабет тип 2.

При оценке показателей липидного спектра крови установлено, что только у 30% (18 человек) имелись нормальные показатели липидов сыворотки крови, у 36,7% (22 человека) был значительно повышен уровень холестерина (ХС) и ХС-липопротеинов низкой плотности (ХС ЛПНП), у 25% (15 человек) имелась гипертриглицеридемия, у 25% (15 человек) был снижен уровень ХС-липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП).

При сопоставлении двух групп обследованных — с нарушениями углеводного обмена и без такового — было установлено, что лица с НТГ или сахарным диабетом имели достоверно более высокие показатели ИМТ, уровня инсулина сыворотки крови, а также более выраженные нарушения чувствительности тканей к инсулину, в то время как показатели липидного спектра крови в сопоставляемых группах существенно не различались (табл. 1).

При сопоставлении показателей ОТ у женщин с нормальным уровнем глюкозы и с нарушениями углеводного обмена достоверных различий выявлено не было. Однако при сопоставлении ОТ у лиц с нормогликемией и у больных с впервые выявленным сахарным диабетом установлены существенные различия: 94,5 ± 2,4 см и 103,9 ± 3,1 см соответственно. Полученные результаты подтверждают роль висцеро-абдоминального ожирения в развитии инсулинорезистентности и СД тип 2.

*Таблица 1*

**Антропометрические данные и показатели липидного и углеводного метаболизма у обследованных женщин**

| Изученный показатель | Группы обследованных | | |
|---|---|---|---|
| | Нормогликемия N = 22 | Предиабет и СД тип 2 N = 38 | p |
| ИМТ, кг/м$^2$ | 28,6 ± 1,0 | 31,6 ± 0,9 | 0,001 |
| ОТ, см | 94,5 ± 2,4 | 99,5 ± 1,9 | 0,1 |
| Уровень базального инсулина сыворотки крови, мкМЕ/мл | 7,6 ± 0,9 | 15,8 ± 1,8 | 0,0001 |
| HOMA-IR | 1,72 ± 0,23 | 4,87 ± 0,57 | 0,0001 |
| ОХ, мМоль/л | 5,6 ± 0,43 | 5,3 ± 0,17 | 0,8 |
| ХС ЛПНП, мМоль/л | 3,7 ± 0,38 | 3,4 ± 0,14 | 0,9 |
| ХС ЛПВП, мМоль/л | 1,4 ± 0,09 | 1,3 ± 0,07 | 0,2 |
| ТГ, мМоль/л | 1,3 ± 0,17 | 1,6 ± 0,13 | 0,18 |

*Таблица 2*

**Показатели двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии у обследованных женщин**

| № | % жира в абдоминал. зоне | % жира в глютеофемо-рал. зоне | А/Г | % общего жира | % абдоминального жира | жировая ткань (г) | соед. мыш. ткань (г) | костная ткань (г) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 55 | 49,3 ± 0,77 | 46,7 ± 0,75 | 1,07±0,02 | 42,9 ± 1,14 | 45,2 ± 0,73 | 33497 ± 2473 | 46356 ± 887 | 2786 ± 50 |

Корреляционный анализ выявил наличие положительной связи уровня триглицеридов с ИМТ, ОТ (r = 0,52, p = 0,0004 и r= 0,446, p = 0,001 соответственно), а также с HOMA-IR и уровнем инсулина (r = 0,36, p = 0,01 и r = 0,49, p = 0,0004 соответственно).

Выявлена корреляционная зависимость между показателями гликемии натощак и уровнем базального инсулина (r = 0,36, p = 0,003), а также уровнем гликемии и ОТ (r = 0,26, p = 0,03).

Данные двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии, выполненной для оценки количества и характера распределения жировой ткани, в виде % общего жира, % жира, расположенного в абдоминальной и глютеофеморальной зонах, а также соотношения между ними (А/Г), % абдоминального жира и количество жировой, соединительной-мышечной и костной тканей, определенных в граммах, представлены в таблице 2.

Как видно из представленных данных, среднее количество жировой ткани у обследованных составило 42,9 ± 1,14% от общего веса, что значимо превышает нормальные показатели (до 30%) и подтверждает наличие у них ожирения. Процент распределения жировой ткани в абдоминальной и глютеофеморальной зонах был похожим, но достоверно преобладал абдоминальный тип распределения (p = 0,05), что подтверждает показатель соотношения жировой ткани, расположенной в абдоминальной зоне, к количеству жировой ткани, расположенной в глютеофеморальной зоне (А/Г). Этот показатель в среднем составил 1,07 ± 0,02. Достоверных различий между величиной количества жировой ткани, а также типом ее распределения в группах лиц с нарушениями углеводного обмена и без него получено не было. Однако имелась корреляционная зависимость показателя соотношения А/Г и уровнем глюкозы крови натощак (r = 0,3, p = 0,05).

При сопоставления данных денситометрии с антропометрическими показателями было установлено, что % жира в абдоминальной зоне и соотношение А/Г напрямую коррелировали с окружностью талии (r = 0,5, p = 0,0005 и r = 0,4, p = 0,002 соответственно), а процент общего жира напрямую зависел от ИМТ (r = 0,6, p = 0,0002).

При сопоставлении количества и распределения жировой ткани, оцененных методом денситометрии, и

биохимических показателей были выявлены прямые зависимости между соотношением А/Г и показателям уровня инсулина и ТГ крови (r = 0,3, p = 0,05 и r = 0,34, p = 0,01 соответственно). Помимо этого, уровень триглицеридов находился в положительной корреляционной связи с общим количеством жировой ткани, выраженным в граммах (r = 0,38, p = 0,04), и с % жировой ткани, расположенной в абдоминальной зоне (r = 0,28, p = 0,04).

**Обсуждение результатов**

Результаты, полученные в ходе проведенного исследования, подтверждают высокую частоту встречаемости ожирения среди женщин, считающих себя практически здоровыми. Так, избыточный вес или ожирение были выявлены у 83,3% человек, и в подавляющем числе случаев (92%) установлен абдоминальный тип распределения жира. Хорошо известен тот факт, что патологическим и неблагоприятным является висцеро-абдоминальный тип распределения жировой ткани. Опасность данного ожирения заключается в развитии инсулинорезистентности и гиперинсулинемии, которые приводят к атерогенным дислипидемиям, артериальной гипертензии, нарушениям углеводного гомеостаза и способствуют ускоренному развитию атеросклероза [8, 9, 10].

Для оценки степени выраженности ожирения использовался стандартный показатель — индекс массы тела. Однако степень ожирения, оцененная этим методом, не отражает тип распределения жировой ткани. Наиболее простым и надежным способом оценки типа распределения жира является определение показателя окружности талии. Несмотря на его простоту и широкое использование в клинической практике, до настоящего времени нет единой точки зрения, какой показатель ОТ считать патологическим, характерным для висцеро-абдоминального ожирения: 80 или 88 см [5, 11]. Полученные в ходе исследования данные свидетельствуют, что чем меньше показатель окружности талии, тем более вероятен диагноз абдоминального ожирения и связанных с ним нарушений углеводного и липидного метаболизма. Такие же результаты получены и другими исследователями [12, 13]. Так, если за висцеро-абдоминальное ожирение принимать значения ОТ 80 см и более, то количество больных с данным диагнозом значительно увеличивается: с 76 до 92%, по сравнению с показателем ОТ от 88 и более сантиметров.

Однако необходимо учитывать, что оценка ОТ отражает распределение жира, но не позволяет точно судить о его количестве и локализации в отдельных частях организма. Для этой цели в последние годы используются различные рентгеновские методы, такие как МРТ, компьютерная томография, а также двухэнергетическая рентгеновская абсорбциометрия — денситометрия. Наиболее дешевым и достаточно простым из перечисленных методов является денситометрия [14]. Этот метод является «золотым стандартом» для оценки минеральной плотности кости, хотя его возможности гораздо шире. При использовании программы «сканирование всего тела» можно не только до грамма рассчитать количество жировой, соединительно-мышечной и костной тканей, но и оценить характер распределения жировой ткани в абдоминальной и глютеофеморальной зонах, а также определить количество жира в различных областях тела [15]. Недостатком данного метода является лишь невозможность разделения жировой ткани на висцеральную и подкожную, как позволяют сделать методы КТ или МРТ [16]. В то же время невысокая стоимость и точность результатов денситометрии делают ее привлекательным методом в обследовании больных, имеющих избыточный вес.

Результаты проведенного исследования убедительно доказывают наличие висцеро-абдоминального типа распределения жировой ткани у обследованной группы женщин по данным денситометрии, которые коррелируют с показателями ОТ (r = 0,5, p = 0,0005). Помимо этого, показатели денситометрии, отражающие количество непосредственно абдоминального жира в виде % абдоминального жира, количества жировой ткани, расположенной в абдоминальной зоне, и соотношение абдоминального и глютеофеморального жира четко коррелируют с такими биохимическими показателями как уровень глюкозы плазмы натощак (r = 0,3, p = 0,05), инсулина и триглицеридов сыворотки крови (r = 0,3, p = 0,05 и r = 0,34, p = 0,01). Если сравнивать выраженность корреляционных связей между вышеуказанными биохимическими параметрами с данными денситометрии и показателем ОТ, то существенных преимуществ того или другого метода обнаружено не было.

Таким образом, проведенное исследование показало, что, несмотря на кажущиеся преимущества использования денситометрии в оценке распределения жировой ткани перед простым измерением окружности талии в комплексном обследовании женщин с абдоминальным ожирением, нет оснований рекомендовать его как обязательный метод диагностики. В то же время для определения количества жировой ткани в организме данный рентгеновский метод представляется более простым, дешевым и доступным по сравнению с другими рентгеновскими методиками, что делает его привлекательным для проведения углубленного обследования больных с ожирением.

**Литература**

1. Manson J. E., Skerrett P. J., Greenland P. et al. The escalating pandemic of obesity and sedentary lifestyle. A call to action for clinicians // Arch. Intern. Med., 2004. — Vol. 164 — N 3. — P. 249–258.

2. Poirier P., Eckel R. H. The heart and obesity // Hurst's The Heart / Eds. V. Fuster, R. W. Alexander, S. King, et al. New York: McGraw-Hill Companies; 2000. — P. 2289–2303.

3. Yusuf S., Hawken S., Ounpuu S. et al. INTERHEART Study Investigators. Effect of potentially modifiable risk factors associated

with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): Case-control study // Lancet., 2004. — Vol. 364. — P. 937–952.

4. Shen W., Wang Z., Punyanyita M. et al. Adipose tissue quantification by imaging methods: a proposed classification // Obes. Res., 2003. — Vol. 11. — P. 5–16.

5. Благосклонная Я. В., Шляхто Е. В., Бабенко А. Ю. Эндокринология: Учебник для медицинских вузов. — Спб.: СпецЛит., 2004. — 398 с.: ил.

6. Matthews D. R., Hosker J. P., Rudenski A. S. et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fastion plasma glucose and insulin concentrations in man // Diabetologia., 1985. — Vol. 28. — N 7. — P. 412–419.

7. Grundy S. M., Cleeman J. I., Daniels S. R. et al. Diagnosis and Management of the Metabolic syndrome: An American Heart Association / National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. Circulation, 2005; 112; 2735–2752.

8. Гинзбург М. М., Козупица Г. С. Значение распределения жира при ожирении // Consilium Medicum., 1996. — № 5. — С. 30–33.

9. DeFronzo R. A., Ferrannini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDOM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease // Diabetes Care., 1991. — Vol. 14. — N 3. — P. 173–194.

10. Albu J. B., Curi M., Shur M. et al. Systemic resistance to the antilipolytic effect of insulin in black and white women with visceral obesity // Am. J. Physiol., 1999. — Vol. 277. — N 3. — Pt. 1. — P. 551–560.

11. International Diabetes Federation. Worldwide definition of the metabolic syndrome. Available at: http://www.idf.org/webdata/ocs/IDF_Metasyndrome_difinition.pdf.Accessed August 24, 2005.

12. Ferland M., Despré́s J. P., Nadeau A. et al. Contribution of glucose tolerance and plasma insulin levels to the relationships between body fat distribution and plasma lipoprotein levels in women // Int. J. Obes., 1991. — Vol. 15. — P. 677–688.

13. Haffner S. M., Fong D., Hazuda H. P. et al. Hyperinsulinemia, upper body adiposity, and cardiovascular risk factors in non-diabetics // Metabolism, 1988. — Vol. 37. — P. 338–345.

14. Hans D., Genton L., Conicella G. et al. Half-body DXA scan predicts whole body composition: a potential method to measure overweight patients // Clin Nutr., 2001. — Vol. 20 (Suppl. 3): 1.

15. Tataranni P. A., Ravussin E. Use of dual-energy X-ray absorbtiometry in obese individuals // Am. J. Clin. Nutr., 1995. — Vol. 62. — P. 730–734.

16. O'Connor M. K., Enright D. Performance of the Lunar iDXA Imaging Densitometer in normal and obese subjects // Calcif. Tissue Int., 2006. — Vol. 78. (Suppl. 1). — P. S150.

## ТЕМАТИЧЕСКИЙ ПЛАН

### семинаров по клинической лабораторной диагностике для практических врачей

Продолжение на странице 88.

1. ***Интерпретация современных лабораторных исследований в дифференциальной диагностике анемий.***
   24 сентября в 15 часов.
   Организаторы: Клинико-диагностический центр № 1, ул. Сикейроса, д. 1. Малый конференц-зал.

2. ***Лабораторный контроль дезагрегантной и антикоагулянтной терапии***.
   26 ноября в 15 часов.
   Организаторы: СПбГМА им. И. Мечникова, Пискаревский пр., 47.

3. ***Информативность иммунологических методов диагностики в терапевтической практике.***
   Февраль 2010 г. в 15 часов.
   Организаторы: ФГУЗ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А. М. Никифорова МЧС России», ул. Академика Лебедева, 4/2.

4. ***Лабораторное обеспечение диагностики и терапии аутоиммунных заболеваний, алгоритмы лабораторной диагностики системных поражений соединительной ткани.***
   Март 2010 г. в 15 часов.
   Организаторы: СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, ул. Льва Толстого, 6/8, 11-й корпус, конференц-зал кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины.

5. ***Алгоритмы лабораторной диагностики аллергических заболеваний.***
   Май 2010 г. в 15 часов.
   Организаторы: СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, ул. Льва Толстого, 6/8, 11-й корпус, конференц-зал кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины.

# ОСОБЕННОСТИ НАРУШЕНИЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ВРОЖДЕННЫХ ПОРАЖЕНИЯХ ОПОРНО-ДВИГАТЕЛЬНОГО АППАРАТА И ПОРОКАХ РАЗВИТИЯ СПИННОГО МОЗГА

**Ю. В. ГАЙДУК*, И. Е. ШАРИНА****

*** Санкт-Петербургская государственная педиатрическая медицинская академия**

**** ФГУ Главное бюро медико-социальной экспертизы по СПб**

***Резюме.*** *Проведено комплексное обследование 156 больных в возрасте от 6 месяцев до 16 лет с поражением опорно-двигательного аппарата с врожденными аномалиями позвоночника и спинного мозга — диастематомиелией. Отмечена необходимость раннего начала комплексной коррекции (хирургической и медикаментозной) пороков развития позвоночника, сочетанных с поражением спинного мозга для снижения риска развития неврологического дефицита, улучшения качества жизни пациентов. Показана необходимость подбора курсовой медикаментозной терапии детям после проведенной хирургической коррекции у данного контингента больных.*

***Ключевые слова:*** *дети, поражение опорно-двигательного аппарата, врожденные аномалии позвоночника и спинного мозга, диастематомиелия, хирургическая и медикаментозная коррекция.*

# PECULIARITY OF NEURAL SYSTEM IMPAIRMENT IN CONGENITAL AFFECTIONS OF MUSCULOSKELETAL SYSTEM AND ABNORMALITIES OF SPINE MEDULLA DEVELOPMENT

**JU. V. GAIDUK*, I. E. SHARINA****

*** State Educational Institution of Higher Professional Education "Saint-Petersburg State Pediatric Medical Academy, Federal Agency for Health Care and Social Development"**

**** Federal State Institution "Chief office of medical and social expertise in Saint-Petersburg"**

***Summary.*** *Complex examination of 156 patients aged from 6 months to 16 years with musculoskeletal system affection with congenital spine and spine medulla abnormalities — diastematomyelia. Necessity of early complex correction (surgical and medical) of spine impairments associated with spine medulla abnormalities in order to reduce the risk of neurological deficiency development and improving life quality of patients. The necessity of medical therapy courses was shown in patients who underwent the surgical correction.*

***Key words:*** *children, musculoskeletal abnormalities, congenital abnormalities of spine and spine medulla, diastematomyelia, surgical and medical correction.*

Аномалии развития осевого скелета занимают одно из ведущих мест среди различных видов патологий и последствий родовой травмы. У детей с аномалиями развития позвоночника на одном из первых мест стоят сопутствующие им пороки развития спинного мозга.

Теоретически у всех больных с пороками развития позвоночника следует ожидать проявлений миелодисплазии, так как закладка нервной трубки и позвоночника — это два параллельных и взаимосвязанных процесса эмбриогенеза с одинаковыми тератогенными терминационными периодами [1, 2].

Нередко у детей с аномалиями позвоночника сопутствующие тяжелые пороки развития спинного мозга длительное время не сопровождаются признаками неврологической недостаточности [3, 4]. В других случаях при сочетании пороков развития позвоночника с миелодисплазией отмечаются тяжелые расстройства функции спинного мозга (появление патологических рефлексов, парезов нижних конечностей, расстройства функции тазовых органов), которые могут появляться в разные возрастные периоды и усугубляться по мере роста ребенка [5]. Генез неврологических нарушений в большинстве случаев связан с дефектом формирования спинного мозга и корешков.

Неврологические расстройства при врожденной патологии позвоночника могут быть первичными (как проявление порока развития ЦНС и, в частности, спинного мозга) и вторичными (как осложнения деформации позвоночника или её лечения). Долю неврологических расстройств, появившихся в интранатальном и постнатальном периодах, не всегда можно определить даже при вполне очевидной патологии [6, 7].

Раннее распознавание некоторых видов патологии осевого скелета, сопровождающихся пороком развития спинного мозга, и своевременное начало лечения нередко приводят к полному излечению больного.

Одним из врожденных пороков позвоночника и спинного мозга, входящих в группу заболеваний, получивших обобщенное название «синдром фиксированного спинного мозга», является диастематомиелия. Заболевание характеризуется сагиттальным делением спинного мозга и его дериватов на два рукава, не всегда одинаковых по диаметру. Клинические проявления диастематомиелии сочетают в себе признаки первичной

*Таблица 1*

| Сопутствующая патология | Врожденные пороки развития позвоночника и спинного мозга | |
|---|---|---|
| | м | д |
| Боли в области спины | 1 (1,5%) | 2 (3%) |
| Боли в ногах | 4 (6%) | 5 (7,5%) |
| Головные боли | — | — |
| Повышенная утомляемость | 9 (13,4%) | 7 (10,5%) |
| Боли в области грудной клетки (торакалгии, кардиалгии) | — | 1 (1,5%) |
| Боли, функциональные нарушения желудочно-кишечного тракта | — | — |
| Нарушения аппетита | — | 1 (1,5%) |
| Нарушение мочеиспускания | 1 (1,5%) | 1 (1,5%) |
| Лабильность психоэмоциональной сферы | — | — |
| Нарушение навыков ходьбы | 12 (17,7%) | 16 (23,7%) |
| Склонность к развитию депрессивных состояний | — | — |
| Снижение иммунитета (частые ОРВИ, осложненное течение заболевания) | — | — |
| Без соматической патологии | 8 (12%) | |
| ВСЕГО | 67 | |

миелодисплазии и симптомокомплекс, развивающийся по мере роста ребенка, в процессе нарушения естественной проксимальной миграции спинного мозга при его фиксации перегородкой. Выявление этих пациентов происходит по разным направлениям многопрофильного медицинского стационара. Нередко эти больные дебютируют явлениями неврологического дефицита со стороны нижних конечностей, нейрогенной дисфункцией мочевого пузыря, деформацией нижних конечностей, кожными стигмами и патологией осевого скелета.

В клинике вертебрологии на базе Санкт-Петербургской Государственной педиатрической медицинской академии проведено комплексное обследование 156 больных в возрасте от 6 месяцев до 16 лет с поражением опорно-двигательного аппарата. Из них 67 пациентов — с врожденными аномалиями позвоночника и спинного мозга — диастематомиелией.

Возраст пациентов при первичном обращении за помощью чаще составлял от первых дней жизни до 3–5 лет.

Раннее обращение родителей за консультацией по поводу порока развития позвоночника связано с диагностикой данной патологии методом ультразвукового исследования плода на поздних сроках беременности. Около 5% родителей, обратившихся за консультацией в первые дни жизни ребенка, заметили деформацию позвоночника самостоятельно. У 29,8% детей патология со стороны опорно-двигательного аппарата выявлена в поликлинике по месту жительства, на профилактических осмотрах.

Родители детей в возрасте от 1,5 до 3 лет при первичном обращении предъявляли жалобы на нарушения навыков ходьбы, неловкость походки, хромоту, реже — различные деформации стоп (вальгусная, полая стопа и т. д.) — 62,2%. В 3% случаев данная патология позвоночника являлась случайной находкой, обнаруженной при обследовании других органов (почек, легких).

Выявленная сопутствующая патология у детей с врожденными пороками развития позвоночника и спинного мозга представлена в таблице 1.

Таким образом, в наибольшем числе случаев выявлено нарушение походки различной степени выраженности — 28 пациентов (54,5%), повышенная утомляемость при ходьбе — 16 человек (23,9%), боли в ногах — 9 (13,5%).

Распределение патологических неврологических изменений, выявленных при первичном обращении (степень выраженности неврологического дефицита), представлено в таблице 2.

*Таблица 2*

| Патологические изменения (неврологический дефицит) | Человек | % |
|---|---|---|
| Нижний вялый парез (монопарез) | 18 | 26,6 |
| Нижний спастический парез (монопарез, парапарез) | 16 | 23,2 |
| Диффузная мышечная гипотония | 2 | 3,3 |
| Снижение чувствительности | 10 | 15 |
| Сочетание неврологического дефицита + ортопедическая патология | 11 | 16,6 |
| Болевой синдром | 8 | 11,5 |
| Без патологических изменений | 2 | 3,3 |
| Всего человек | 67 | 100 |

Из приведенной выше таблицы следует, что при первичном обращении пациентов с пороком формирования позвоночного канала — диастематомиелией, отмечалась различная степень выраженности неврологического дефицита в виде нижних спастических параличей (16 пациентов, 23,2%) и вялых монопарезов (18 пациентов, 26,6%) различной степени тяжести (от рефлекторных парезов до значительной степени снижения силы в нижних конечностях).

Отсутствие патологических изменений в неврологическом и ортопедическом статусе зарегистрировано в 3,3% случаев. Два пациента, не имеющие патологических изменений при осмотре, вошли в группу «случайных находок» — дети проходили обследование по поводу жалоб на боли в спине, другой патологии не отмечено.

Период времени, прошедший с момента первичного обращения до решения вопроса о проведении хирургического лечения, у пациентов в данной подгруппе варьировал от нескольких месяцев до 3–5 лет. Данные по распределению пациентов по этому показателю представлены в таблице 3.

*Таблица 3*

**Распределение по срокам, прошедшим с момента выявления патологии позвоночника до проведения оперативного лечения**

| Менее 1 года | От 1 года до 2 лет | Более 2 лет | Всего человек |
|---|---|---|---|
| 15 чел. | 16 чел. | 36 чел. | 67 |
| 22,4% | 24,3% | 53,3% | 100% |

В таблице представлены данные временно́го показателя, прошедшего с момента постановки диагноза до проведения коррекционного хирургического вмешательства: из 67 человек 15 прооперированы в течение первого года наблюдения (22,4%); 16 детей (24,3%) прооперированы в сроки от 1 года до 2 лет с момента диагностики порока развития позвоночника. Самую значительную группу — 36 человек (53,3%) — представили пациенты, чье обращение за дальнейшей медицинской помощью, т. е. хирургическим лечением, после проведения диагностики и постановки диагноза произошло в сроки более 2 лет. Родители данных пациентов предпочитали получать консервативную терапию (массаж, ЛФК) в поликлинической сети по месту жительства и повторное обращение за помощью в стационар было связано с ухудшением самочувствия в виде нарастания слабости в ногах, ухудшения походки, повышения утомляемости при ходьбе, болевого синдрома. В результате хирургической коррекции у 32 детей отмечено улучшение неврологического статуса в виде увеличения объема пассивных и активных движений в ногах, улучшения походки, увеличения мышечной силы, отсутствия болевого синдрома в покое и при ходьбе, уменьшения трофических нарушений в области нижних конечностей вследствие улучшения гемодинамики.

Катамнез собран у 67 пациентов в срок от 1 года до 5 лет. Это позволило оценить отдаленные результаты проводимой неврологической терапии. Данные показатели отражены в таблицах 4 и 5.

*Таблица 4*

**Распределение больных по структуре проводимой терапии в дооперационном периоде**

| Дооперационный период | | | |
|---|---|---|---|
| Неврологическая терапия | ЛФК, ФТЛ, массаж | Комплексная терапия | Без терапии |
| 10 | 33 | 21 | 3 |
| 14,9% | 49,2% | 31,3% | 4,6% |

Данные таблицы свидетельствуют о том, что большее число наблюдавшихся пациентов — 49,2% (33 человека) — получало терапию в виде лечебной физкультуры, физиотерапии и курсового массажа, тогда как комплексную терапию получал только 21 человек (31,3%). 10 человек получили медикаментозную коррекцию, без использования комплексов физических специализированных упражнений, курсового массажа и физиотерапевтических методик, направленных на улучшение периферической микроциркуляции, нейростимуляции.

Из 67 пациентов с ДМ (ВПРП) 15 пациентов, не подвергшихся хирургическому лечению, продолжали наблюдаться в клинике вертебрологами, неврологами, ортопедами.

52 человека в послеоперационном периоде продолжили получать комплексную терапию.

*Таблица 5*

**Распределение больных по структуре проводимой терапии в послеоперационном периоде**

| Послеоперационный период | | | |
|---|---|---|---|
| Неврологическая терапия | ЛФК, ФТЛ, массаж | Комплексная терапия | Без терапии |
| 11 | 8 | 33 | 0 |
| 21,1% | 15,4% | 63,5% | — |

Из приведенных таблиц следует, что на дооперационном этапе комплексную терапию (включая неврологическую медикаментозную коррекцию) получало недостаточное число наблюдавшихся пациентов (21 человек, 31,3%). Комплекс терапевтических мероприятий в дооперационном периоде, помимо ЛФК, ФТЛ и массажа, включал прием сосудистых, ноотропных, нейротрофических и витаминных препаратов.

В послеоперационном периоде число пациентов, получающих базовую курсовую терапию, составило

63,3%, однако процент положительной динамики течения послеоперационного периода, несмотря на проводимую терапию, оставался низким.

Таким образом, учитывая сравнительные показатели, приведенные в таблицах, очевидно, что необходимой подготовкой к оперативному вмешательству является проведение курсов комплексной терапии, включающих применение ноотропных, сосудистых, антигипоксантных, нейротрофических, витаминных препаратов, в сочетании с лечебной физкультурой и курсами массажа. Вопросы о дальнейшем ведении больных с врожденной патологией опорно-двигательного аппарата и спинного мозга должны решаться коллегиально неврологами и ортопедами.

Степень выраженности неврологического дефицита после проведенного оперативного лечения представлена в таблице 6.

*Таблица 6*

**Динамика степени выраженности неврологического дефицита после проведенного хирургического лечения**

| Положительная динамика | Без динамики | Отрицательная динамика | Всего человек |
|---|---|---|---|
| 8 чел. | 36 чел. | 8 чел. | 52 |
| 16,6% | 66,7% | 16,6% | 100% |

По данным таблицы отмечается обратная тенденция: основную группу составили дети, состояние которых после проведения хирургической коррекции не имело выраженных динамических изменений (36 человек, 66,7%), у 8 человек — положительная динамика в виде увеличения мышечной силы в «пораженных» конечностях, увеличения объема мышечной массы и, соответственно, улучшения (увеличения) мышечного тонуса. 8 человек, несмотря на проводимую терапию (массаж, ЛФК, ФТЛ, сосудистые, ноотропные препараты, курсовая витаминотерапия), в период отсроченного наблюдения имели отрицательную динамику течения заболевания, что составило 16,6%. Эти пациенты вошли в группу позднего обращения (более 3–5 лет с момента установки диагноза) за проведением хирургического лечения и не получали комплексной (в т. ч. неврологической) терапии.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Ранние сроки начала комплексной коррекции (хирургической и медикаментозной) пороков развития позвоночника, сочетанных с поражением спинного мозга, дают возможность значительно снизить риск развития неврологического дефицита, улучшить качество жизни пациентов.
2. При выявлении пороков развития позвоночника и спинного мозга у детей необходимо проведение комплексной оценки как ортопедического, так и неврологического статуса пациента с целью дальнейшего ведения и назначения курсовой медикаментозной терапии.
3. Дети после проведенной хирургической коррекции пороков развития позвоночника, сочетанных с пороками спинного мозга, нуждаются в динамическом неврологическом наблюдении и дальнейшем подборе курсовой медикаментозной терапии.

**Список литературы:**

1. Ульрих Э. В. Аномалии позвоночника у детей. — СПб., 1995. — С. 5–8, 45–47.

2. Ульрих Э. В., Мушкин А. Ю., Млодик М. Г. Ультразвуковая диагностика врожденного порока развития позвонков и спинного мозга у детей. — Л., 1991. — С. 10–19.

3. Михайловский М. В., Фомичев Н. Г. Хирургия деформаций позвоночника. — Новосибирск, 2002.

4. Руцкий А. В., Шанько Г. Г. Нейроортопедические и ортопедоневрологические синдромы у детей и подростков. — Минск, 1998. — С. 74–78.

5. Яновский А. М. Спинномозговые расстройства при врожденных пороках и деформациях позвоночника у детей. Автореф. дис. … канд. мед. наук. — СПб., 1995.

6. Меламуд Э. Е. Повреждения позвоночника и спинного мозга у детей и подростков. Дис. … д-ра мед. наук. — Саратов, 1982.

7. Кузнецов В. Ф. Вертеброневрология: клиника, диагностика, лечение. — Минск: Книжный Дом, 2004. — С. 36–39.

**Уважаемые читатели!**

**АССОЦИАЦИЯ МЕДИЦИНСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ**
продолжает работу постоянно действующих **МЕЖДИСЦИПЛИНАРНЫХ СЕМИНАРОВ**,
направленных на укрепление диалога между специалистами лабораторной диагностики и клиницистами.
Заседания проходят в формате «Круглого стола».

28 мая успешно был проведен семинар на тему:

**«ЛАБОРАТОРНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ДИАГНОСТИКИ САХАРНОГО ДИАБЕТА»**

Программа:

1. ***«Сахарный диабет в исторической динамике»*** — доцент кафедры факультетской терапии имени проф. С. П. Боткина ВМА им. С. М. Кирова д. м. н. В. И. Один.
2. ***«Сахарный диабет и дисбиоз кишечника»*** — профессор кафедры госпитальной терапии СПбГМУ имени акад. И. П. Павлова д. м. н. В. И. Немцов.
3. ***«Измерение глюкозы методами диагностики возле пациента»*** — профессор кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины СПбГМУ имени акад. И. П. Павлова д. м. н. Л. А. Хоровская.

**Ваши вопросы и предложения просим присылать по электронному адресу:** ejvcons@mail.ru
Контактный телефон: 8 905 22 960 22. Наименования планируемых семинаров на 2009–2010 учебный год на странице 83.

РЕДАКЦИЯ ЖУРНАЛА БУДЕТ ПУБЛИКОВАТЬ МАТЕРИАЛЫ ДАННЫХ МЕРОПРИЯТИЙ

# ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЛИКИРОВАННОГО ГЕМОГЛОБИНА

**А. В. БАГАЕВ**
**ЗАО «АНАЛИТИКА», ведущий специалист по продукции, Москва**

***Резюме.*** *Широкая распространенность заболевания диабетом, поздняя диагностика и тяжесть осложнений, вызванных неадекватной терапией, определяют актуальность внедрения в лабораторную практику надежных и доступных методов измерения гликированного гемоглобина (HbA1c) в крови. Различные методические подходы и существование двух стандартов (NGSP и IFCC) затрудняют правильную интерпретацию результатов, полученных в разных лабораториях. В статье оцениваются достоинства и недостатки популярных методов определения HbA1c и приводятся количественные аналитические характеристики иммунотурбидиметрического метода измерения HbA1c.*

***Ключевые слова:*** *гликогемоглобин HbA1c, методы определения, стандартизация исследований, иммунотурбидиметрия, ионообменная хроматография.*

# LABORATORY METHODS OF GLYCOHEMOGLOBIN DETERMINATION

**A. V. BAGAEV**
**Company "Analytica", Chief specialist for production, Moscow**

***Summary.*** *Increased prevalence of diabetes mellitus, its late diagnosis and severity of the complications caused by inadequate treatment determine the necessity of the use of precise and available methods of measurement of glycohemoglobin (HbA1c) in blood. Different methodic approaches and existence of two standards (NGSP and IFCC) create difficulties in correct interpretation of the results obtained in different laboratories. The article compares benefits and problems of the most widely used methods of HbA1c evaluation and gives quantitive analythic characteristics of immunoturbidimetric method of HbA1c measurement.*

***Key words:*** *glycohemoglobin HbA1c, methods of determination, standard procedures of investigations, immunoturbidimetry, ion-exchange chromatography.*

Несмотря на принятие в большинстве стран мира национальных программ по борьбе с сахарным диабетом (СД), его распространенность и заболеваемость им продолжают увеличиваться. Он является одной из основных причин ранней инвалидизации и высокой летальности населения.

В настоящее время во всем мире насчитывается около 246 миллионов больных диабетом. Учитывая темпы роста этого заболевания, эксперты ВОЗ прогнозируют, что число больных к 2030 году достигнет 380 миллионов человек. В России в 2008 году официально зарегистрировано 2,834 млн больных СД. Однако данные контрольно-эпидемиологических исследований показали, что истинная численность больных сахарным диабетом в 3–4 раза выше официально признанной и составляет порядка 8 млн человек [1] (это 5,5% всего населения России). Проведенная в России в рамках Приоритетного национального проекта «Здоровье» диспансеризация 6,7 млн здоровых людей в возрасте 35–55 лет выявила порядка 470 тыс. больных СД 2-го типа, что составляет 7,1%. На самом деле и эти данные могут оказаться заниженными, так как около 50% больных СД остаются недиагностированными, и следовательно, не получающими никакой сахароснижающей терапии и сохраняющими стабильную гипергликемию — все это создает благоприятные условия для развития осложнений СД.

Доказано, что гипергликемия способствует развитию и прогрессированию микро-, макроангиопатии, полинейропатии с повреждением, дисфункцией и последующей недостаточностью жизненно важных органов и систем организма. Поражение сосудов сетчатой оболочки глаз с быстрой потерей зрения, гломерулосклероз с развитием хронической почечной недостаточности, диабетическая стопа, артериальная гипертензия, острая/хроническая ишемическая болезнь сердца, мозга и их последствия (инфаркт миокарда, сердечная недостаточность, инсульт, атрофия коры мозга со снижением когнитивных функций и развитием слабоумия) — таков далеко не полный перечень ассоциированных с СД болезней и синдромов. Как результат, пациенты с СД умирают в два раза чаще, чем те, кто не имеет этого заболевания. Наибольший удельный вес среди причин смерти имеет сердечно-сосудистая патология, на долю которой приходится не менее 85% всех смертей пациентов с СД 2-го типа.

Столь серьезная ситуация во многом определяется поздней диагностикой СД 2-го типа, когда от момента появления заболевания до его обнаружения проходит более 10 лет, а также низким, не превышающим в некоторых странах 16%, уровнем адекватной компенсации гипергликемии. Поэтому повышение эффективности ранней диагностики СД и обеспечение качественного лечения, направленного на достижение целевого уровня гликемии пациента, рассматривается сегодня как важнейшая задача, стоящая перед медиками многих стран мира, в том числе и России.

На сегодняшний день общепризнанным показателем выраженности и степени компенсации нарушений углеводного обмена является уровень гликированного гемоглобина (HbA1). Гликированный гемоглобин (гликогемоглобин) — это гемоглобин, в котором углеводный остаток конденсируется с N-концевым валином в бета-цепи молекулы HbA. Гликирование — неферментативный процесс и протекает медленно, в течение всей жизни эритроцита (около 120 дней). Установлено, что оно осуществляется через стадию образования альдимина (так называемые «Шиффовы основания» между альдегидом углеводов и аминогруппой), сравнительно нестойкого, «обратимого» соединения. Далее альдимин посредством химического преобразования (преобразование Амадори) превращается в относительно стойкое, «необратимое» соединение кетоамин. Образовавшийся кетоамин остается присоединенным к белку на весь период его жизни. Гликогемоглобин HbA1 разделяется на подгруппы в зависимости от присоединенного углевода (HbA1a, A1b, A1c). HbA1c содержит одну молекулу глюкозы, он составляет 70–90% гликированной фракции, остальное количество приходится на HbA1a (имеет форму 1 — с фруктозо-1,6-бифосфатом и форму 2 — с глюкозо-6-фосфатом) и HbA1b (углеводный остаток, точно не идентифицирован).

Содержание гликогемоглобина имеет прямую корреляцию с уровнем глюкозы в крови и является интегрированным показателем компенсации углеводного обмена на протяжении последних 60–90 дней. Скорость образования HbA1c, также как и HbA1, зависит от величины гипергликемии, а нормализация его уровня в крови происходит через 4–6 недель после достижения нормального уровня гликемии. В отдельных случаях при высоком уровне глюкозы в крови могут наблюдаться низкие значения HbA1c. Это происходит при патологиях, сопровождающихся сокращением срока жизни эритроцитов (гемолитическая болезнь), или при значительной недавней потере крови (увеличение доли молодых эритроцитов). Напротив, высокие значения HbA1c при нормальном уровне глюкозы были отмечены при железодефицитной анемии (увеличение доли старых эритроцитов), дефиците витамина $B_{12}$ и фолиевой кислоты. Эти обстоятельства должны быть учтены при клинической интерпретации значений HbA1c.

В соответствии с рекомендациями ВОЗ и Российской Федеральной целевой программы «Сахарный диабет», определение концентрации гликогемоглобина должно проводиться у каждого больного диабетом с регулярностью 4 раза в год [1, 2]. При этом определены целевые значения HbA1c, достижение которых позволяет существенно снизить риск возникновения осложнений СД. Практически все национальные диабетические ассоциации, ВОЗ и ВФД (Всемирная федерация диабета — International Diabetes Federation, IDF) рекомендуют поддерживать «строгую» компенсацию углеводного обмена, при которой уровень гликогемоглобина (HbA1c) в крови составлял бы менее 7% и даже ниже 6,5% (при норме 6,0%).

В рекомендациях, разработанных АДА (Американская диабетическая ассоциация — American Diabetes Association, ADA) совместно с ВФД в 2006 году, подчеркивается, что показатель HbA1c более 7,0% следует

рассматривать как недостаточную компенсацию углеводного обмена у больного СД 2-го типа и как необходимость принятия конкретных действий по улучшению лечения для снижения этого показателя.

Такие «жесткие» рекомендации по контролю углеводного обмена являются следствием проспективного исследования UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetic Study). Результаты этого исследования, проводившегося в период с 1976 по 1997 гг. в 23 центрах Великобритании с включением 5102 пациентов с впервые выявленным СД 2-го типа, четко свидетельствуют о том, что при уменьшении уровня HbA1c на 1% общая летальность при СД 2-го типа снижается на 21%, риск развития микрососудистых осложнений — на 37%, а инфаркта миокарда — на 14% [3].

За время, прошедшее с 1976 года, когда впервые было предложено использовать определение содержания гликогемоглобина для контроля уровня глюкозы у больных сахарным диабетом [4], было разработано много лабораторных методов, позволяющих определять HbA1c. Разнообразие методов предполагает возникновение дискуссий по поводу преимуществ или недостатков того или иного метода. Так как в настоящее время отсутствует единая международная процедура стандартизации, в соответствии с которой все существующие методы могли бы быть нормированы, регулярно предпринимаются попытки достижения такого соглашения. Чтобы выработать единый стандарт и преодолеть проблемы, связанные с его принятием, Международная федерация клинической химии (IFCC) создала в 1993 году «рабочую группу» по стандартизации определения HbA1c. Эта группа координирует действия национальных групп и изготовителей приборов и тестов для определения HbA1c. В июле 2001 года международным сообществом были утверждены референсные методы определения HbA1c. Таковыми стали высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) и капиллярный электрофорез (HPLC/capillary electrophoresis, HPLC-CE) [5].

В результате дальнейших усилий, предпринятых IFCC, был разработан первичный референсный материал высокоочищенного гликогемоглобина и проведены сравнительные исследования относительно других методов и стандартов, в том числе NGSP (Национальная программа по стандартизации гликогемоглобина, США). Установленная между двумя системами измерений взаимосвязь была проверена многочисленными исследованиями и утверждена документально.

Взаимосвязь данных показателей определяется следующим соотношением:

$$NGSP = (0{,}915 \times IFCC) + 2{,}15$$

Так как абсолютные значения NGSP больше значений IFCC всего на 1,5–2 единицы, то одновременное существование двух близких систем оценки вызывает трудности и может явиться предпосылкой к ошибочному истолкованию результатов клиницистами и пациентами. Поэтому следующим этапом работы по стандартизации исследования гликированного гемоглобина стала выработка в октябре 2007 года совместного решения IFCC, с одной стороны, и АДА / ВФД / ЕАИД (Европейская ассоциация по изучению диабета — European Association for the Study of Diabetes, EASD), с другой, о единицах измерения и соотношении между ними. Было принято решение, что при использовании оборудования, стандартизованного в соответствии с требованиями IFCC, или диагностических систем, аттестованных с использованием соответствующего референтного материала, содержание гликогемоглобина должно выражаться в единицах IFCC (ммоль HbA1c/моль Hb) и в производных единицах NGSP (%). Кроме того, ожидается, что по окончании широкомасштабного исследования “Average Plasma Glucose Study” должна быть установлена взаимосвязь между концентрацией HbA1c и средним содержанием глюкозы в крови, в результате чего появится новый показатель “A1C-derived average glucose” (ADAG).

Следует отметить, что на сегодняшний день большинство производителей приборов и наборов для определения HbA1c имеют сертификат NGSP. Однако ряд производителей ориентируется на требования IFCC. В нашей стране принято ориентироваться на значения NGSP.

Принимая во внимание строгие требования к определению граничных значений содержания гликогемоглобина у больных СД, были разработаны современные требования к методу измерения гликогемоглобина:

- метод должен быть стандартизирован (сертификат NGSP, IFCC или European Reference Laboratory for Glycohemoglobin, ERL);
- межсерийный Cv не должен быть выше 4%;
- исследование должно быть непродолжительным;
- процедура анализа должна быть простой.

За последнее десятилетие для определения содержания гликогемоглобина был разработан и нашел практическое применение ряд аналитических методов, таких как катионообменная хроматография высокого и низкого давления, ионообменная хроматография, аффинная хроматография; электрофоретический метод и электрофокусирование; колориметрический метод с использованием тиобарбитуровой кислоты и иммунохимические методы, в частности, иммунотурбидиметрия.

### Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

Признана референсным методом. При помощи ВЭЖХ определяются HbA1c, HbA1a, HbA1в. Содержание отдельной фракции пропорционально площади соответствующего пика. Расчет проводится анализатором автоматически, результат выдается в процентах, так как пики калибраторов уже имеют процентное выражение. Процедура определения предусматривает удаление Шиффовых оснований. Исключена интерференция

с гемоглобинами (F, S, C, D, E) и карбогемоглобинами. Калибровка осуществляется по двум стандартам гликогемоглобина. Недостатком данного метода является необходимость приобретения специализированного дорогостоящего оборудования.

**Ионообменная хроматография низкого давления**

Данный метод получил широкое распространение в лабораториях благодаря оптимальному сочетанию аналитических характеристик и потребительских качеств. Так, например, в анализаторе *DS-5 Glycomat* производства компании Drew Scientific (Великобритания) избирательно определяется процентное содержание HbA1c в присутствии гемоглобинов A1a, A1b или F, определяется наличие в пробе гемоглобинов C и S. Результаты имеют хорошую корреляцию с референсным методом ВЭЖХ. Процесс пробоподготовки стандартизирован и не требует много времени. Процедура измерения занимает 5 минут. Анализатор можно использовать для выполнения как единичных измерений, так и серии проб.

**Ионообменная хроматография (ручная процедура)**

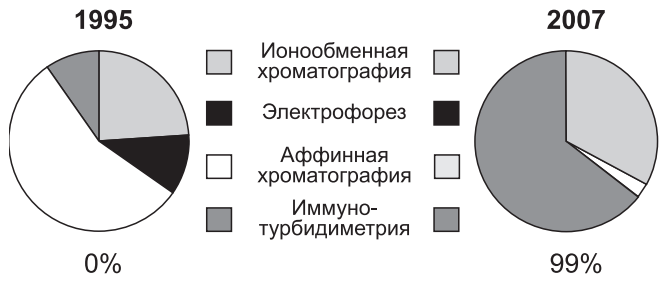
Цельная кровь смешивается с лизирующим раствором, содержащим детергент и борат-ионы в высокой концентрации. В процессе гемолиза достигается устранение лабильных Шиффовых оснований. Затем гемолизат в течение 5 минут смешивается со слабосвязанной катион-обменной смолой. За это время HbA0 связывается со смолой. Для отделения смолы от супернатанта, в котором содержится HbA1, используется специальный сепаратор. Процентное содержание гликогемоглобина от общего содержания гемоглобина в крови рассчитывается после измерения оптической плотности гликогемоглобиновой фракции и общего гемоглобина при длине волны 415 нм или 405 нм относительно стандартного раствора гликогемоглобина. В качестве примера использования данного метода в диагностических тест-системах можно привести набор *Glycohemoglobin HbA1* производства компании Human GmbH (ФРГ), который содержит все необходимое для выполнения 20 или 100 тестов. Любая лаборатория, в которой имеется полуавтоматический биохимический анализатор или фотометр, с помощью этого набора может определять содержание гликогемоглобина в пробах пациентов.

**Портативные анализаторы гликогемоглобина**

В последнее время получило развитие направление по созданию компактных систем для определения важнейших биохимических показателей «у постели больного» (Point of Care Testing, POCT). Для гликогемоглобина также были разработаны подобные системы, использующие одноразовые картриджи: *NycoCard* (Axis-Shield), *DC2000+* (Bayer), *A1cNow* (Metrika), *TRIstat* (Trinity Biotech) и др. Достоинствами этих систем являются простота использования и скорость получения результатов анализа. Однако высокие стоимость теста и вариабельность результатов существенно ограничивают их применение.

**Иммунотурбидиметрия**

По данным CAP (College of American Pathologists) в 1995 году при исследовании содержания гликогемоглобина 54% лабораторий использовали метод аффинной хроматографии, тогда как в 2007 году основными методами стали иммунотурбидиметрия (65%) и ионообменная хроматография (32% лабораторий). Данные представлены ниже на диаграмме [7].




Популярность иммунотурбидиметрического метода объясняется тем, что он позволяет напрямую (без предварительного определения негликированной фракции) определять процентное содержания HbA1c в цельной крови. Этот двустадийный метод основан на конкурентном связывании общего гемоглобина и HbA1c со специфическими латексными частицами пропорционально их концентрации. Затем происходит связывание гликогемоглобина и специфических мышиных моноклональных антител, которые, в свою очередь, взаимодействуют с козьими поликлональными антителами к IgG мыши, вызывая агглютинацию латексных частиц. Степень агглютинации зависит от количества связанного с латексными частицами гликогемоглобина HbA1c. Увеличение мутности смеси измеряется фотометрически. Процентное содержание HbA1c в пробах вычисляется по калибровочной зависимости, установленной при измерении калибраторов [6].

Ниже в таблицах представлены результаты оценки внутрисерийной и межсерийной вариации, полученные при измерении содержания гликогемоглобина в контрольных растворах трех уровней с использованием набора *HbA1c% Liquidirect* производства компании Human GmbH (ФРГ).

В сравнении с референсным методом ВЭЖХ (*Tosoh A1c 2.2 Plus*), а также относительно коммерческого набора для иммунотурбидиметрического определения гликогемоглобина (*Roche TinaQuant HbA1c II*) набор *HbA1c% Liquidirect* показал хорошую корреляцию результатов при измерении проб пациентов как с нормальным, так и с высоким содержанием HbA1c. Результаты представлены в таблице и на диаграмме.

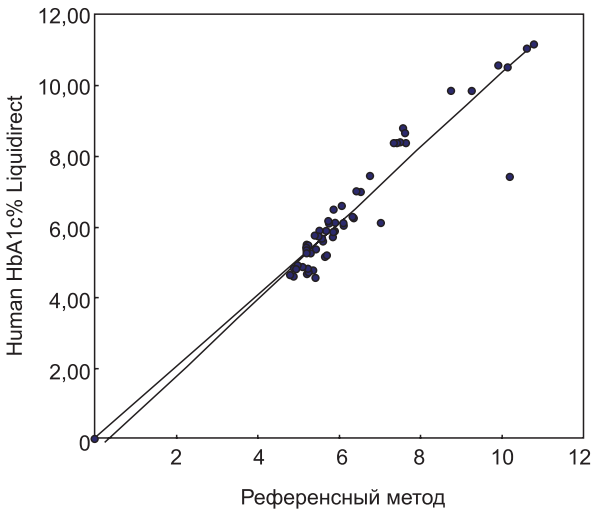
**Внутрисерийная вариация (n = 20)**

| Контроль | Среднее HbA1c,% | SD HbA1c,% | Cv, % |
|---|---|---|---|
| Низкий | 4,76 | 0,060 | 1,26 |
| Средний | 7,29 | 0,075 | 1,04 |
| Высокий | 10,9 | 0,160 | 1,46 |

**Межсерийная вариация (n = 20)**

| Контроль | Среднее HbA1c,% | SD HbA1c,% | Cv, % |
|---|---|---|---|
| Низкий | 4,72 | 0,062 | 1,30 |
| Средний | 7,36 | 0,083 | 1,12 |
| Высокий | 11,1 | 0,167 | 1,51 |

| Параметр | ВЭЖХ // Human HbA1c% Liquidirect | TinaQuant HbA1c II // Human HbA1c% Liquidirect |
|---|---|---|
| Число измерений, *n* | 40 | 60 |
| Коэфф. корреляции, $r^2$ | 0,993 | 0,942 |
| Уравнение регрессии | 0,95x + 0,055 | 1,074x – 0,366 |
| $X_{ср}$ | 7,33% | 6,28% |
| $Y_{ср}$ | 7,02% | 6,38% |




Наряду с хорошими аналитическими характеристиками преимуществами турбидиметрического метода являются: возможность выполнения измерений на автоматических и полуавтоматических биохимических анализаторах, которые, как правило, уже имеются в лабораториях; представление результата в виде процентного отношения; небольшое количество образца (20 мкл); короткое время исследования (10 минут). При использовании современных биохимических автоанализаторов, для которых минимальный объем реакционной смеси составляет 150–200 мкл, стоимость одного анализа почти в 1,5 раза меньше, чем при использовании специализированных анализаторов.

Очевидно, что расходы на регулярный контроль гликемии выше, чем на приобретение сахароснижающих препаратов. Однако проведение постоянного мониторинга состояния углеводного обмена у больных СД является необходимым условием для профилактики сосудистых осложнений, отсрочки их прогрессирования, сохранения работоспособности больных, поддержания нормального качества их жизни и снижения частоты инвалидизации. Это, в свою очередь, приводит к уменьшению общих затрат на медицинское обслуживание больных СД. Последние рекомендации ВОЗ, ВФД и ЕАИД еще раз подчеркивают необходимость своевременной диагностики данного заболевания, а также проведения постоянного качественного контроля терапии и профилактики сосудистых осложнений СД, что возможно лишь при использовании современных методов и диагностической аппаратуры.

**Литература**

1. Федеральная целевая программа «Сахарный диабет». Методические рекомендации. — М., 2002.

2. American Diabetes Association: Clinical Practice Recommendation (Position Statement) // Diabetes Care, 2001, 24 (Suppl. 1): S33–S55.

3. Association of glycaemia with macro vascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study // BMJ, 2000, 321. — P. 405–412.

4. Koenig R. J. et al. Hemoglobin A1c as an indicator of the degree of glucose intolerance in diabetes // Diabetes, 1976. — N 25 (3). — P. 230–232.

5. Jeppsson J.-O. et al. Approved IFCC Reference Method for the Measurement of HbA1c in Human Blood // Clin. Chem. Lab. Med., 2002, 40. — P. 78–89.

6. Chang J. et al. Evaluation and interference study of hemoglobin A1c measured by turbidimetric inhibition immunoassay // Am. J. Clin. Pathol., 1998, 109. — P. 274–278.

7. Molinaro R. J. Targeting HbA1c: standardization and clinical laboratory measurement // Med. Lab. Obs., 2008, 1. — P. 10–19.