

№ 1 (10)
ФЕВРАЛЬ
2011

ВЕСТНИК

«ЛАБОРАТОРИИ ДНК-ДИАГНОСТИКИ»

ТЕМЫ НОМЕРА:



«ЛАБОРАТОРИЯ ДНК-ДИАГНОСТИКИ»
СЕГОДНЯ И ЗАВТРА



СОВРЕМЕННАЯ ДИАГНОСТИКА
РЕНАЛЬНЫХ ПАТОЛОГИЙ



ПЦР-ДИАГНОСТИКА
ТУБЕРКУЛЕЗА



ВЗЯТИЕ МАТЕРИАЛА ДЛЯ
БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ



ВЫБОР БИОМАТЕРИАЛА ПРИ
НАЗНАЧЕНИИ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЙ



Медицинский центр «ДНК-Диагностика-Новосибирск»

Огромный выбор лабораторных исследований для частных лиц:

- Клинические исследования.
- Исследования гормонов, маркёров инфекционных заболеваний, опухолевых маркёров, аутоантител.
- Выявление причины аллергии.
- Мониторинг беременности.
- Выявление более 40 возбудителей инфекционных заболеваний методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).
- Биохимические исследования.
- Исследования системы гемостаза.
- Бактериологические исследования.
- Цитологические и гистологические исследования.

0 противопоказаниях проконсультируйтесь со специалистом



Адрес:

г. Новосибирск, Красный проспект, 77Б

Телефон: (383) 201-02-17

Время работы:

пнд-пнт: с 8:00 до 18:00, сбт: с 9:00 до 15:00

Web: www.dnklab.ru

Сеть медицинских центров



ВЕСТНИК

«ЛАБОРАТОРИИ ДНК-ДИАГНОСТИКИ»

ФЕВРАЛЬ, 2011, № 1 (10)

Содержание

От редакции. Развитие и перспективы: «Лаборатория ДНК-Диагностики» сегодня и завтра 2

Клиническая лекция. Современная лабораторная диагностика ренальных патологий: от ранних стадий до острой почечной недостаточности 6

Проблемы диагностики инфекций. Место ПЦР исследований в своевременной и точной диагностике туберкулеза 12

Берем пробы правильно. Взятие материала для бактериологического исследования .. 18

Наш справочник. Правильный выбор биоматериала при назначении ПЦР-исследований..... обложка 3



Е. В. Селиванов, главный редактор, к. м. н., заместитель директора ООО Медицинский центр «Лаборатория ДНК-Диагностики» по лечебной работе

Уважаемые коллеги!

Мы рады новой встрече с вами в 2011 году. За то непродолжительное время, которое прошло с момента выхода предыдущего номера, в нашей лаборатории произошли значительные перемены, о которых мы решили рассказать вам в передовой статье. Надеемся, что вы внимательно ее прочтете.

Традиционно в нашем журнале стали появляться большие статьи и обзоры ведущих российских авторов. В этом номере журнала вас также ждет интереснейший материал о новых современных методах лабораторной диагностики в нефрологии.

Теперь несколько слов о том, каким будет наш журнал в дальнейшем. Поскольку большая часть информации, которую мы бы хотели донести до читателей, уже опубликована в предыдущих номерах журнала, а вопросов, тем для обсуждения и своих статей вы так и не прислали, мы переходим в режим новостной поддержки. Это значит, что теперь журнал будет выходить 1 раз в квартал, всего 4 раза в год: в конце февраля, мая, августа и ноября. Надеемся, наш журнал по-прежнему будет интересным и актуальным.

Самые востребованные статьи из прошлых выпусков мы собираемся выпустить отдельным дайджестом.

Сеть медицинских центров



Вестник «Лаборатории ДНК-Диагностики» — корпоративное издание ООО Медицинский центр «Лаборатория ДНК-Диагностики».

Наш адрес: г. Барнаул, ул. А. Петрова, 247. **Тел./факс:** 3852 289060. **E-mail:** otvet@dnklab.com. **Web:** www.dnklab.ru.
Главный редактор: Е. В. Селиванов. **Технический редактор:** Е. Н. Звягинцев. **Печать и допечатная подготовка:** типография Printexpress, г. Барнаул, ул. Кирова, 47, тел./факс: 3852 363626.
Тираж: 800 экз.

РАЗВИТИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ: «ЛАБОРАТОРИЯ ДНК-ДИАГНОСТИКИ» СЕГОДНЯ И ЗАВТРА

С момента своего возникновения наша лаборатория постоянно идет вперед, совершенствуясь и приближаясь к недостижимому идеалу, заботливо прописанному в 15 ГОСТах и огромном количестве других нормативных документов. Не стал исключением и 2010 год.

Весь прошедший год лаборатория активно переоборудовалась, заменив старые, зачастую маломощные анализаторы на современные и производительные модели. Теперь поток исследований от 84 фирм-партнеров из 6 городов Сибири выполняется на следующих аппаратах:

- иммунохемилюминесцентный анализатор Siemens Immulite 2000;
- два иммуноферментных анализатора открытого типа Seac Alisei Q. S.;
- мощный современный биохимический анализатор открытого типа Erba XL-600 series.

Модернизация оборудования потребовала от лаборатории и полной замены компьютерной системы регистрации, прохождения и учета заявок и выдачи результатов — ЛИС¹. Теперь вместо написанной, что называется, «на коленке», недорогой разработки 2003 года мы рас-

¹ ЛИС — лабораторная информационная система, сочетание системы управления базами данных и специфических лабораторных приложений, созданная для управления потоками лаборатории и автоматической связи с анализаторами.

полагаем одной из совершенных ЛИС, разработанной и поддерживаемой компанией «Рослабсистемс». Персоналу лаборатории пришлось совершить буквально «подвиг», чтобы в новогодние каникулы обеспечить одномоментный переход всей лаборатории на новую систему.

Многие из наших партнёров сразу столкнулись с последствиями этого перехода:

- естественно, первое время были некоторые недоработки и недоделки, которые оперативно устранялись;
- для ряда исследований (цитологических, гистологических, бактериологических) появилась возможность выдачи результатов в виде текста произвольной длины и структуры, что сразу было одобрено как врачами клинической лабораторной диагностики, так и клиницистами;
- более совершенными и детальными стали печатные формы результатов;
- был оптимизирован процесс доставки результатов по электронной почте нашим партнерам;
- практически прекратились ошибки ручного ввода на тех направлениях, где налажено автоматическое взаимодействие анализаторов и ЛИС, минуя оператора.



В процессе настройки и внедрения ЛИС нам также пришлось внимательно пересмотреть весь наработанный за 10 лет багаж, и в некоторых разделах навести порядок. Итоги этого процесса до сих пор вызывают непонимание наших партнеров, поэтому рассмотрим их поподробнее:

Общий анализ крови и лейкоцитарная формула

Чтобы понять проблему, с которой сталкиваются и лаборатория, и клиницист, необходимо представлять современную технологию исследования общего анализа крови (ОАК). Сложилось так, что этот термин достаточно расплывчатый, и под ним каждый понимает тот набор тестов, к которым привык. В одних клиниках это знаменитая «тройка» — гемоглобин, лейкоциты, СОЭ, в других — подсчет на автоматическом анализаторе. В этом случае количество выдаваемых параметров зависит от класса прибора. В большинстве лабораторий, в т.ч. и в нашей, используются 18-параметровые анализаторы, которые реально подсчитывают и измеряют гемоглобин, эритроциты (и их объём), тромбоциты (и их объём), лейкоциты. Для лейкоцитов в анализаторе существует подсчет по 3 основным группам: моноциты, лимфоциты, гранулоциты (сумма нейтрофилов, базофилов, эозинофилов). Все остальные параметры анализатором рассчитываются. Такого набора параметров вполне достаточно для основных клинических ситуаций (в т.ч. для скринингового исследования), но в случае лейкоцитарной патологии бывает необходимо микроскопическое исследование мазка крови. Долгое время мы использовали такой алгоритм: выполняли ОАК на анализаторе, а в случае каких-либо отклонений дополнительно назначали ручной подсчет лейкоцитарной формулы. При этом врач-клиницист, направивший пациента, не мог повлиять на методику исследования.

С началом внедрения ЛИС мы решили изменить тактику, введя в дополнение

к стандартному ОАК на гематологическом анализаторе отдельное дополнительное исследование — микроскопический подсчет лейкоцитарной формулы. Теперь клиницист может самостоятельно выбрать, что ему важнее — недорого провести скрининг, или дороже, но под контролем глаза опытного врача исследовать кровь пациентов (например, если необходимо знать количество эозинофилов и т.п.).

Исследование кала на яйца гельминтов

Как мы уже писали раньше, исследование кала на яйца гельминтов в большинстве случаев требует концентрирования пробы, т.к. современные гельминтозы характеризуются невысокой концентрацией яиц в кале. Различают три концентрационных метода, разрешенных органами ГСЭН к использованию:

1. Метод флотации в концентрированных растворах солей (в таких растворах яйца цестод и нематод всплывают на поверхность, где их и собирают для микроскопии). Недостаток такого метода — не удается выявлять яйца трематод (описторх, клонорх) и цисты лямблий.
2. Метод флотации для трематод (в нашем преискуранте он значился как «выявление яиц описторхов методом флотации»). Правильнее говорить «эфирно-формалиновый метод концентрирования яиц трематод», поскольку всплывает каловый детрит, а яйца описторхов и клонорхов тонут. В придонном осадке их и собирают для микроскопии.
3. Концентрирование на фильтрах PARASEP. Недостатков не имеет, концентрирует яйца и цисты всех кишечных паразитов. Препятствием для широкого применения является относительно высокая цена исследования.

Мы так и продолжали бы работать этими тремя методами, если бы государство о нас не «позаботилось». К сожалению, используемый в методике концентрирования яиц трематод диэтиловый эфир был включен в список №2 веществ, используемых при очистке наркотиков, и запрещен к свободному обороту в стране. Теперь, чтобы использовать диэтиловый эфир, необходимо получать специальное разрешение Госнаркоконтроля, и внедрять систему хранения и учёта расхода вещества, что в итоге приводит к удорожанию методики до цены PARASEP. Поэтому было принято решение отказаться от первых двух методов, и использовать универсальный метод, позволяющий выявить любых кишечных паразитов — концентрирование на фильтрах PARASEP.

Другие нововведения в методах выявления паразитов

Поскольку исследование кала на яйца глистов оставляют в стороне выявление яиц остриц, крупных видимых глистов и их фрагментов в кале, мы ввели в прейскуртант две новые методики:

1. Визуальное (макроскопическое) исследование кала на глисты и их фрагменты. Это тот случай когда пациент приносит кал, и говорит, что видел в кале глистов.
2. Исследование соскоба с перианальных складок на острицы. Технологии его выполнения могут сильно отличаться, поэтому, если ваша клиника планирует начать работу с этой методикой — обратитесь к нам за подробной инструкцией.

Изменения в составе количественных профилей аллергенов

Врачи, использующие эти методики, уже обратили внимание на то, что в января в нашем прейскуртанте появились новые профили аллергенов, но при этом остались и старые. Продолжаться это будет недолго: после переходного периода

(с января по март) старые профили будут удалены из прейскуртанта. Такой шаг вызван изменениями состава аллергенов производителем реагентов (Radim).

После проведения анализа качества реагентов российской компании «Иммунотекс» для выявления непереносимости ряда лекарственных препаратов, было принято решение о замене этих тест-систем на более качественные. Мы остановили свой выбор на реагентах ведущего европейского производителя — компании Dr. Fooke. В соответствии с их реагентной линейкой изменился и состав комплексов на выявление лекарственной IgE непереносимости анестетиков, антибиотиков, противовоспалительных препаратов.

Также введён новый аллергологический тест: выявление IgE непереносимости пищевых консервантов. Учитывая широчайшую распространенность пищевых консервантов и реакций на них, считаем эти исследования весьма важными.

Диагностика сифилиса

Долгое время мы пытались алгоритмизировать назначение тех или иных тестов на сифилис, но со временем нам стало понятно, что для полноценной постановки диагноза сифилиса необходимо минимум 3 исследования:

1. АТ к возбудителю сифилиса методом ИФА (выявляет все случаи наличия антител к возбудителю сифилиса, даже у давно излеченных пациентов);
2. АТ к возбудителю сифилиса методом РПГА (подтверждает специфичность выявленных антител и дает представление об их титре);
3. реакция микропреципитации (rapid plasma reagin, RPR-тест) на сифилис, выполненная на современных реагентах, четко выявляет «региновые» антитела, что позволяет различить случаи свежего и перенесенного ранее сифилиса.

С 10 января всем пациентам одновременно выполняются все 3 исследования.

Биологический материал на исследования методом ПЦР

Воистину, творчество врачей не имеет границ, в этом мы смогли убедиться с нового года, когда столкнулись с затруднениями при регистрации ряда заявок. Т.к. в ЛИС исследования привязаны к биоматериалам, назначение ПЦР-исследований на возбудителей в несвойственном для конкретной инфекции материале (например, возбудителя типичной кровяной инфекции — токсоплазма — в моче, или уреоплазмы в соскобе из конъюнктивы) не могут быть зарегистрированы без внесения изменений в конфигурацию системы. Чтобы перевести процесс в законное русло, мы приводим на третьей странице обложки таблицу, составленную согласно рекомендациям производителей реагентов и литературным данным, и описывающую возможные биоматериалы для самых распространённых возбудителей (напоминаем всем любителям нового, что современная медицина стандартизована, и лаборатория имеет право выявлять возбудителей только в том материале, который аттестован производителем тест-системы). При назначении исследований методом ПЦР из экзотических биоматериалов мы настоятельно просим сверяться с этой таблицей.

Прочие нововведения

Кратко остановимся на других изменениях ассортимента выполняемых методик.

1. Поскольку антитела к резус-фактору невозможно выявлять, не зная группу крови, к методике добав-

лено определение группы крови по системе АВ0 и резус-фактора; при определении титра естественных и иммунных антител к антигенам группы АВ0 определяются, наряду с группой АВ0 и резус-фактором, и антитела к резус-фактору.

2. Ввиду полного отсутствия спроса удален ряд ПЦР-исследований: выявление возбудителя коклюша, парагриппа, респираторно-синцициального вируса, аденовируса, идентификация субтипов гриппа типа А.
3. Изменились составы ПЦР-комплексов «Дифференциальная диагностика возбудителей ОРЗ методом ПЦР» и «ПЦР при бактериальном вагинозе».
4. Введены новые бактериологические исследования: посев на флору (из глаз, ушей, носа, зева), посев из уретры у мужчин, обе методики с вариантами без определения и с определением чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.
5. Изменен состав «генитальной системы».
6. В ближайшее время будут оптимизированы под произошедшие перемены и переданы партнерам новые бланки направлений на исследования.

* * *

Надеемся, что вы с пониманием отнесетесь к происходящим в лаборатории положительным переменам, и после полной отладки системы наша совместная работа станет еще более плодотворной.



СОВРЕМЕННАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА РЕНАЛЬНЫХ ПАТОЛОГИЙ: от ранних стадий до острой почечной недостаточности

Вельков В. В., Резникова О. И.

ЗАО «Диакон», 142290, Московская обл., г. Пущино, ул. Грузовая, 1А

Самыми актуальными задачами лабораторной диагностики в области нефрологии являются: 1) ранняя диагностика ренальной патологии, 2) дифференциальная диагностика патологий: а) гломерулярных, б) тубулярных, в) преренальных; г) ренальных; д) постренальных; и, 3) ранняя диагностика острой почечной недостаточности.

Недостатки современной диагностики ХПН

ХПН диагностируются согласно ухудшению гломерулярных функций с помощью определения скорости клубочковой фильтрации (СКФ) за счет измерения концентрации сывороточного креатинина или клиренса креатинина и расчета значений СКФ по специальным формулам.

Недостатки креатинина как маркера СКФ:

1) Уровень креатинина варьирует в связи с возрастом, полом, уровнем метаболизма в мышечной ткани, принимаемыми медикаментами, водно-солевым обменом; 2) у креатинина, как у маркера СКФ, есть «слепая зона». В диапазоне СКФ от 40 до 90 мл/мин/1,73м² нет пропорциональности между повышением концентрации креатинина и снижением СКФ. В этом диапазоне креатинин дает ложноотрицательные результаты и не указывает на начало развития ренальной патологии, т.е. ранних стадий снижения СКФ креатинин «не видит»; 3) из-

за большого функционального резерва почек концентрация креатинина может не изменяться в случаях, когда большая часть почечной ткани уже не функционирует; 4) при ухудшении клубочковой фильтрации происходит компенсаторное усиление канальцевой секреции креатинина, в результате чего происходит завышенная оценка функции почек; 5) при каких-либо острых изменениях функции почек сывороточный креатинин недостаточно точно отражает реальную картину до тех пор, пока не достигается некоторая стабилизация состояния, что, чаще всего происходит спустя два-три дня после первоначального поражения; 6) уровни сывороточного креатинина очень инертны, они не позволяют своевременно оценивать изменения СКФ, в частности, при ухудшении или улучшении ренальных функций.

Следует ли нормировать уровни мочевых биомаркеров на концентрации u-креатинина?

Нормирование уровней биомаркеров, определяемых в моче, на концентрацию u-креатинина (**u** — **urinary**, мочевой) является общепринятым. Однако уровни u-креатинина отражают одновременно эффективность и гломерулярной фильтрации, и тубулярной секреции. При этом, когда u-креатинин применяется как специфический маркер клубочковых функций, то молчаливо предполагается, что тубулярная секреция отсутствует. Поэтому нормирование любого тубуляр-

ного маркера на концентрацию и-креатинина, особенно у пациентов с острой и даже умеренной почечной недостаточностью может привести к некорректному результату.

В целом, «нормирование уровней любого мочевого маркера, специфического для тубулярных нарушений на уровне второго маркера, которые сильно зависят от клубочковых или от других ренальных или неренальных условий, может приводить к неправильной клинической интерпретации.

Нормирование уровней мочевых маркеров на и-креатинин может проводиться только в случаях «чистой» гломерулопатии, когда измеряются специфические маркеры клубочковой функции (например, альбумин в моче).

Во всех других случаях ренальных заболеваний нормирование уровней мочевых маркеров на концентрацию и-креатинина неправомерно и этого следует избегать» [1] (список литературы в редакции).

Недостатки расчета СКФ по сывороточному креатинину по формуле MDRD (Modification of Diet in Renal Disease).

Согласно формуле,

$$\text{СКФ} = 186 \times \text{Cre}^{-1,154} \times \text{A}^{-0,203},$$

где Cre — сывороточный креатинин, мг/дл; А — возраст, лет.

Для женщин результат умножают на 0,742. При СКФ (MDRD) = 60 мл/мин/1,73м² результаты находятся в диапазоне значений от 42 до 78. Такая точность полагается приемлемой, но предполагает повторное определение СКФ через 3 месяца.

Недостатки данной формулы таковы: 1) при ХПН значения СКФ в 6% случаев могут быть завышены; 2) у лиц без ХПН значения СКФ в 29% случаев могут быть занижены; 3) в 90% случаев показатели СКФ находятся в диапазоне $\pm 30\%$ от

прямо измеряемых значений СКФ (по экзогенным маркерам); 4) формула MDRD завышает стадии ХПН у пациентов, в действительности находящихся на стадиях тяжести 2 и 3, но правильно классифицирует пациентов на стадиях 4 и 5, что является весьма существенным при мониторинге ХПН и поэтому в этих случаях показатели СКФ (MDRD) должны рассматриваться критически; 5) педиатрические пациенты с СКФ < 60 мл/мин/1,73 м² могут иметь действительные значения СКФ по экзогенным маркерам на 29% более высокие и, тем не менее, иметь нарушенные ренальные функции; 6) у гериатрических пациентов результаты свидетельствуют о превалировании у них ХПН третьей стадии, что не подтверждается при определении СКФ с помощью плазменного цистатина С.

Цистатин С

Это негликозилированный белок с молекулярной массой 13,4 кДа, который: 1) с постоянной скоростью синтезируется всеми клетками, содержащими ядра, 2) свободно фильтруется через клубочковую мембрану, 3) метаболизируется в почках, но 4) не секретируется проксимальными почечными канальцами. Относится к семейству ингибиторов цистеиновых протеиназ.

Сывороточные уровни цистатина С обуславливают: 1) постоянная скорость синтеза, практически не зависящая от возраста, пола, веса, 2) постоянная скорость выведения из организма, которая зависит от преимущественно от ренальных функций, 3) повышение уровней из-за ренальной патологии, 4) повышение синтеза при сердечной недостаточности и острых коронарных синдромах.

Чем тяжелее ренальная патология, тем хуже цистатин С фильтруется в почках и тем выше его уровень в крови. Однократное измерение уровня цистатина С в крови позволяет с помощью формул вычислить СКФ.

Как маркер СКФ сывороточный цистатин С значительно превосходит сывороточный креатинин и клиренс креатинина, так как способен:

- диагностировать самые ранние изменения СКФ (гиперфильтрацию при гипертензии и диабетической нефропатии и ранние стадии гипофильтрации);
- отслеживать быстрые изменения СКФ при развитии ОПН;
- точно оценивать ренальные функции у педиатрических пациентов и гериатрических пациентов;
- прогнозировать сердечно-сосудистые и другие осложнения функции почек.

и-Цистатин С — маркер тубулярной дисфункции

Ранее полагаючи, что в значимых количествах цистатин С в моче обнаруживаться не должен. В дальнейшем было обнаружено, что при нарушении тубулярной функции концентрации и-цистатина С в моче могут возрастать до 200 раз, особенно при остром повреждении почек (ОПП).

Согласно многочисленным исследованиям: 1) повышенный уровень и-цистатина С — маркер нарушения эффективности реабсорбции в проксимальных канальцах; 2) верхний референтный предел для и-цистатина С не зависит от пола, возраста; это измерение является точным.

Уровни и-цистатина С: 1) в норме — $0,096 \pm 0,044$ мг/л, 2) при тубулярных заболеваниях — $4,31 \pm 3,85$ мг/л, 3) при гломерулярных заболеваниях — $0,106 \pm 0,133$ мг/л.

Цистатин С в отделении неотложной терапии

Сывороточный цистатин С диагностирует ОПН, связанные с гломерулярными заболеваниями, цистатин С в моче — ОПН, связанные с тубулярными заболеваниями.

«Измерение и-цистатина С может быть элегантным и точным методом для диагностики и мониторинга тубулярной дисфункции, даже в случаях гломерулярных/тубулярных заболеваний», «поскольку измерение и-цистатина С возможно проводить на автоматических биохимических анализаторах, его определение легко можно применять в комплексе со стандартными панелями, которые используются для выявления ренальных патологий, даже в неотложных ситуациях».

«Измерение уровней цистатина С в сыворотке и в моче позволит врачу провести быстрый скрининг ренальных функций, так как измерение цистатина С в сыворотке с большой чувствительностью и специфичностью отражает СКФ, а измерение цистатина С в моче — это хорошее отражение тубулярных функций. Все это позволяет врачу назначать измерение цистатина С в моче в неотложных ситуациях, когда сбор суточной мочи невозможен из-за необходимости срочного получения результатов» [2].

Сывороточный цистатин С также является: 1) эффективным маркером тяжести острой сердечной недостаточности и острых коронарных синдромов. Особенно эффективно его применения для оценки тяжести ОКС без элевации ST-сегмента в комплексе с натрийуретическими пептидами и кардиальными тропонинами [3-5], 2) ранним маркером преэклампсии, позволяющем оценивать риск ее возникновения в первом триместре беременности [6-8].

Цистатин С — маркер преклинической фазы ренальной патологии

Основной вклад, который внесло изучение цистатина С в медицинскую науку — это новое понимание того, что является «нормальной функцией почек». Так, «если примем, что на всем диапазоне СКФ между конкретными значениями СКФ и риском летальности у пожилых лиц имеется непрерывная линейная зависимость (без резких пороговых зна-

чений), это приведет к новой парадигме того, что понимается под нормальной функцией почек. Одно из главных диагностических значений цистатина С состоит в том, что он позволяет количественно определять градиент ренальной функции у лиц, которые не попадают в рамки общепринятых критериев клинических ренальных патологий» (9). Именно поэтому были предложены термин *преклиническое* заболевание почек, характеризующий лиц: а) без клинических заболеваний почек, б) с показателем СКФ по креатинину >60 мл/мин/1,73 м² и в) с повышенным уровнем сывороточного цистатина С ($\geq 1,0$ мг/мл) (9). Полагается, что *преклиническое* заболевание почек *независимо от других факторов предсказывает развитие клинических заболеваний почек и риск ССЗ*. Термины, аналогичные прежнему заболеванию почек — *прегипертензия* и *преддиабет*. «Пожалуй, наиболее многообещающее применение цистатина С — использование его как маркера пре-клинических или ранних заболеваний почек среди лиц, у которых СКФ, определенная по креатинину, находится в нормальном диапазоне ≥ 60 мл/мин/1,73 м², но цистатин С повышен» [9].

В США рекомендуется использовать измерение сывороточного цистатина С для рутинного скрининга ренальной дисфункции и связанных с ней ССЗ у всех лиц 55 лет и старше.

Показания к измерению цистатина С

1. Рутинный скрининг ренальной дисфункции и связанных с ней ССЗ у всех лиц 55 лет и старше.
2. Быстрая диагностика и стратификация пациентов в ОНТ и ОИТ.
3. Оценка ренальной дисфункции любой этиологии и стратификация ее тяжести при: 1) гипертензии, 2) СД и/или метаболическом синдроме, 3) патологии почек, 4) диабетической нефропатии, 5) трансплантации почек и печени, 6) операциях с при-

менением АИК и 7) у педиатрических пациентов.

4. При беременности — для оценки риска преэклампсии.
5. При сердечной недостаточности (особенно рекомендуется в сочетании с NTpro-BNT, тропонином: 1) при ОКС, особенно без повышения ST сегмента, 2) при инфаркте миокарда (ИМ) без повышения ST-сегмента.

Дифференциальная диагностика преренальных, ренальных и постренальных патологий: специфические белковые маркеры мочи

Почечная, или ренальная, протеинурия — один из наиболее важных признаков заболеваний почек. Может быть вызвана поражением клубочков и/или канальцев нефрона. Непочечная протеинурия может быть преренальной и постренальной.

Преренальная протеинурия возникает при отсутствии патологического процесса в почках, она обусловлена заболеваниями или патологическими состояниями, которые приводят к изменению концентрации белка в плазме крови (гемоглобин при выраженном гемолизе, миоглобин при синдроме размождения и др.) или к появлению патологических белков (белок Бенс-Джонса и другие парапротеины при миеломной болезни).

Постренальная протеинурия обусловлена выделением с мочой слизи и белкового экссудата при воспалении мочевых путей или кровотечении.

Основные механизмы развития почечной протеинурии:

- 1) *гломерулярная протеинурия* — увеличение фильтрации белков при повреждении гломерулярного фильтра; 2) *тубулярная протеинурия* — снижение реабсорбции профильтровавшихся белков клетками почечных канальцев; 3) *смешанная протеинурия* — сочетание гломерулярной и тубулярной протеинурии.

Два типа гломерулярной протеинурии: 1) селективная гломерулярная протеинурия: через гломерулярный барьер проходят альбумин и трансферрин; 2) неселективная гломерулярная протеинурия: через гломерулярный барьер проходят альбумин, трансферрин и иммуноглобулин G.

Тубулярная протеинурия. Дисфункция проксимальных канальцев нарушает реабсорбцию профильтровавшихся белков, в моче появляются: α_1 -микроглобулин, β_2 -микроглобулин, ретинол-связывающий белок, в норме проходящие через нормальный клубочковый фильтр, но не реабсорбирующиеся в проксимальных канальцах.

Специфические белковые маркеры мочи для дифференциальной диагностики патологической протеинурии

Показания к измерению специфических белковых маркеров в моче: протеинурия.

NGAL: ранний маркер острого повреждения почек

Острое повреждение почек (ОПП) — новый термин, которым обозначается внезапное прекращение или резкое снижение функций почек (ранее ОПН). ОПП — это комплекс синдромов, который характеризуется быстрым (за несколько часов или дней) и резким (в несколько раз) падением ренальных функций. ОПП может происходить как без видимых предшествующих признаков надвигающейся почечной дисфункции, так и при развитии осложнений при ХПН. Важнейший традиционный маркер ОПП — повышение сывороточного креатинина.

При ОПП: 1) сывороточный креатинин повышается через 24-48 ч после отказа ренальной функции; 2) цистатин С в сыворотке и/или в моче повышается через 6-8 ч после начала развития ОПП, 3) NGAL повышается в сыворотке и в моче

через 2 ч после начала развития ОПП.

«Измерение сывороточного креатинина для выработки надежного терапевтического вмешательства при ОПП бесполезно и аналогично ожиданию 2-3 дней перед началом терапии пациентов с ишемическим инсультом, инфарктом миокарда и острым неврологическим инсультом» [10].

NGAL — neutrophil gelatinase-associated lipocalin, липокалин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов, или липокалин 2, впервые выделен из супернатанта активированных нейтрофилов человека, однако может синтезироваться в разных органах и выходит в циркулирующую кровь.

Функции NGAL: 1) стимулирование пролиферации поврежденных клеток, в особенности, эпителиальных и 2) противодействие бактериальным инфекциям (является бактериостатиком).

В норме NGAL стимулирует дифференцировку и структурную реорганизацию ренальных эпителиальных клеток. При развитии ренальных заболеваний уровни NGAL в сыворотке постепенно возрастают и коррелируют с тяжестью патологии.

При развитии ОПП:

- 1) повышается синтез NGAL в печени, легких, нейтрофилах, макрофагах и других клетках иммунной системы;
- 2) в сыворотке повышаются уровни s-NGAL (s-serum, сывороточный);
- 3) повышенные уровни NGAL поступают в почки и реабсорбируются в проксимальных канальцах: функция повышенного при ОПП сывороточного NGAL: ограничение и/или уменьшение тяжести повреждений в проксимальных канальцах;
- 4) *в почках*, в дистальных частях нефрона в течение нескольких часов после их повреждения, происходит локальный массовый синтез NGAL de novo; функции u-NGAL, (u-urinary), синтезированного в поч-

ках при ОПП: а) антиинфекционное бактериостатическое действие на дистальный урогенитальный тракт, б) стимулирование выживания и пролиферации клеток в дистальном сегменте, обычно подвергающемся апоптозу при ишемическом ОПП.

Таким образом, *s-NGAL* и *u-NGAL* — ранние маркеры развития ОПП при разных типах ренальных повреждений. Четко и многократно показано: при повреждении ренальных канальцев происходит повышение уровня *s-NGAL* в 7-16 раз, *u-NGAL* — в 25-1000 раз! [11]

Комплексное измерение *s-NGAL* и *u-NGAL* дает весьма ценную, специфичную и, самое главное, прогностическую информацию о развитии острого повреждения почек.

NGAL — индикатор ренальных повреждений трансплантированной почки. Мониторинг *s-NGAL* после трансплантации почки может свидетельствовать либо о восстановлении ренальных функций (быстрое снижение уровней *s-NGAL*), либо, при медленном снижении или повышении *s-NGAL*, 1) о развитии осложнений, 2) об их тяжести, 3) об отсроченной функции трансплантата и 4) необходимости диализа.

NGAL и ишемические ренальные повреждения при операциях, связанных с сердечно-легочным шунтированием. Ишемическое повреждение почек, вызываемое хирургическими операциями, с применением аппарата искусственного кровообращения (АИК) — весьма частая причина ОПП.

«Измерение u-NGAL через короткие промежутки времени после АИК — отличный маркер последующего развития ОПП и его осложнений. Степень подъема u-NGAL позволяет легко проведение стратификации риска; u-NGAL при этом связан с ключевыми клиническими факторами: длительностью госпитализации, количеством дней в состоянии ОПП, необходимостью диализа и смертностью. Применение этого многообещающего ран-

него биомаркера позволяет своевременно начинать лечение» [12].

В целом, *NGAL* — это эффективный ранний маркер и предиктор:

- хронических заболеваний почек;
- диабетической нефропатии;
- волчаночного нефрита;
- ОПП, связанного с разными причинами;
- тяжести ОПП при сепсисе;
- дисфункции почек у пациентов в отделениях неотложной терапии;
- повреждений трансплантатов почки;
- отсроченной функции трансплантата и необходимости диализа;
- ренальной дисфункции при трансплантации печени;
- ишемических ренальных повреждений при операциях с АИК;
- нефротоксичности фармпрепаратов;
- нефропатии, связанной с нефротоксичными рентгено-контрастными препаратами;
- инфекций мочевого тракта;
- при беременности *s-NGAL* является ранним маркером гестационного диабета и преэклампсии. [13, 14]

Основная ценность *NGAL* состоит в том, что он является ранним маркером ОПП при операциях с АИК и при трансплантациях. В этих случаях измеряют *u-NGAL* до и после операции и получают однозначный ответ. Весьма информативно сочетание измерения уровней *u-NGAL* и *s-NGAL*. Если *s-NGAL* повышается после операции — это дополнительное указание на ренальное повреждение.

Показания к измерению NGAL:

- 1) Пациенты отделений неотложной и интенсивной терапии.
- 2) Тяжелые ренальные патологии, трансплантации.
- 3) Хирургия с АИК.
- 4) Применение нефротоксичных контрастеров.



МЕСТО ПЦР ИССЛЕДОВАНИЙ В СВОЕВРЕМЕННОЙ И ТОЧНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ТУБЕРКУЛЕЗА

Селиванов Е. В., Звягинцев Е. Н.

Ситуация с туберкулезом в России на протяжении последних лет остается неутешительной.

Год	Заболеваемость	
	Число заболевших	на 100 тыс. населения
2000	нет данных	90,7
2007	117738	82,6
2008	107998	75,8
2009	105530	74,3

2009 г. в России зарегистрировано 105530 случаев впервые выявленного активного туберкулеза (в 2008 г. — 107988 случаев). Показатель заболеваемости туберкулезом составил 74,26 на 100 тыс. населения (в 2008 г. — 75,79 на 100 тысяч).

По данным Роспотребнадзора, в России ежегодно заболевают туберкулезом около 117-120 тыс. человек, умирают от этого заболевания около 25 тыс. человек. Среди впервые выявленных больных число случаев с множественной лекарственной устойчивостью туберкулеза составляет около 10%.

Не снижается заболеваемость туберкулезом и среди детей. В 2007 г. заболело 3372 ребенка в возрасте до 14 лет, в 2008 г. — уже более 4 тыс. детей.

Такие показатели заболеваемости ставят Россию в ряд таких стран, как Руанда и Бангладеш (по 93 больных на 100 тыс. населения), и Афганистан (98 больных на 100 тыс. населения). Рост показателя заболеваемости туберкулезом в России начался с 1991 г. (34,0 на 100 тыс. населения), и в 2000 г. он достиг величи-

ны 90,7 случаев на 100 тыс. населения.

ВОЗ называет туберкулез главной смертности от инфекционных заболеваний в мире — он является причиной 80-85% летальных исходов при инфекциях.

Взять распространение туберкулеза под контроль можно, наладив систему выявления больных на ранних стадиях. С нашей точки зрения, огромный вред для ранней диагностики туберкулеза нанесло длительное отрицание важности молекулярно-биологических методов светиллами противотуберкулезной службы: вплоть до 2003 года в противотуберкулезной службе на ПЦР-исследования было наложено негласное табу. И очень напрасно. Для того, чтобы аргументировать нашу позицию, рассмотрим имеющиеся в лабораторном арсенале методы диагностики туберкулеза:

- бактериоскопический метод;
- культуральный метод;
- автоматические культуральные системы;
- молекулярно-биологические методы (ПЦР и НАСБА);
- выявление антител методом ИФА.

Как мы видим, недорогая и быстрая микроскопия (как световая, так и люминесцентная) обладает низкой чувствительностью, чувствительные культуральные методы имеют длительные сроки выполнения, а при использовании технологий, сокращающих время ответа, резко увеличивается себестоимость. И только ПЦР-исследования обладают

Метод	Чувствительность	Длительность	Себестоимость
Бактериоскопия	10 ⁵ -10 ⁶ клеток/мл	2-3 часа	Минимальная
Люминесцентная микроскопия	7×10 ⁴ -7×10 ⁵ клеток/мл	3-4 часа	Умеренная
Культуральный метод	20-100 клеток/мл	2-3 месяца	Умеренная
Автоматические культуральные системы	20-100 клеток/мл	10-14 дней	Высокая
Молекулярно-биологические методы (ПЦР и НАСБА)	5-20 клеток/мл	4-5 часов	Умеренная или высокая
Выявление антител методом ИФА	только антитела	3-4 часа	Умеренная

и высокой чувствительностью, и высокой специфичностью, и умеренной себестоимостью, и быстро позволяют получить результат. Кроме того, современные варианты ПЦР-тестов (включая технологии биочипов) позволяют точно идентифицировать вид микобактерий, а также выявлять генетические мутации, приводящие к устойчивости (в т.ч. множественной) микобактерий к противотуберкулезным препаратам.

Возможности ПЦР-анализа настолько широки, что позволили обнаружить ДНК *M. tuberculosis* в останках людей, умерших за 2000-1500 лет до нашей эры, а также у перуанских мумий 1000-летней давности.

Особенно ярко преимущества ПЦР проявляются при внелегочных формах инфекции или при неструктивных формах. Если при деструктивных формах заболевания совпадение между ПЦР-исследованиями и культуральным методом составляет в среднем 94%, то при нелегочных формах и неструктивных формах ПЦР-исследования в несколько раз чаще позволяют подтвердить туберкулезную этиологию процесса.

По литературным данным, наибольшие расхождения наблюдаются при:

- туберкулезе бронхов (МБТ при ПЦР выявляется в 3 раза чаще, чем культурально);
- туберкулезном плеврите (МБТ при ПЦР выявляется в 4 раза чаще, чем культурально);
- туберкулезном менингите (МБТ при ПЦР выявляется в 3 раза чаще, чем культурально);

— туберкулезе мочеполовой системы (при ПЦР выявляется в 10-16 раз чаще, чем культурально).

Туберкулез бронхов крайне редко подтверждается культурально, и такие больные уходят без диагноза туберкулеза, тогда как ПЦР-исследования в 3 раза чаще позволяют выявить туберкулезную природу поражения бронхов. По данным Новосибирского НИИ туберкулеза, у лиц с верифицированным туберкулезом почек МБТ выявлялись в 84% методом ПЦР, и только в 5,3% культурально.

В настоящее время описано более 100 видов микобактерий. При этом микроскопически, а зачастую и по росту на питательных средах, они практически не отличаются. Именно поэтому при бактериоскопии принято в результате исследования указывать факт выявления КУБ (кислотоустойчивых бактерий) или КУМ (кислотоустойчивых микобактерий). Далеко не все из них относятся к туберкулезным. Заболевания, вызванные нетуберкулезными микобактериями (микобактериозы, вызываются медленно растущими микроорганизмами *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. marinum*, *M. simiae*, *M. szulgai*, *M. ulcerans*, и быстро растущими *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*), часто имеют сходную с туберкулезом клинико-рентгенологическую картину. Вследствие этого больные микобактериозами получают не показанные им химиопрепараты, к которым потенциально патогенные микобактерии резистентны. Ранняя же диагностика микобактериозов и их этиотропное лечение, как правило, приво-

дят к благоприятному исходу. В отличие от бактериоскопии, метод ПЦР позволяет в короткие сроки точно дифференцировать виды микобактерий на основании генетических характеристик.

Таким образом, если мы хотим справиться с эпидемией туберкулеза, необходимо переходить на использование современных молекулярно-биологических методов диагностики туберкулеза (ПЦР, НАСБА и т.п.). Поскольку специфичность этих методов составляет 99,1 % а чувствительность 98,2 %, то альтернативы ПЦР-диагностике у фтизиатрии просто нет.

Фтизиатрия является разделом медицины, деятельность которого контролируется Министерством здравоохранения и социального развития. Обратимся к нормативной документации. И здесь мы встречаем поддержку молекулярно-биологических методов. В основополагающем для службы приказе «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации» №109 от 21.03.2003 содержатся нормы, разрешающие применение ПЦР в бактериологической диагностике туберкулеза. Так, в приложении 9 к этому приказу под заголовком «Инструкция по организации деятельности бактериологических лабораторий противотуберкулезный учреждений» прямо сказано:

«...С целью быстрой идентификации микобактерий туберкулезного комплекса ... допускается использование методов, основанных на амплификации фрагментов генома микобактерий (полимеразная цепная реакция — ПЦР), других молекулярно-генетических методов. ПЦР-анализ может быть применен для исследования мокроты, промывных вод бронхов, мочи и спинномозговой жидкости...»

На эффективность ПЦР-анализа (и любых других лабораторных методов диагностики туберкулеза) существенным образом влияет правильность сбора и метод обработки клинического

материала. В диагностике туберкулеза (включая и ПЦР-диагностику) для исследований обычно используют мокроту, промывные воды бронхов, бронхиальные аспираты, плевральную жидкость, мочу, спинномозговую жидкость, кровь, биоптаты лимфоузлов и других тканей. Правила сбора каждого вида биоматериалов тщательно изложены в упомянутом приказе №109 от 21.03.2003 г. и в Методических рекомендациях «Организация выявления больных туберкулезом в амбулаторно-поликлинических и больничных учреждениях», утвержденных МЗСР 20.07.2007 (приказ №5589-РХ). Учитывая важность вопроса, позволим себе вкратце остановиться на основных моментах.

Легочный туберкулез

Показания к проведению бактериологической диагностики (включая ПЦР):

- все лица, обратившиеся за медицинской помощью с респираторными жалобами;
- лица, которые при обращении имеют симптомы, характерные для туберкулеза — кашель с мокротой более 2-3 недель, кровохарканье, боль в грудной клетке, ночные поты, потеря массы тела, субфебрильная и фебрильная температура на протяжении длительного времени;
- с рентгенологическими изменениями в органах дыхания;
- контактные по туберкулезу или входящие в группы риска.

Материал для исследования:

- мокрота (к сожалению, в обычной практике при назначении этого теста лаборатории имеют дело чаще всего со слюной, а не с мокротой. Следует четко отслеживать факт сдачи пациентом именно мокроты. Отличить по внешним признакам слюну и, например, постингаляционную мокроту очень трудно. Сбор и доставка в лабораторию качественно собранной мокроты являются

- ся наиболее проблемными этапами в диагностике туберкулеза);
- промывные воды бронхов (сбор проводится врачом-оториноларингологом);
 - бронхоальвеолярная лаважная жидкость (только в случае наличия показаний к бронхоскопии. Здесь нас подстерегает риск того, что эндоскописты, стараясь максимально бережно дезинфицировать бронхоскоп, снижают концентрации и время экспозиции дезинфектантов, что приводит к контаминации эндоскопов микобактериями или ДНК микобактерий);
 - промывные воды желудка (т. к. часто мокрота заглатывается и намного проще обнаружить МБТ в промывных водах желудка. Наилучший эф-

- фект достигается после сбора промывных вод после 30-минутной аэрозольной ингаляции физиологическим раствором);
- биопсийный материал, взятый при бронхоскопии.

Туберкулез мочевыделительной системы

Показания к проведению бактериологической диагностики (включая ПЦР):

- хронический пиелонефрит;
- хронический цистит;
- гематурия (часто изолированная, без протеинурии);
- артериальная гипертензия неясной этиологии;
- аномалии развития почек и мочевыводящих путей.

Материал для исследования: моча

Так как наиболее частой формой туберкулезного поражения является туберкулез органов дыхания, основной материал для исследования — мокрота.

Сбор мокроты. У пациентов, выделяющих мокроту в достаточном количестве, для исследования собирают ее утреннюю порцию. Качественным материалом можно считать мокроту, имеющую слизистый или слизисто-гнойный характер, а также содержащую плотные белесоватые включения. Достаточный объем исследуемой порции мокроты составляет 3-5 мл.

1. Следует объяснить пациенту причины исследования и необходимость откашливать не слюну или носоглоточную слизь, а содержимое глубоких отделов дыхательных путей, что достигается в результате продуктивного кашля, возникающего после нескольких глубоких вдохов.
2. Необходимо предупредить пациента, что он должен предварительно почистить зубы и прополоскать полость рта кипяченой водой, что позволяет механически удалить основную часть вегетирующей в ротовой полости микрофлоры и остатки пищи, загрязняющие мокроту и затрудняющие ее обработку.
3. Выделение мокроты усиливается после одного или нескольких глубоких вдохов.
4. Флакон с собранной порцией мокроты тщательно закрывают завинчивающейся крышкой, маркируют и помещают в специальный бикс или ящик для транспортировки в лабораторию.

Если же пациент не выделяет мокроту или выделяет ее только эпизодически и в скудном количестве, то следует применить раздражающие ингаляции. Для аэрозольных ингаляций пользуются портативными или стационарными аэрозольными ингаляторами. Для ингаляций рекомендуется раствор, в 1 л которого содержится 150 г хлорида натрия и 10 г двууглекислого натрия (NaHCO_3). Для провокации мокроты необходимо вдохнуть на протяжении 10-15 минут от 30 до 60 мл подогретой до 42-45°C смеси. Так как вдыхаемый во время процедуры ингаляции раствор вызывает усиленную саливацию еще до появления кашля и отделения мокроты, в первые минуты после завершения процедуры ингаляции пациент должен сплюнуть слюну в специально приготовленный лоток с 5% раствором хлорамина (или другого дезинфицирующего средства), и только после этого собрать мокроту для исследования.

В связи с тем, что аэрозольная ингаляция вызывает выделение водянистого секрета, напоминающего по консистенции слюну, во избежание выбраковки материала в бланке направления и на флаконе с материалом должна присутствовать обязательная маркировка, указывающая на то, что материал получен после аэрозольной ингаляции.

У большинства пациентов после аэрозольной ингаляции в течение нескольких часов наблюдается остаточная гиперсекреция бронхиального отделяемого, поэтому пациенту рекомендуется в течение суток после ингаляции собрать мокроту для второго исследования.

(собирают всю утреннюю порцию, исследуют осадок. Эффективна процедура сбора мочи после туберкулинодиагностики/туберкулинопровокации).

Туберкулез мужских половых органов

Показания к проведению бактериологической диагностики (включая ПЦР):

- хронический простатит;
- опухоли без гистологической верификации;
- дизурические расстройства неясной этиологии;
- первично-хроническое течение эпидидимита с локализацией очага воспаления в хвостовом отделе придатка;
- наличие свища в области мошонки при эпидидимите.

Материал для исследования:

- эякулят;
- секрет предстательной железы;
- отделяемое свища.

Туберкулез женских половых органов

Показания к проведению бактериологической диагностики (включая ПЦР):

- женщины с туберкулезом любой другой локализации;
- первичное или вторичное бесплодие;
- женщины с половым инфантилизмом;
- женщины, перенесшие внематочную беременность;
- женщины молодого возраста с миомами матки больших размеров, малоподвижными;
- женщины, мужа которых болеют туберкулезом мочеполовой сферы;
- женщины с подозрением на аденомиоз;
- девочки, инфицированные в детстве и наблюдавшиеся фтизиатром по поводу раннего периода первичной туберкулезной инфекции и положительной реакцией Манту на момент достижения ими менархе;
- поздние менархе, опсоолигоменорея, альгодисменорея, первичная и вторичная аменорея.

Материал для исследования:

- мазок из цервикального канала;
- материал с диагностического выскабливания;
- менструальная кровь.

Туберкулез лимфатических узлов

Показания к проведению бактериологической диагностики (включая ПЦР): хронические рецидивирующие лимфадениты неясной этиологии любых локализаций.

Сбор мочи для исследований на туберкулез

Для ПЦР-исследований на туберкулез собирается средняя часть утренней порции или вся утренняя порция в стерильную посуду после тщательного туалета наружных половых органов. Анализ мочи на микобактерий должен предусматривать обязательное трехкратное исследование. В лаборатории мочу центрифугируют, используя метод накопления осадка.

Сборсуточной мочи для бактериологического исследования не практикуется. Это объясняется тем, что при накоплении мочи в течение суток невозможно сохранить ее стерильность. Хранение емкости с мочой в холодном месте может привести к выпадению солей, что неблагоприятно отражается на последующей обработке осадка.

Менструальная кровь

Исследование менструальной крови требует особого методического подхода. Наличие в этом материале большого количества протеолитических, фибринолитических и других ферментов обуславливает необходимость незамедлительной доставки материала в лабораторию и тщательной его обработки, так как менструальная кровь, с одной стороны, является весьма подходящим материалом для развития гноеродной и гнилостной флоры, а с другой — благодаря обилию ферментов, неблагоприятно влияет на жизнеспособность микобактерий. Менструальную кровь следует собирать не тампоном, а вакуумным отсосом или колпачком Кафки.

Материал для исследования: пунктаты из лимфоузлов.

Туберкулез глаз

Показания к проведению бактериологической диагностики (включая ПЦР):

- хронические вялотекущие или рецидивирующие увеиты (передние, задние, периферические);
- кератоувеиты, склероувеиты;
- хориоретиниты;
- иридоциклиты.

Материал для исследования: соскоб (мазок) с конъюнктивы.

Необходимо соблюдать принятую кратность исследования. Обычно это трехкратное исследование в течение трех последовательных дней. Увеличение кратности исследований без контроля качества сбора материала неэффективно и приводит только к лишним затратам.

Несколько замечаний по хранению и доставке материала для ПЦР-исследования на микобактерию туберкулеза

Сбор основных видов биоматериала для исследования на МБТ описан на врезках. Безусловно, крайне желательно использовать одноразовую прочную посуду с хорошей крышкой, не допускающей просачивания жидкости, объемом 50-60 мл и с широким горлом.

Поскольку микобактерии являются очень жизнестойкими микроорганизмами, жестких требований по срокам их доставки нет. Допускаемые нормативными документами сроки составляют 3-5 дней.

Тем не менее, длительное хранение таких материалов, как мокрота или менструальная кровь, резко снижает диагностическую эффективность лаборатории. Например, мокрота в процессе хранения в холодильнике меняет свою консистенцию, полимеризуется, становясь непригодной как для бактериологического посева, так и для выделения ДНК при ПЦР-диагностике.

Если существует настоятельная необходимость в хранении, то материал должен храниться в холодильнике без замораживания. Лучше всего смешать пробу с консервантом в соотношении 1 часть пробы на 2 части консерванта. В качестве консерванта используют 3% раствор борной кислоты, или 0,1% раствор хлоргексидина биглюконата, или 10% раствор трехзамещенного фосфата натрия (Na_3PO_4).

Во время транспортировки важно предохранять материал от воздействия прямых солнечных лучей и не допускать его перегревания (в теплых районах и в летний период). Очень важно правильно, четко маркировать материал и четко заполнять бланки сопроводительных направлений.

Категорически запрещается заворачивать флакон с материалом в бланк направлений.

Таким образом, используя современные молекулярно-биологические методы диагностики и оставаясь постоянно настроенными в отношении возможности инфицирования наших пациентов микобактериями туберкулеза, мы добьемся значительных успехов в борьбе с туберкулезной эпидемией.



БЕРЕМ ПРОБЫ ПРАВИЛЬНО: взятие материала для бактериологического исследования

Селиванов Е. В., Шикова Т. Е., Звягинцев Е. Н.

Пожалуй, ни один другой раздел лабораторной диагностики не зависит так сильно от правильной техники взятия материала, как бактериология. Например, достаточно взять посев на флору из цервикального канала после бимануального исследования, чтобы проба была контаминирована микроорганизмами с кожи и влагалища. В результате врач получит неправильную информацию о составе патогенов и чувствительности этих патогенов к антибиотикам. К сожалению, именно для бактериологии не существует единых техник и подходов, которые можно было бы уместить на одной страничке. Издаются многостраничные руководства по правилам и технике посевов¹, но из-за их объемности их редко читают, и еще реже правильно выполняют.

Постараемся в сжатой форме дать основные положения по взятию материалов для бактериологического исследования.

1. Общие требования

Из множества важных и нужных требований особое внимание обращаем на следующие условия:

- Микроорганизм должен быть взят из зоны поражения — там где предполагается воспалительный процесс.
- В материал не должна быть занесена посторонняя флора, т.е. руки долж-

ны быть стерильными, инструмент для взятия — стерильным, желательно одноразовым.

- Условия транспортировки должны обеспечить выживание даже капризного микроорганизма в течение всего времени транспортировки в бактериологическую лабораторию (БЛ). Лучшим вариантом является использование разовых систем транспортировки, содержащих одну из транспортных сред — Эймса, Стюарта или Кэрри-Блеера. Каждая из этих сред выпускается в варианте с активированным углем или же без угля. Уголь необходим для сорбции токсинов, снижающих жизнеспособность микробов. Например, посевы на гонорею рекомендуются брать только в среды с углем. Биологический материал погружают в столбик среды таким образом, чтобы он не оставался на ее поверхности. Среда предупреждает гибель микробных клеток, сохраняет их жизнеспособность, но в то же время препятствует размножению микроорганизмов, что исключает или существенно ограничивает преимущественный рост менее требовательных микроорганизмов при ассоциативной микрофлоре. Транспортировать и хранить взятый материал в лабораторию лучше всего при температуре 10-20°C, не подвергая сильным температурным колебаниям, прямому солнечному свету.

¹ МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории». Утверждены приказом главного санитарного врача 23.12.2005.

- Необходимо правильно и полно заполнять направления, не ограничиваясь поверхностными данными — номер и Ф.И.О. Чем больше вводных данных получит врач-бактериолог, тем больше пользы принесет больному и вам его ответ. Помните, что направление для предотвращения загрязнения всегда транспортируется отдельно от материала.
- Пробы биоматериала следует брать до начала антибактериальной терапии. Если пациент уже начал прием препаратов, а посев очень хочется взять (именно хочется, поскольку диагностическая ценность в таком случае падает в разы), старайтесь делать это перед приемом очередной дозы препарата.

2. Техники взятия мазков для посева

Поскольку нашей задачей является краткий экскурс только в те разделы, которые массово используются в поликлинических условиях (в стационаре все гораздо сложнее), мы остановимся на узком круге посевов.

- Материал из ран берут стерильным зондом, по возможности, из более глубоких отделов, очистив рану от отмерших тканей, т.к. верхние отделы могут содержать сапрофитную микрофлору. Взятый материал помещают в пробирку с транспортной средой.
- Мазок из зева берется натошак стерильным зондом с воспаленных участков, при налетах (по краю их) и при наличии пленок — из глубины крипт миндалин, задней стенки глотки, дужек, языка. Взятый материал помещают в пробирку с транспортной средой.
- Мазок из носа, уха берется стерильным зондом. Взятый материал помещают в пробирку с транспортной средой.
- Мазок с конъюнктивы глаза берется врачом-офтальмологом специальным глазным шпателем. Взятый материал помещают в пробирку с транспортной средой.
- Материал из уретры у мужчин берут стерильным зондом, производя соскоб на глубине 3-4 см. Взятый материал помещают в пробирку с транспортной средой.
- Материал из уретры у женщин берут стерильным зондом, вводимым на глубину 1,5-2,0 см. Зонд с материалом помещается в пробирку с транспортной средой

Для транспортировки проб первоначально была разработана среда Стюарта. Она содержала в своей основе тиогликолят, глицерофосфат и метиленовый синий. Метиленовый синий использовался как индикатор анаэробных условий транспортировки. Тиогликолят окисляет метиленовый синий до бесцветного вещества. Если среда портится или в пробу попадает много кислорода — краситель вновь приобретает голубой цвет. Поэтому если среда Стюарта голубеет — она не пригодна для использования.

Затем этот агар был модифицирован Эймсом, исключившим из нее метиленовый синий и тиогликолят. Так что по составу и эффективности эти среды очень близки.

Среды Эймса и Стюарта обеспечивает хорошее сохранение микроорганизмов в течение следующего срока:

- не менее 48–72 часов для стрептококков, энтеробактерий и стафилококков;
- не менее 48 часов для нейссерий (*Neisseria gonorrhoeae*);
- не менее 12–24 часов для *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Gardnerella vaginalis*;
- не менее 24 часов для анаэробов.

В отличие от этих двух сред, среда Кэрри-Блеера имеет другое предназначение: она создана для транспортировки микроорганизмов из фекальных проб. Основана она также на первоначальном рецепте Стюарта. Но Кэри и Блэр разработали новую среду, в которой было меньше питательных веществ, низкий окислительный восстановительный потенциал и слабо-щелочная реакция. Именно такие условия нужны фекальным микроорганизмам.

— Материал из цервикального канала шейки матки берут с помощью стерильного зонда, вводя его в цервикальный канал на 1,0—1,5 см, и, осторожно поворачивая, вынимают, не прикасаясь к стенкам влагалища, после чего помещают в транспортную среду.

Материал, взятый в транспортные контейнеры с средами Эймса или Стюарта, хранится при комнатной температуре и доставляется в лабораторию в течение 1—2 суток с момента забора.

3. Взятие посева мочи на уропатогенную флору

Исследование микрофлоры мочи проводится в средней порции утренней мочи после тщательного туалета наружных половых органов. Мочу собирают в стерильный стакан с крышечкой в количестве не менее 3—5 мл, и доставляют в лабораторию в течение 1,5—2 час. Длительное хранение мочи при комнатной температуре до исследования приводит к изменению физических свойств, разру-

шению клеток и размножению бактерий, что может привести к ложноотрицательному или недостоверному результату исследования.

4. Взятие кала на дисбактериоз

Материалом для исследования на дисбактериоз кишечника служит утренний кал, помещаемый в специальный контейнер с помощью мерной ложки, вмонтированной в крышку контейнера. Количество материала для исследования примерно 2 г (3 лопатки). Если фекалии содержат слизь, кровяные или белые прожилки, предпочтительно именно этот участок брать в качестве материала для анализа. Взятый материал доставляется в лабораторию не позже 1,5 часов с момента дефекации.

Безусловно, в нашей статье мы привели далеко не все тонкости взятия материала, но соблюдение хотя бы этих основ обеспечит лабораторию адекватным материалом, а врача — полноценными результатами лабораторного исследования.

Правильный выбор биоматериала при назначении ПЦР-исследований

Биоматериал	Гепатиты В, С, D, G	Treponema pallidum	Гонкокк, хламидия, трихомонада	Кандида	Гарднерелла, лактобак-терии	ВПЧ всех типов	ЦМВ	ВПГ 1/2 типов	Вирус герпеса 6 ина, вирус Эпштейн-Барр	Вирус герпеса 3 типа (varicella zoster)	Токсоплазма	Вирус краснухи, парвови-рус В19	Chlamydia pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae	Микобактерии туберкулеза*	Стрептококк, стафилококк, энтерококк, кишечная па-лочка и др. УПФ	Энтеровирус	Аденовирус (кроме груп-пы F)	PCB, вирусы гриппа и на-ривли, др. возбудители ОРВИ	Atorobium vaginale
Соскоб из цервикального канала			•	•		•	•	•							•				
Соскоб из уретры у мужчин			•	•		•	•	•							•				
Соскоб из уретры у женщин			•	•											•				
Отделяемое влагалища			•	•	•										•				•
Сперма, секрет простаты			•	•											•				•
Соскоб с язв и эрозий		•						•											
Моча у мужчин			•	•			•	•						•					
Моча у женщин				•			•	•					•						
Кровь цельная (с ЭДТА)				•			•	•	•	•	•	•	•			•			
Клетки крови							•	•	•	•	•	•	•			•			
Сыворотка/плазма	•	•																	
Мазок/Смывы из носоглотки			•	•					•							•	•	•	
Мазок из ротоглотки			•	•					•							•	•	•	
Мокрота				•			•							•					
Отделяемое конъюнктивы			•	•															
Синовиальная жидкость			•														•		
Слюна							•	•	•	•						•	•	•	
Спинальная жидкость		•							•										
Соскоб с головки полового члена		•																	•

* В таблице не отражён полный перечень биоматериалов, используемых в диагностике туберкулеза

С 8 Марта!



сеть медицинских центров



www.dnklab.ru

