

№ 6-7
СЕНТЯБРЬ
ОКТАБРЬ
2010

ВЕСТНИК

«ЛАБОРАТОРИИ ДНК-ДИАГНОСТИКИ»

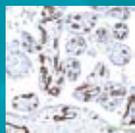
ТЕМЫ НОМЕРА:



**КЛИНИЧЕСКАЯ ЛЕКЦИЯ:
РЕЗУС-ФЕНОТИПИРОВАНИЕ КРОВИ**



**ПЦР ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ
ЖЕНСКИХ ПОЛОВЫХ ОРГАНОВ**



**ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА
ПЛАЦЕНТАРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ**



**ВЗЯТИЕ КРОВИ В ПРОБИРКИ
С АНТИКОАГУЛЯНТАМИ**



**ПАНКРЕАТИЧЕСКАЯ
ЭЛАСТАЗА В КАЛЕ**

Номенклатура, свойства и значение микроорганизмов, определяемых системой «Фемофлор»*

| Микроорганизм | Морфология и свойства | Значение группы микроорганизмов в биоценозе |
|------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Lactobacillus</i> spp. | Грам (+) палочки | <i>Lactobacillus</i> в большинстве случаев составляют основу нормальной микрофлоры влагалища у женщин репродуктивного возраста (Hill G.B. 1993) |
| Семейство Enterobacteriaceae | Факультативно-анаэробные грам (-) палочки | Являются компонентами нормальной флоры урогенитального тракта у женщин (Кира Е.Ф. 1998) Могут быть этиологической причиной аэробного вагинита (Donder G.G. et al 2002) |
| <i>Streptococcus</i> spp. | Грам (+) кокки | |
| <i>Staphylococcus</i> spp. | Грам (+) кокки | |
| <i>Gardnerella vaginalis</i> | Анаэробные грамвариабельные палочки, не образующие спор | <i>Gardnerella vaginalis</i> — представитель транзиторной микрофлоры, один из этиологических агентов развития бактериального вагиноза (Hill G.B., 1993) |
| <i>Prevotella bivia</i> | Анаэробные грам (-) палочки | Виды рода <i>Prevotella</i> встречаются в урогенитальном и кишечном тракте, один из этиологических агентов развития бактериального вагиноза (Hill G.B., 1993) |
| <i>Porphyromonas</i> spp. | Анаэробные грам (-) палочки | Виды рода <i>Porphyromonas</i> входят в состав нормальной микрофлоры урогенитального тракта и полости рта, один из участников развития бактериального вагиноза (Hill G.B., 1993) |
| <i>Eubacterium</i> spp. | Облигатные анаэробы, грам (+), не образующие спор | Виды рода <i>Eubacterium</i> являются одними из основных обитателей кишечника. Условные патогены, могут служить этиологическим фактором развития бактериального вагиноза (Spiegel C.A. et al, 1983) |
| <i>Veillonella</i> spp. | Анаэробные грам (-) кокки | Условно-патогенные микроорганизмы, могут участвовать в развитии бактериального вагиноза (Piot P. et al, 1983) |
| <i>Megasphaera</i> spp. | Анаэробные, труднокультивируемые грам (-) кокки | Ассоциированы с развитием бактериального вагиноза (Fredericks D.N. et al., 2005) |
| <i>Dialister</i> spp. | Анаэробные или микроаэрофильные, труднокультивируемые грам (-) коккобациллы | Условно-патогенные микроорганизмы, могут участвовать в развитии бактериального вагиноза (Fredericks D.N., 2005) |

* Источник: методическое пособие «Урогенитальные инфекции, обусловленные условно-патогенной биотой, у женщин репродуктивного возраста (клинико-лабораторная диагностика)», Москва, 2009 г., ISBN 978-5-7249-1369-0.

Содержание

Клиническая лекция.

Резус-фенотип крови: молекулярные основы и современная стратегия лабораторного тестирования...2

ПЦР-диагностика инфек-

ций. ПЦР-исследования при воспалительных заболеваниях женских половых органов: оптимальный подбор тестов10

Диагностика в акушерс-

тве. Современная лабораторная диагностика плацентарной недостаточности...14

Берем пробы правильно:

взятие крови в пробирки с антикоагулянтами.....18

Новое в лабораторной

диагностике. Панкреатическая эластаза в кале: совершенный тест для определения экзокринной функции поджелудочной железы.....20

Номенклатура, свойства и

значение микроорганизмов, определяемых системой «Фемофлор» обложка 2-3



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

Уважаемые коллеги!

Мы рады снова встретиться с вами после длительного летнего перерыва.

Этот и следующий номера мы вынужденно выпускаем в «сдвоенном» формате, поскольку авторы материалов долго выходили из отпускного состояния, однако надеемся, что второе полугодие пройдет в нормальном рабочем темпе.

Один из следующих тематических выпусков мы планируем полностью посвятить актуальным проблемам исследования системы гемостаза, также, как и обычно, будет публиковаться свежая информация о новинках лабораторной диагностики. Приглашаем наших читателей обсудить наболевшие проблемы практической лабораторной диагностики на страницах нашего журнала.

Надеемся, что наш журнал будет вам интересным и полезным.

Сеть медицинских центров



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

Наш адрес: г. Барнаул, ул. А. Петрова, 247Б. **Тел./факс:** 3852 289069. **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: 600 экз.



РЕЗУС-ФЕНОТИП КРОВИ: молекулярные основы и современная стратегия лабораторного тестирования



*Оловникова Н. И.,
кандидат биологических наук, ве-
дущий научный сотрудник Гема-
тологического научного центра
РАМН, г. Москва*



*Митерев Г. Ю.,
кандидат медицинских наук,
директор ООО «Гематолог»,
г. Москва*

Резус-принадлежность крови человека зависит от экспрессии антигена D на его эритроцитах, и в большинстве случаев D⁺ эритроциты считаются резус-положительными, а D⁻ отрицательными. Антиген D системы резус обладает двумя качествами, которые заставляют учитывать его присутствие на эритроцитах при подборе крови: этот антиген обладает высокой иммуногенностью и встречается лишь у части населения, что создает предпосылки несовместимых трансфузий. Кроме того, анти-D сенсибилизация резус-отрицательной женщины зачастую приводит к гемолитической болезни D-новорожденного, вызванной анти-D антителами матери. Тестирование антигена D является обязательным, а высокий полиморфизм антигена и различная иммуногенность его разновидностей диктуют необходимость дифференцированно подходить к резус-типированию крови доноров и больных, используя различные методические приемы. Лабораторное тестирование основано на применении реагентов, содержащих анти-D антитела иммунного или моноклонального происхождения.

Ген RHD имеет ряд аллельных вариантов с измененной первичной структурой, что выражается в ослаблении экспрессии антигена D на поверхности эритроцита, так называемом D^u фенотипе. Серологические методы зачастую

не позволяют однозначно определить резус-принадлежность в случае D^u, и это создает проблемы при подборе крови. В 1946 г. F Stratton ввел обозначение D^u для эритроцитов, которые реагировали с одними анти-D сыворотками и не реагировали с другими [19]. Впоследствии, когда анти-D реагенты стали изготавливаться из пулов иммунных сывороток, определение D^u изменилось: D^u стали называть антиген D, который можно выявить только с помощью чувствительных методов, таких, как антиглобулиновый тест (АГТ). Считается, что 0,2-1% белого населения несут мутантный аллель, а среди черного населения эта частота еще выше. Самый слабый тип Del, который дает отрицательный результат даже в АГТ (он может быть выявлен только в реакции адсорбции-элюции), распространен среди азиатского населения и составляет около трети всех серологически Rh-отрицательных лиц.

Возник вопрос, к какой группе относить лиц с D^u: к Rh-положительным или Rh-отрицательным. По сути этот вопрос подразделяется на два, относящихся к донорам и реципиентам: 1) являются ли эритроциты D^u иммуногенными, т.е. могут ли стимулировать первичный и вторичный анти-D иммунный ответ у Rh-отрицательных реципиентов; 2) какие последствия могут быть при переливании нормальных D⁺ эритроцитов реци-

пиентам с группой D^U? Те же вопросы актуальны и в акушерстве — будут ли D^U эритроциты новорожденного иммуногенны для Rh-отрицательной матери и, с другой стороны, может ли женщина с группой D^U быть иммунизирована в результате Rh-положительной беременности, и нужна ли в этой ситуации профилактика с помощью анти-D иммуноглобулина?

Со временем выяснилось, что сама группа D^U неоднородна. Было установлено, что антиген D может быть не просто слабо выраженным, но еще и неполным, лишенным части антигенных детерминант. У реципиента — носителя неполного D может развиваться иммунный ответ к отсутствующим детерминантам при переливании D⁺ эритроцитов. Такую разновидность D назвали Dpartial (D частичный), а для слабого D с неизменной



Рис. 1. Терминологическая классификация антигена D.

антигенной структурой стали использовать термин Dweak (D слабый) (рис. 1). Опираясь на знание генетической структуры Rh антигена и молекулярное клонирование D вариантов [5, 6], было обнаружено, что фенотип Dweak связан с аминокислотными заменами внутриклеточной и внутримембранной части RhD полипептида (рис. 2А и 2В), а фенотип Dpartial характеризуется мутациями в экстраклеточных петлях RhD молекулы (рис. 2Б). Несмотря на то, что описано множество аллелей Dweak, фенотипически все они проявляются сходным

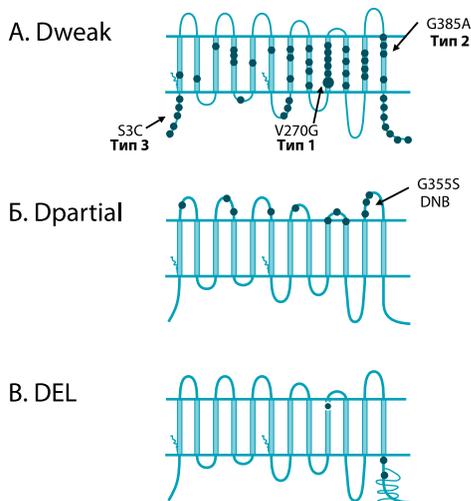


Рис. 2. Схематическое расположение молекулы антигена D в мембране эритроцита и локализация аминокислотных замен (обозначены точками) в различных типах DU (из Westhoff S.M., 2007 [24], с изменениями).

верхности эритроцита, хотя некоторые категории, среди которых наиболее известна D^{VI}, экспрессируются очень слабо. Таким образом, общим свойством Dweak и большинства типов Dpartial является сниженное число антигенных детерминант, способных взаимодействовать с антителами (50-5000 сайтов на эритроцит вместо обычных 15000-25000), что и приводит к существенному снижению силы реакции агглютинации. Важно отметить, что подавляющее большинство типов Dweak и категорий Dpartial ассоциированы с фенотипом D^UCcdee или D^UccEe [11]. Характеристики наиболее распространенных вариантов D^U представлены в табл. 1.

Существует мнение, что подразделение на Dweak и Dpartial является искусственным не только потому, что существуют промежуточные варианты, но и потому, что на практике Rh-принадлежность оценивается по серологическим характеристикам, а конкретный вариант может быть охарактеризован только на основе генотипирования [8]. В этой связи удобно использовать единый термин, обозначаю-

Основные варианты фенотипа D^U и их некоторые характеристики (по Daniels G. [7] с изменениями)

| Dweak | | | | Dpartial | | | |
|---------|--------------|--------------------------|-----------------------------|------------|--------------|--------------------------|-----------------------------|
| Тип | RhCE фенотип | Кол-во молекул на клетку | Иммунизация D+ эритроцитами | Категория | RhCE фенотип | Кол-во молекул на клетку | Иммунизация D+ эритроцитами |
| Тип 1 | Ce | 1285 | | II | Ce | 3200 | + |
| Тип 2 | cE | 489 | | IIIa | ce | 12300 | + |
| Тип 3 | Ce | 1932 | | IIIb | ce | | + |
| Тип 4 | ce | 2288 | | IIIc | Ce | 22300 | + |
| Тип 4.1 | | 3811 | | III тип IV | | 33255 | + |
| Тип 5 | cE | 296 | | IVa | ce | 9300 | + |
| Тип 6 | Ce | 1053 | | IVb | Ce, cE | 4000 | + |
| Тип 7 | Ce | 2407 | | IV тип III | Ce | 607 | |
| Тип 8 | Ce | 972 | | IV тип IV | Ce | | |
| Тип 9 | cE | 248 | | Va | ce, Ce | 9400 | + |
| Тип 10 | cE | 1186 | | VI тип I | cE | 300 | + |
| Тип 11 | ce | 183 | | VI тип II | Ce | 1600 | + |
| Тип 12 | Ce | 96 | | VI тип III | Ce | 14502 | |
| Тип 13 | Ce | 956 | | VII | Ce | 3600 | + |
| Тип 14 | cE | | | DAR | ce | | + |
| Тип 15 | cE | 297 | + | DBT тип I | Ce, ce | 4300 | + |
| Тип 16 | cE | 235 | | DBT тип II | Ce | | |
| Тип 17 | | 66 | | DCS | | | |
| Тип 18 | | | | DFR | Ce, cE | 5300 | + |
| Тип 21 | Ce | 5200 | | DFW | Ce | | |
| Тип 22 | | | | DHAR | ce | | + |
| | | | | DHK | | | |
| | | | | DHMI | cE | 2400 | + |
| | | | | DHO | Ce | 1300 | |
| | | | | DHR | cE | 3800 | |
| | | | | DIM | cE | 192 | |
| | | | | DMH | ce | | + |
| | | | | DNB | | | |
| | | | | DNU | Ce | 10000 | |
| | | | | DOL | ce | 4700 | + |

щий ослабление экспрессии. В западных публикациях преимущественно встречается наименование Dweak, в отечественной литературе — термин D^U. В тексте будут использоваться все три термина: Dweak и Dpartial, когда нужно различать эти группы, и D^U, если речь пойдет о фенотипически слабым D без выяснения его природы (например, в нормативных документах).

Широкое внедрение моноклональных реагентов изменило практику ре-зус-типирования крови. Поликлональ-

ные анти-D реагенты старого поколения изготавливались из сывороток иммунных доноров и содержали преимущественно неполные антитела. Моноклональные анти-D реагенты для рутинного типирования основаны на антителах класса IgM и предназначены для простых тестов: прямой агглютинации на плоскости или в пробирках. Несмотря на то, что в этом тесте могут быть выявлены некоторые варианты D^U, истинной пробой на D^U повсеместно принято считать АГТ с использованием анти-D реагента

на основе IgG антител. Следует учитывать, что разные моноклональные реагенты как IgM, так и IgG классов, обладают различным спектром взаимодействия с вариантами D^U, причем способность реагента выявлять наиболее сложный антиген D^{VI}, как правило, специально отмечается производителем.

Доноры с фенотипом Dweak и Dpartial

Правила определения Rh-принадлежности доноров диктуются клиническими и экспериментальными данными об иммуногенности различных типов антигена D. Известно, что сам антиген D обладает высокой степенью иммуногенности. Частота иммунизации D-отрицательных реципиентов зависит от дозы введенных D⁺ эритроцитов и составляет 15% после однократной инъекции 1 мл и 70% после введения 250 мл. Для вторичного иммунного ответа достаточно минимальной дозы антигена — около 0,03 мл [4]. В то же время иммуногенность D^U считалась очень низкой, поскольку в специальном проведенном эксперименте ни один из 45 D-отрицательных реципиентов не выработал анти-D антитела после трансфузии эритроцитов D^U [17]. Интерес к проблеме возобновился после ряда публикаций о случаях как первичного, так и вторичного анти-D иммунного ответа при переливании эритроцитов D^U, в том числе и Del [10, 14]. В настоящее время общепринято, что для установления Rh-принадлежности донорской крови надо проводить тест на наличие D^U. В связи с тем, что сейчас выпускается широкий спектр моноклональных анти-D диагностикумов, а также стали доступными генотипирование и детальная характеристика RHD аллелей, в литературе широко обсуждается вопрос, к какому разумному пределу чувствительности серологических методов надо стремиться, и есть ли необходимость в широком внедрении молекулярных методов в Rh-типирование [21]. В большинстве европейских стран считается обязатель-

ным проведение АГТ с эритроцитами, которые были отнесены к D⁻ при рутинном тестировании моноклональными реагентами на основе IgM. Количество D^U, выявленных только на этапе проведения АГТ, варьирует от 0,02% (в Испании) до 4,1% (в Германии) [21]. Этот процент зависит как от частоты встречаемости слабых вариантов в данной популяции, так и от используемых при тестировании реагентов и методов. В России все образцы донорской крови, показавшие отрицательный результат с Цоликлоном анти-D Супер (Цоликлоны — общепринятое наименование отечественных моноклональных реагентов) или другим реагентом на основе полных антител класса IgM, обязательно должны быть исследованы с моно- или поликлональным анти-D реагентом, содержащим неполные IgG антитела, с помощью желатинового метода, экспресс-метода в пробирках с 33% полиглюкином, агглютинацией в геле или АГТ [3]. Российские нормативные документы не обязывают проводить АГТ, но рекомендуют использовать его в сомнительных случаях. Поликлональные реагенты, изготовленные из иммунных сывороток, изначально содержат смесь IgG антител, которые распознают все эпитопа антигена D. МКА направлены к отдельным эпитопам и поэтому не способны реагировать с теми аберрантными категориями D, которые утратили данный эпитоп. Выходом из такой ситуации является приготовление не моно-, а олигклональных реагентов, включающих несколько МКА против разных эпитопов (в табл. 2 представлен состав отечественного реагента — Цоликлона анти-D). Производители моноклональных реагентов часто указывают, обладает ли МКА способностью определять DVI, который является наиболее трудно распознаваемой категорией D.

Помимо теста на D^U, все D⁻ образцы крови доноров обязательно должны исследоваться на наличие антигенов C и E. Такая традиционно принятая в нашей стране тактика имеет большой

смысл: поскольку подавляющее число слабых вариантов антигена D ассоциированы с экспрессией C или E антигенов (табл. 1), из контингента Rh-отрицательных доноров при этом будут исключаться те, у кого D^U был пропущен. Т.о., истинно Rh-отрицательными считаются только доноры ddсsee, тестированные на присутствие антигена DU.

Реципиенты и беременные женщины с фенотипами Dweak и Dpartial

Принято считать, что обладатели антигена Dweak с ненарушенной антигенной структурой не вырабатывают анти-D в ответ на D⁺ эритроциты, попавшие в кровотоки в результате трансфузии или родов. Наиболее часто среди белого населения встречаются Dweak типа 1, 2 и 3; иммунизации таких реципиентов при трансфузиях D⁺ эритроцитов в практике никогда не наблюдалось. Напротив, носители Dpartial могут выработать антитела против антигенных детерминант, отсутствующих на их собственном антигене D. Эти данные диктуют тактику определения Rh-принадлежности реципиентов и беременных женщин: носителей Dweak можно отнести к Rh-положительным и переливать им Rh-положительную кровь, а Dweak роженицам не следует вводить анти-D иммуноглобулин после рождения D⁺ ребенка [8]. Напротив, лица с Dpartial должны считаться Rh-отрицательными. Они нуждаются в D-отрицательных эритроцитах при трансфузии, а женщинам Dpartial показана профилактика сенсibilизации. Эта теоретически ясная стратегия сталкивается на практике с серьезным препятствием, а именно: как различить Dweak и Dpartial, которые серологически проявляются сходным образом как ослабление реакции агглютинации. Даже применение панели МКА с охарактеризованной эпитопной специфичностью не позволяет отличить некоторые Dpartial и Dweak [9]. К тому же, ввиду нехватки статистических данных, нельзя исключить, что носители некото-

рых редких типов Dweak способны вырабатывать анти-D антитела (например, Dweak типа 15, табл. 1). Другими словами, надо ли добиваться высокой чувствительности для выявления всех слабых вариантов D при тестировании крови больных, какие реагенты и какие методики выбрать?

В настоящее время нормативные документы различных стран дают разные рекомендации относительно установления группы Rh у реципиентов, а серологи применяют различные стратегии при подборе крови [21]. Действующая Инструкция по определению Rh-принадлежности крови, утвержденная Приказом №2 Минздрава РФ от 09.01.1998 [1], обязывает в случае обнаружения слабой разновидности антигена D, который дает «слабую или сомнительную агглютинацию» со всеми сериями реагентов, содержащих IgG антитела, и отрицательную реакцию с IgM антителами, считать кровь больного и беременной женщины Rh-отрицательной. Т.о., при определении Rh-принадлежности больных Инструкция рекомендует руководствоваться результатом, который получен с применением реагента на основе IgM антител. Действительно, тестирование крови поликлональным реагентом является не чем иным, как пробой на D^U, которая не рекомендована при исследовании реципиентов и беременных [3]. Это мотивировано тем, что применение чувствительных методик может выявить все слабые формы D, в том числе D^{VI}, и большой будет отнесен к Rh-положительным, в то время как ему показано переливание Rh-отрицательных эритроцитов. Беременных с D^{VI} также принято относить к Rh-отрицательным и проводить им профилактику сенсibilизации, т.е. введение анти-D иммуноглобулина. На практике проблема тестирования крови реципиентов и беременных решается использованием реагента, который не реагирует с D^{VI}. В настоящее время подавляющее число определений Rh-принадлежности

больных проводится в реакции прямой агглютинации на плоскости с использованием реагентов на основе МКА IgM; использование только IgM-содержащих реагентов при тестировании крови реципиентов является правилом в большинстве европейских стран [16]. При этом выявление различных вариантов антигена D зависит от свойств МКА [15] и метода исследования, и потому расхождения между результатами тестирования таких редких образцов в различных лабораториях неизбежны [13].

В литературе встречаются рекомендации более тщательно тестировать кровь реципиентов с сомнительной или слабой реакцией, определять у них С и Е антигены, чтобы косвенно подтвердить наличие Dweak (типы 1, 2 и 3 ассоциированы с одновременной экспрессией С или Е антигенов), и даже проводить молекулярное тестирование [11]. Такой подход объясняется экономией Rh-отрицательной крови в тех случаях, когда пациенту с фенотипом D^U можно безопасно переливать D⁺ эритроциты. В рекомендациях французских трансфузиологов предлагается гибкий подход в отношении различных категорий D^U реципиентов: фенотип D^Ucsee следует рассматривать как Rh-отрицательный, для пациентов с D^U, но с С+ или Е+ решение должно зависеть от пола

и возраста больного — мужчины и женщины старше 50 лет могут получать D⁺ эритроциты, а девочкам и молодым женщинам следует переливать D⁻ кровь, если нет возможности подтвердить, что D^U относится к типам 1-3 [16]. Аналогичны рекомендации Стандартов службы крови США за исключением типирования новорожденных от Rh-отрицательных матерей, когда решается вопрос о проведении профилактики Rh-сенсбилизации [18, 20]. Т.о., рутинное Rh-типирование крови реципиентов можно ограничить использованием реагентов на основе IgM антител. Однако следует более внимательно относиться к подбору крови для девочек и женщин детородного возраста, поскольку их иммунизация грозит в дальнейшем развитием гемолитической болезни плода. Следует также помнить, что Rh-отрицательная кровь (ddcsee) не является решением проблемы во всех сомнительных случаях, поскольку иммунизация женщины против антигена «с» (например, если пациентке с фенотипом эритроцитов D^UCCee перелить кровь ddcsee) может также быть причиной тяжелой гемолитической болезни новорожденных.

Учитывая все сказанное, мы считаем, что следует выделить три группы лиц, нуждающихся в дополнительных тестах поим-

Таблица 2

Эпитопная специфичность МКА анти-D, входящих в состав отечественных препаратов

| Эритроцет-Цоликлон | Наименование МКА | Код на Workshop III | Реагирование с категориями антигена D | | | | | | | | Эпитоп**** |
|--------------------|------------------|---------------------|---------------------------------------|-------|------|----|-------|------|-------|------|------------|
| | | | II* | III** | IV** | V* | VI*** | VII* | DIM** | DFR* | |
| Анти-D | D89/47 (IgG) | 1-29 | + | ± | + | - | - | ± | ± | - | 6.2 |
| | D90/7 (IgG) | 1-31 | + | ± | - | - | ± | ± | + | - | 6.3 |
| | D90/17 (IgG) | 1-32 | + | + | + | - | - | ± | ± | - | 6.3 |
| | D90/12 (IgG) | 1-33 | + | + | + | - | - | ± | - | - | 6.7 |
| Анти-D Супер | HM-92 (IgM) | 1-34 | + | + | + | - | - | ± | - | - | 6.4 |

* По материалам 3-го Рабочего совещания по антигенам групп крови, г. Нант, 1996 г. (Workshop III); ** [23]; *** [22]; **** [5].

МКА HM-92 класса IgM способны выявлять большинство типов D^U в реакции агглютинации на плоскости или в пробирках, однако не реагирует с рядом Dpartial: D^Ub, D^Uv и теми типами D^U, при которых число антигенных детерминант на клетке ниже 500 [23]. Комбинация различных МКА класса IgG, обладающих разной серологической специфичностью, позволяет создать препарат, который реагирует со многими типами D^U, включая большинство Dpartial.

мо реакции с Цоликлоном анти-D-Супер (или аналогичными IgM-содержащими реагентами): 1) Rh-отрицательным новорожденным от Rh-отрицательных женщин следует проводить тест на наличие D^U для принятия решения о введении матери анти-D иммуноглобулина, учитывая, что в данной ситуации новорожденный с группой D^U считается Rh-положительным; 2) девочкам и женщинам детородного возраста следует подбирать кровь, совместимую не только по D, но и по другим трансфузионно значимым антигенам системы Rh: C, c, E, e. Определение этих антигенов с помощью Цоликлонов в реакции агглютинации на плоскости не является трудоемким и сложным, а невысокие затраты окупятся предотвращением тяжелой патологии плода. Если больному с антителами можно подобрать кровь, то для женщины с иммунным ответом нормальное вынашивание беременности становится невозможным, если эритроциты плода несут антиген, против которого иммунизирована беременная. 3) Та же стратегия, что в пункте 2, должна применяться и к подбору крови для пациентов, нуждающихся в регулярных трансфузиях.

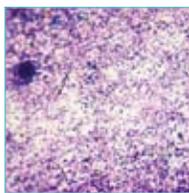
Остается вопрос о том, какая тактика должна быть выбрана, если эритроциты больного дают слабую реакцию с Цоликлоном анти-D Супер? Учитывая спектр взаимодействия Цоликлона анти-D Супер с различными вариантами D^U, все образцы, показавшие положительную реакцию (от четкого + до 4+ по общепринятой шкале оценок) на плоскости в течение времени наблюдения, указанного в инструкции к реагенту, следует относить к Rh-положительным. При сомнительном результате следует провести исследование на D^U и присутствие антигенов C или E. В случае положительного результата (D^U+, C+

или E+) пациента можно считать Rh-положительным и переливать ему D⁺ эритроциты, экономя таким образом более дефицитную D⁻ кровь. При фенотипе D^Uссее пациенту следует переливать Rh-отрицательную кровь.

Правила определения Rh-принадлежности доноров просты и однозначны: наличие антигена D в его любом варианте обязывает причислить донора к резус-положительным. Менее определенной выглядит ситуация с реципиентами, поскольку и сама трактовка силы реакции, и принятие решения достаточно субъективны. Как показал опрос трансфузиологов в госпиталях США, нет четкого и однозначного понимания, какие проводить тесты и какую кровь переливать пациентам D^U: часть врачей проводит АГТ, другие его не проводят, кто-то всем пациентам D^U переливает D⁻ кровь, некоторые учитывают возраст и пол больного [12]. В отечественной литературе, к сожалению, нет таких данных, однако не приходится сомневаться, что повсеместно положение с трактовкой D^U сходное. Мы надеемся, что сформулированные здесь правила проведения тестов и тактика подбора крови позволят специалистам клинической лабораторной диагностики и трансфузиологам с более глубоким пониманием относиться к этим процедурам, а значит свести до минимума вероятность Rh-сенсibilизации больного. Вдобавок к этому, действующий в нашей стране запрет на переливание Kell-положительной крови исключает сенсibilизацию еще одним высокоиммуногенным групповым антигеном [2]. Все это, взятое вместе с высоким качеством современных типизирующих реагентов, внушает надежду, что переливание крови становится более безопасной процедурой для больного и более ясной и стандартной технологией для врача.

Список литературы:

1. Приказ №2 Министра Здравоохранения РФ от 09 января 1998 г. «Об утверждении инструкций по иммуносерологии» в сб. Иммуносерология (Нормативные документы). МЗ РФ, ГНЦ РАМН, Москва, 1998, стр. 85.
2. Приказ №363 МЗ РФ от 25 ноября 2002 г. «Об утверждении инструкции по применению компонентов крови», МЗ РФ, Москва, 2002.
3. Требования к проведению иммуногематологических исследований доноров и реципиентов на СПК и в ЛПУ. Методические указания №2001/109. МЗ РФ, НИИ гематологии и трансфузиологии, Санкт-Петербург, 2002.
4. Bowman JM The prevention of Rh immunization//Transfus. Med. Rev. 1988, V.2 (3): 129-150.
5. Cartron JP, Bailly P, Le Van Kim C, Cherif-Zahar B, Matassi G, Bertrand O, Colin Y Insights into the structure and function of membrane polypeptides carrying blood group antigens. Vox Sang. 1998; 74 Suppl 2: 29-64.
6. Chérif-Zahar B, Bloy C., Le Van Kim C., Blanchard D., Bailly P, Hermand P, Salmon C., Cartron J.P., Colin Y.. Molecular cloning and protein structure of a human blood group Rh polypeptide//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990, V. 87 (16): 6243-6247
7. Daniels G Human Blood Groups, 2nd Ed., 2002, Blackwell Scientific Ltd.
8. Daniels G., Poole G., Poole J Partial D and weak D: can they be distinguished?//Transfus. Med. 2007 V.17 (2): 145-146.
9. Denomme G. A., Dake L. R., Vilensky D., Ramyar L., Judd W.J. Rh discrepancies caused by variable reactivity of partial and weak D types with different serologic techniques// Transfusion, 2008, V.48 (3): 473-478.
10. Flegel W.A. Homing in on D antigen immunogenicity//Transfusion, 2005, V.45 (4): 466-468.
11. Flegel W.A. How I manage donors and patients with a weak D phenotype//Curr. Opin. Hematol., 2006, V.13 (6): 476-483.
12. Garratty G Do we need to be more concerned about weak D antigens?//Transfusion, 2005, V.45 (10): 1547-1551.
13. Judd W.J., Moulds M., Schlanser G Reactivity of FDA-approved anti-D reagents with partial D red blood cells//Immunohematology, 2005, V.21 (4): 146-148.
14. Kumpel B Are weak D RBCs really immunogenic?//Transfusion, 2006, V.46 (6): 1061-1062;
15. Lai M., Grasso C., Boschi I., D'Onofrio G., Pascali V., Leone G Characterization of anti-D monoclonal antibody reagents based on their reactivity with the weak D phenotype//Transfusion. 2009, V.49 (5): 937-942.
16. Noizat-Pirenne F, Verdier M., Lejealle A., Mercadier A., Bonin P, Peltier-Pujol F, Fialaire-Legendre A., Tournamille C., Bierling P, Ansart-Pirenne H Weak D phenotypes and transfusion safety: where do we stand in daily practice?//Transfusion, 2007, V.47 (9): 1616-1620.
17. Schmidt PJ, Morrison EC, Shohl J The antigenicity of the Rho (DU) blood factor.//Blood 1962; V 20: 196-202.
18. Serologic Problem-Solving: A Systematic Approach for Improved Practice//Ed. Rudmann S. V. AABB Press, Bethesda, 2005.
19. Stratton F New Rh alleomorph//Nature, 1946, V. 158: 25-28
20. Technical Manual, 16-th edition//Ed. Roback J.D., Combs M.R., Grossman B.J., Hillier C.D. American Association of Blood Banks, Bethesda, 2008. P.394-399, 448.
21. Testing for weak D International Forum//Vox Sang., 2006, V.90 (2): 140-153.
22. Wagner F.F., Gassner C., Müller T.H., Schönitzer D., Schunter F., Flegel W.A., Three Molecular Structures Cause Rhesus D Category VI Phenotypes With Distinct Immunohematologic Features 1998, Blood, V.91 (6): 2157-2168
23. Wagner F.F., Frohmajer A., Ladewig B., Eicher N.I., Lonicer C.B., Müller T.H., Siegel M.H., Flegel W.A. Weak D alleles express distinct phenotypes//Blood, 2000, V.95 (8): 2699-2708.
24. Westhoff C.M. The Structure and Function of the Rh Antigen Complex//Semin. Hematol., 2007 V.44 (1): 42-50



ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЖЕНСКИХ ПОЛОВЫХ ОРГАНОВ: ОПТИМАЛЬНЫЙ ПОДБОР ТЕСТОВ

Селиванов Е. В.

Обсудить обозначенную в заголовке проблему нас подтолкнули многочисленные клинические ситуации и откровенные ошибки в диагностической тактике при выборе списка патогенов на ПЦР-исследования.

Итак, типичная ситуация на приеме: женщина репродуктивного возраста, ведущая активную половую жизнь, жалуется на умеренные выделения из влагалища и т. п. В мазке выявлен лейкоцитоз. Понятно, что речь идет о воспалительном процессе. Остается выявить с помощью лаборатории топик процесса, идентифицировать возбудителя, вызвавшего воспалительную реакцию, и оценить состояние микрофлоры.

В настоящее время для оценки состояния микрофлоры используют традиционные методы лабораторной диагностики:

- а) микроскопическое исследование:
 - исследование нативного препарата в темном поле (крайне редко встречается в клинической практике);
 - микроскопия препаратов, окрашенных по Граму (мазок на степень чистоты);
- б) культуральное исследование:
 - посевы на питательные среды для идентификации аэробных микроорганизмов;
 - посевы на селективные питательные среды для выращивания анаэробных микроорганиз-

мов (практически не встречается в реальной практике);

- в) ПЦР — полимеразная цепная реакция.

Тут то перед врачом и встает не легкий выбор: какую из доступных лабораторных методик предпочесть? Очень часто выбор склоняется в сторону ПЦР-исследований (есть быстрая и точная этиологическая диагностика, нет проблемы выживаемости микроорганизмов в процессе доставки в бактериологическую лабораторию). Полимеразная цепная реакция позволяет выявить с высокой надежностью возбудителей ИППП (т. е. абсолютных патогенов), и в какой-то степени определить превышение концентрации условно-патогенных микроорганизмов выше определенного порога без определения их количественной характеристики.

Некорректно поставленный топический и/или этиологический диагноз неизбежно приводит к полипрагмазии или к неадекватной терапии (недостаточные суточные и/или курсовые дозы лекарственных препаратов), в результате чего увеличивается риск рецидивов, приводящих к хронизации инфекционно-воспалительного процесса.

Регулярно встречаясь с врачами-клиницистами, мы постоянно выслушиваем один и тот же вопрос: как же так, у женщины есть весь клинический симптомокомплекс воспаления (о нем мы упомянули выше), а при ПЦР-исследовании возбудители не найдены?

Чтобы ответить на этот вопрос, мы проанализировали структуру назначений на ПЦР-исследования, поступивших в нашу лабораторию с октября 2009 по октябрь 2010 гг. (рис. 1).

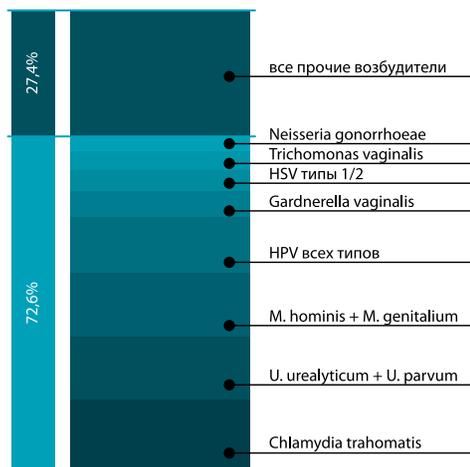


Рис. 1. Структура ПЦР-исследований МЦ «Лаборатория ДНК-Диагностики» (собственные данные).

72,6% — такой оказалась доля восьми наиболее часто назначаемых возбудителей, из них: **хламидии** — 15,6%, **уреаплазмы** (сумма *Ur. urealyticum* и *Ur. parvum*) — 13,7%, **микоплазмы** (сумма *M. genitalium* и *M. hominis*) — 13,8%, **вирус папилломы человека** (сумма всех исследований на ВПЧ: скрининг, ВПЧ 6/11, 31/33, 16/18 типов, типирование ВПЧ) — 12,2%, **гарднереллы** — 5,3%; **вирус простого герпеса 1/2 типов** — 4,8%, **трихомонада** — 4,3%, **гонококк** — 2,9%.

Немедленно возникает встречный вопрос: какой именно результат ожидался при назначении этих исследований? Дело в том, что перечисленные возбудители, как правило, не вызывают описанного симптомокомплекса с белями и лейкоцитозом. Да, при бактериальном вагинозе могут быть и эти возбудители, и подобные выделения, но воспалительная картина обычно отсутствует. При назначении лабораторных исследований врач-клиницист должен помнить, что воспалительные заболевания женских половых органов чаще всего вызваны

условно-патогенной флорой и гораздо реже — специфическими микроорганизмами типа трихомонады и гонококка. Так, по данным Е. В. Уткина и В. А. Кулавского (2006), этиологическая структура воспалительных заболеваний органов малого таза в современных условиях имеет смешанный характер. Наиболее часто (52%) обнаруживаются ассоциации, включающие от 3 до 7 условно-патогенных микроорганизмов. При этом в числе ассоциаций в 18,7% случаев определяются энтеробактерии (кишечная палочка), в 16,6% — энтерококк и стрептококки, в 10,1% — коринебактерии, в 9,35% — уреаплазмы, в 6% — облигатные анаэробы и в 1,9% — генитальная микоплазма. Остается значительная роль хламидийной инфекции (по разным данным, 8-18%). В последнее десятилетие уменьшилось число случаев обнаружения гонококков (с 9,4 до 5,5%).

К сожалению, микроскопия с окраской по Граму слабо помогает в диагностике этиологических причин воспаления. С помощью данного метода можно идентифицировать 8 морфотипов микроорганизмов (некоторые авторы выделяют до 10), да и то в умелых руках:

- лактобактерии *Lactobacillus* spp.;
- гарднерелла (*Gardnerella vaginalis*) по выявлению «ключевых» клеток;
- мобилункус (*Mobiluncus* spp.);
- лептотрикс (*Leptotrichia* spp.);
- грамотрицательные кокки (*Neisseria* spp., *Veillonella* spp.);
- дрожжеподобные грибы (*Candida* spp.);
- грамположительные кокки (энтерококк, стафилококки, стрептококки и др.)
- колиформные (грамотрицательные) палочки.

Значительное число этиологически значимых возбудителей практически невозможно выявить при световой микроскопии, в их числе *Atopobium vaginae*, *Mycoplasma genitalium*, *Chlamydia trachomatis*. Существенными недостатками микроскопии являются также субъекти-

визм и зависимость результата исследования от профессиональной квалификации врача клинической лабораторной диагностики.

Мало помогает в этой ситуации и «золотой стандарт» этиологической диагностики — культуральный метод. К сожалению, условно-патогенная биота влагалища и цервикального канала, являющаяся причиной ряда патологических процессов в организме, состоит главным образом из анаэробных микроорганизмов, для культивирования которых требуются высококачественные селективные питательные среды и создание анаэробных условий. В связи с этим результат лабораторного исследования в значительной степени зависит от оснащенности бактериологической лаборатории необходимым лабораторным оборудованием и реагентами, а также от квалификации исследователя.

Хорошо растущие микроорганизмы требуют для идентификации длительных сроков культивирования (в среднем 7 дней) и необходимость сохранения жизнеспособности микроорганизмов до момента поступления биоматериала в лабораторию. Кроме того, ряд этиологически значимых микроорганизмов относится к труднокультивируемым, что не позволяет верифицировать диагноз на основании результатов культурального исследования и свидетельствует о необходимости разработки и внедрения в практическое здравоохранение новых скрининговых диагностических подходов для их своевременного выявления. В таких условиях, безусловно, выбор врача — ПЦР-методы, лишённые указанных недостатков. Остается выбрать — что же назначать при диагностике воспалительных заболеваний женской половой сферы?

Наша лаборатория предлагает два пути для решения таких задач:

1. **Комплекс «Фемофлор»**, разработанный российской компанией «ДНК-Технология» для диагностики дисбиоза влагалища. Комплекс

наиболее удобен со всех точек зрения при диагностике бактериального вагиноза, однако дает достаточно диагностической информации и при воспалительных заболеваниях. Отдельно об этом исследовании мы поговорим в следующих публикациях, при обсуждении проблемы диагностики бактериального вагиноза.

2. **Набор ПЦР исследований с обязательным выявлением условно-патогенных микроорганизмов по выбору врача:** мобилункус, бактериоиды, энтерококк (фекальный стрептококк, *E. faecalis*), стрептококк (*Str. pyogenes* и *Str. agalactiae*, а также выявление суммы бактерий рода *Streptococcus*), атопобиум (*A. vaginae*), энтеробактер (*Enterobacter spp.*), кишечная палочка (*E. coli*), протей (*Proteus spp.*), синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*), золотистый стафилококк (*St. aureus*).
3. **ПЦР выявление условно-патогенной флоры в виде готовых комплексов:** ПЦР комплекс «Условно-патогенная флора полный» (кишечная палочка, энтеробактер, энтерококк, протей, стрептококки, золотистый стафилококк, кандиды, серрация, синегнойная палочка); ПЦР комплекс «Условно-патогенная флора стандартный» (кишечная палочка, энтерококк, протей, стрептококки, золотистый стафилококк); комплекс «Женское здоровье» (трихомонада, гонококк, хламидия, генитальная микоплазма, кандиды, лактобактерии, гарднерелла, бактериоиды, атопобиум, кишечная палочка, энтерококк, стрептококки, золотистый стафилококк, протей, скрининг ВПЧ).

Следующий важный вопрос в таких ситуациях — откуда брать материал? Обратимся к большому исследованию роли условно-патогенной флоры в воспали-

тельных заболеваниях, проведенному в КВД № 19 г. Москвы.

Условно-патогенные микроорганизмы были выявлены у 67,5 % всех обратившихся пациентов. При этом топически поражения располагались следующим образом: у 32,5% воспалительный процесс не выявлен ни в одном отделе; у 42,3% — сочетанное поражение ЦК и влагалища; у 25,2% — поражение только ЦК без поражения влагалища (рис. 2).

каждого отдела урогенитального тракта — влагалища, цервикального канала, уретры, но в реальных условиях это мало применимо.

Таким образом, чтобы клинициста не мучил вопрос, почему у женщины есть симптомы воспаления, а привычные ПЦР-анализы не дают положительного результата, мы настоятельно рекомендуем пересмотреть обычно назначаемый набор ПЦР исследований (например, от-

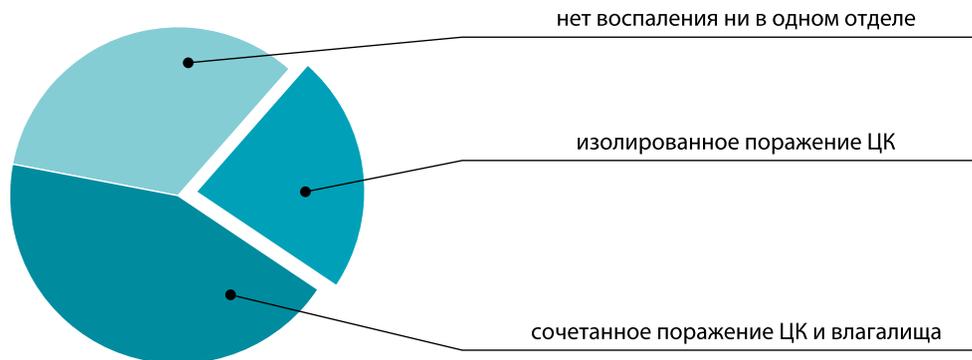
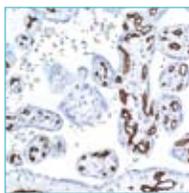


Рис. 2. Диагностические находки в зависимости от локализации взятия биологического материала.

Как видно, взятие материала из ЦК в 100% случаев позволяет выявить причину воспалительных поражений, не занимаясь вопросами возможного дисбиоза влагалища. Конечно, оптимальным решением будет раздельное исследование

казаться в таких ситуациях от выявления уреоплазм и микоплазмы хоминис) и обратить пристальное внимание на тесты, позволяющие диагностировать воспалительные заболевания, вызванные условно-патогенной флорой.



СОВРЕМЕННАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ПЛАЦЕНТАРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ



*Изитова М. Б.,
доктор медицинских наук, Ал-
тайский государственный меди-
цинский университет*

К началу XXI века перинатальная медицина стала основой улучшения здоровья будущих поколений во многих странах мира. В настоящее время завершен переход от стремления снизить перинатальную смертность к более приоритетной цели — улучшить здоровье новорожденных, однако проблема предотвращения неблагоприятных перинатальных исходов продолжает оставаться актуальной. Рождение здорового потомства является главной клинической задачей акушерской практики, и залогом ее максимальной реализации выступает не столько умение своевременно выявить нарушения жизнедеятельности плода, сколько возможность предсказать их возникновение, разработать и внедрить высокоэффективные превентивные технологии, опирающиеся на понимание патогенетических механизмов формирования неблагоприятных исходов беременности для плода. В настоящее время более 70% случаев перинатальной смертности, заболеваемости новорожденных и последующей инвалидизации детей является следствием постгипоксических нарушений, развивающихся на фоне **плацентарной недостаточности** — патофизиологического феномена комплексного нарушения перфузионной, трофической, эндокринной и метаболической функций плаценты. Данное осложнение характеризуется морфо-функциональными из-

менениями в плаценте, среди которых в настоящее время наибольшее значение придается нарушению процесса формирования ворсинчатого дерева вследствие снижения синтеза проангиогенных факторов роста, в результате чего утрачивается способность плаценты к обеспечению адекватного обмена между организмами матери и плода.

Биологическое значение фактора роста плаценты

Высокий уровень сложности организма человека обеспечивается продолжительной беременностью, увеличением относительных размеров плаценты и площади контакта между фетальной и материнской циркуляцией за счет сложной ворсинчатой структуры хориальной ткани. Такая система требует изолированного усиления кровотока в плацентарном ложе в результате ремоделирования маточных спиральных артерий — процесса, происходящего с первых недель беременности. Ключевыми моментами в процессе морфофункционального становления плаценты являются две волны инвазии вневорсинчатого цитотрофобласта, приводящие к формированию адекватного ангиогенеза с перестройкой и раскрытием просвета спиральных артерий эндометрия и образованием уникальной маточно-плацентарной гемодинамической системы.

Гестационное моделирование спиральных артерий заключается в потере мышечно-эластической оболочки и превращении их в сосуды большой емкости с низкой резистентностью, что обеспечивает массивный маточный кровоток.

Этот процесс начинается с интерстициальной инвазии трофобласта и продолжается в виде эндovasкулярной миграции, состоящей из двух этапов.

Время начала первой волны эндovasкулярной миграции цитотрофобласта в эндометриальные (децидуальные) сегменты спиральных артерий точно неизвестно, но ее признаки обнаруживаются на 8-10 неделе беременности. После некоторого спада активности, на 15-18 неделях гестации начинается вторая волна инвазии, захватывающая миометральные сосудистые сегменты с трансформацией их в маточно-плацентарные артерии. Этот процесс происходит при участии механизмов транскрипции различных молекулярных факторов, в том числе факторов роста. Изучению клеточно-молекулярных диалогов, происходящих в это время в тканях эндометрия и формирующейся плаценты, в последнее десятилетие уделяется большое внимание.

Ключевыми событиями в становлении маточно-плацентарного кровотока является васкулогенез (образование сосудов из ангиобластов) и ангиогенез (образование новых сосудов из уже существующих). Формирование капилляров *de novo* в первичных ворсинах хориона начинается с 21 дня после оплодотворения и определяется синтезом местных факторов роста — стимуляторов ангиогенеза. Факторы роста являются биологически активными соединениями, стимулирующими или ингибирующими деление и дифференцировку различных клеток. Одним из них является фактор роста плаценты (PlGF) — гомодимерный гликопротеин, относящийся к семейству сосудисто-эндотелиальных факторов роста. В первом триместре беременности большое количество ростовых протеинов обнаружено в клетках вневорсинчатого цитотрофобласта и эндотелии сосудов хориона, то есть как сосудистый эндотелий, так и клетки цитотрофобласта являются мишенями для действия фактора роста плаценты. Следовательно,

пролиферация, миграция и инвазия клеток трофобласта регулируются местными факторами роста, а ростовые факторы, в свою очередь, являются не только стимуляторами ангиогенеза, но и регулируют инвазию, дифференцировку и метаболическую активность трофобласта в период плацентации. Установлено, что стимуляция экспрессии фактора роста плаценты происходит в условиях повышенного содержания кислорода, а **снижение его продукции — в условиях гипоксии**. Таким образом, процессы формирования, роста и развития плаценты находятся в прямой зависимости от экспрессии фактора роста плаценты. Являясь стимулятором ангиогенеза, данный проангиогенный фактор контролирует морфо-функциональное становление маточно-плацентарной сосудистой сети и обеспечивает полноценное развитие плаценты, что определяет прогностическое значение определения его концентрации в качестве раннего маркера плацентарной недостаточности.

Метод определения концентрации фактора роста плаценты: иммуноферментный анализ с использованием стандартных наборов производства «R&D Systems» (Великобритания).

Материал для исследования: венозная кровь беременной.

Оптимальные сроки для обследования: 28-32 недели гестации.

Концентрация фактора роста плаценты при физиологической беременности

Многочисленными исследованиями установлено, что у женщин с физиологической беременностью продукция фактора роста плаценты прогрессивно нарастает в период анатомического и функционального становления плаценты и достигает максимума к 29-31 неделе беременности. Средние значения концентрации составляют (собственные данные):

— 9-14 недель: $43,5 \pm 4,9$ пг/мл;

— 15-20 недель: $170,1 \pm 25,7$ пг/мл;

- 21-26 недель: $436,0 \pm 53,1$ пг/мл;
- 27-31 недели: $554,7 \pm 77,0$ пг/мл (максимальное значение);
- 32-35 недель: $447,9 \pm 39,9$ пг/мл.

Максимальная скорость количественного прироста концентрации PIGF (более чем в 3 раза), отражающая процессы роста плаценты и увеличение объема плацентарного кровообращения, регистрируется во II триместре.

Диагностика плацентарной недостаточности

Установлена четкая сопряженность сывороточной концентрации фактора роста плаценты с перинатальными исходами (рис.1).

У пациенток с гестационными осложнениями, беременность которых завершилась рождением здоровых детей, существенные различия с физиологической беременностью в показателях концентрации фактора роста плаценты отсутствовали. В то же время у женщин с неблагоприятными перинатальными исходами выявлено снижение экспрессии PIGF уже в процессе формирования плаценты, которое сохранялось и прогрессировало на протяжении всей беременности, а максимальные значения показателя даже не достигали уровня, характерного для женщин с физиологической беременностью в сроки 21-26 недель. Этот факт указывает на нарушение процессов плацентарного ангиогенеза и, следовательно, неполноценность ее компенсаторных возможностей. Более того, существенные различия в концентрации маркера у беременных данной группы отмечались в сравнении не только с показателями у женщин, имевших физиологическое течение беременности, но и с уровнем фактора роста плаценты у пациенток с гестационными осложнениями, беременность которых завершилась рождением здоровых детей.

Детальное изучение сывороточной концентрации фактора роста плаценты у женщин с различными вариантами не-

благоприятного перинатального исхода (рис. 2) в сравнении с показателями женщин, родивших здоровых доношенных детей, показало однонаправленность изменений в количественном содержании PIGF вне зависимости от варианта перинатальных осложнений.

Полученные результаты свидетельствуют об общности патогенетических механизмов, лежащих в основе всех представленных вариантов перинатальных осложнений и возможности своевременной верификации плацентарной недостаточности посредством определения сывороточной концентрации фактора роста плаценты.

Таким образом, фактор роста плаценты является наиболее информативным предиктором неблагоприятных перинатальных исходов.

Прогностическое и диагностическое значение определения фактора роста плаценты

Поскольку наиболее существенные различия в концентрации маркера выявлялись в начале III триместра беременности, мы произвели расчет клинической информативности теста с позиций клинической эпидемиологии. Диагностический порог теста в 28-32 недели беременности составил $\leq 350,0$ пг/мл. Снижение сывороточной концентрации фактора роста плаценты ниже диагностического порога является объективным критерием развития плацентарной недостаточности и значительного увеличения риска неблагоприятного перинатального исхода (в 3,7 раза).

В случае снижения показателя ниже $350,0$ пг/мл для оптимизации перинатальных исходов целесообразно запланировать программированное родоразрешение или плановое кесарево сечение.

Заключение

Своевременная диагностика плацентарной недостаточности может осуществляться с применением мо-

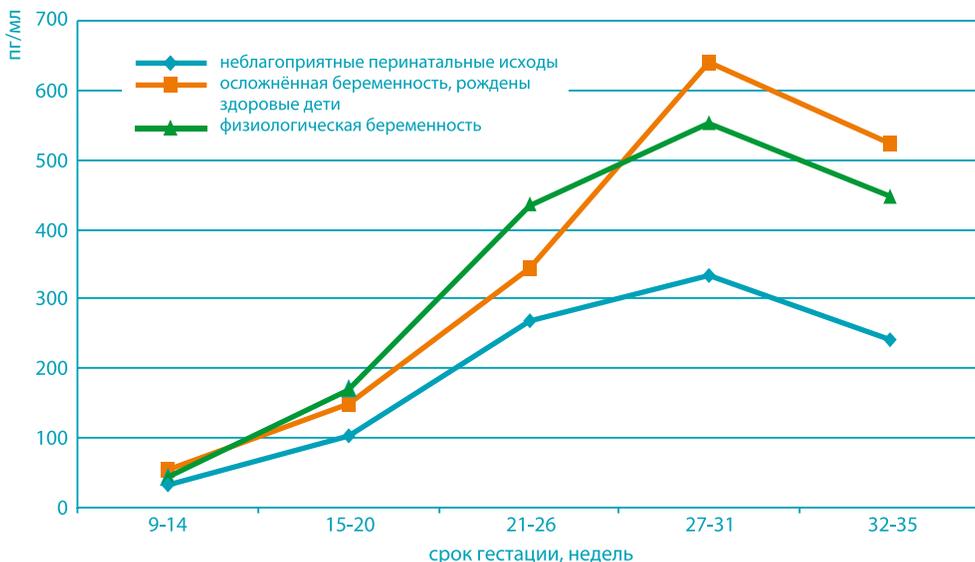


Рис. 1. Содержание фактора роста плаценты в сыворотке крови при физиологической и осложненной беременности, пг/мл.

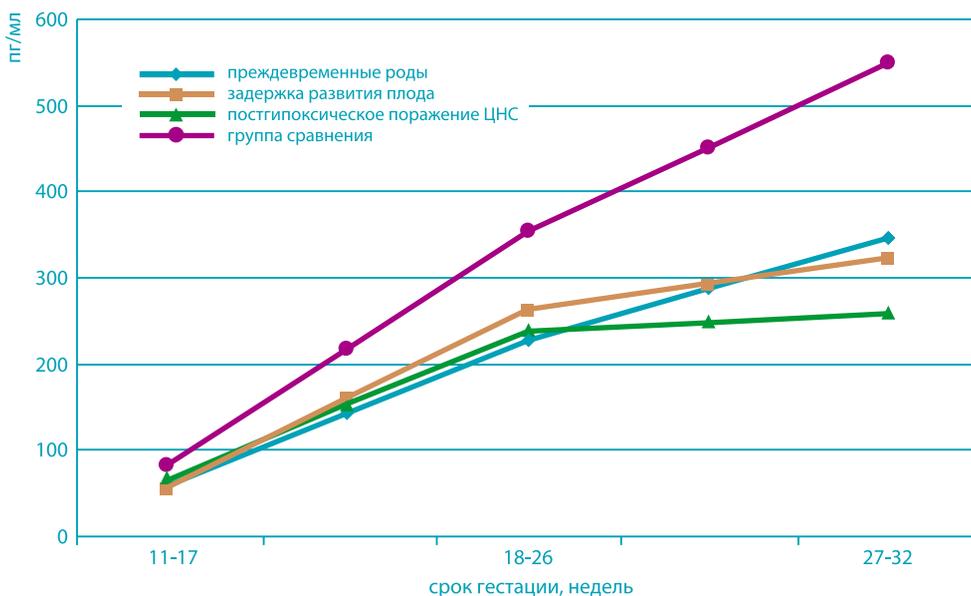


Рис. 2. Уровень фактора роста плаценты в сыворотке крови у пациенток с неблагоприятными перинатальными исходами (пг/мл).

нитинга маркера клеточной пролиферации — фактора роста плаценты.

Поскольку фактор роста плаценты характеризует начальные признаки патологических изменений, формирующихся в фето-плацентарном комплексе, включение данного маркера в программу обследо-

вания беременных может обеспечить доклиническую диагностику, возможность своевременной коррекции плацентарной недостаточности, рационального подхода к родоразрешению и, в конечном итоге, снижение заболеваемости новорожденных.



БЕРЁМ ПРОБЫ ПРАВИЛЬНО: ВЗЯТИЕ КРОВИ В ПРОБИРКИ С АНТИКОАГУЛЯНТАМИ

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

В любой клинике ежедневно возникает необходимость взятия крови так, чтобы она не свернулась. Это связано либо с необходимостью сохранения форменных элементов крови (например, при общем анализе крови), либо получения плазмы крови (чаще всего для исследований гемостаза). В любом случае, при взятии таких проб стоит задача стабилизировать кровь и не дать свертывающей системе активироваться.

Традиционно для этих целей используется 3 вида антикоагулянтов:

1. соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA, ЭДТА); могут использоваться двукальциевые и трикальциевые соли, K2 EDTA и K3 EDTA соответственно;
2. соли лимонной кислоты — цитраты, обычно используется цитрат натрия;
3. гепарины.

В зависимости от задач анализа, выбирают тот или иной антикоагулянт.

Часть 1. Исследование клеток крови на гематологических анализаторах (развернутый общий анализ крови)

Поскольку в задачу этого исследования входит детальное изучение клеток крови, то взятие такой пробы должно быть максимально щадящим, чтобы не повредить нежные форменные элементы. С советских времен многие клиники пытаются продолжать практику взятия крови на такое исследование

из пальца. Но сегодня уже ясно, что такие пробы должны быть скорее исключением из правил, чем ежедневной практикой. Например, это допускается у детей первого года жизни, когда у больных доступ к венам затруднён. Выдавливаемые при проколе пальца тканевые компоненты — межтканевая жидкость, тканевой тромбопластин, да и повреждение форменных элементов крови в процессе выдавливания из прокола, приводят к некачественной пробе. Результаты, полученные таким способом, могут не отражать состояния пациента из-за агрегации тромбоцитов в микросгустки, повышенного гемолиза и т.п.

Если кровь берется из локтевой вены, то для анализа клеток крови недопустимо, чтобы ее брали шприцем и потом переливали в пробирки через иглу, поскольку такая манипуляция сопровождается значительным гемолизом. Оптимальным способом является взятие в вакуумную систему. Но даже в этом случае следует хорошо подумать, какой тип пробирки выбрать.

Если исследование проводит сторонняя лаборатория, куда пробы необходимо транспортировать, то вместо привычного антикоагулянта K3 ЭДТА лучше выбрать пробирки с K2 ЭДТА, поскольку последняя намного меньше влияет на морфологию клеток крови при длительном (более 4 часов) хранении. Изменения в морфологии, вызванные K3 ЭДТА, в первую очередь проявляются на нейтрофилах и моноцитах (вакуолиза-

ция цитоплазмы, потеря мостиков между сегментами ядер, пикноз ядер, дегрануляция нейтрофилов и эозинофилов), а также на тромбоцитах.

Нужно обратить внимание на материал, из которого сделана пробирка: химически инертные пластмассы имеют меньший коэффициент трения и намного меньше повреждают клетки крови при транспортировке, чем стекло.

Очень важно при использовании любых типов пробирок добиваться правильного соотношения антикоагулянта и крови. Недостаточное количество крови приводит к воздействию на клетки крови более высоких концентраций солей ЭДТА, и раствор антикоагулянта может значительно разбавить кровь, искажая результаты (например при этом занижаются показатели гемоглобина и концентрации клеток крови).

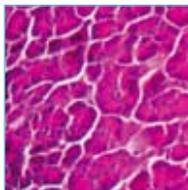
Если вы пользуетесь услугами сторонней лаборатории, то следует понимать, что кровь на общий анализ должна быть доставлена в лабораторию в этот же день как можно скорее. Идеальной является ситуация, когда кровь исследуется в течение первых 40-60 минут после взятия. Но даже в крупных больницах, имеющих собственные лаборатории, это условие часто не выполняется. Если подходить к ситуации реально, то для общего анализа крови допускается исследование пробы в первые 12 часов после взятия.

Очень много споров вызывает методика хранения крови до исследования — в холодильнике или при комнатной температуре. Многие руководства рекомендуют хранение проб в холодильнике при 2-8°C. Однако такой температурный

режим приводит к изменению структуры мембран и делает их более хрупкими с увеличением риска повреждения при транспортировке. Поэтому в реальной жизни надо руководствоваться, в первую очередь, здравым смыслом — в жаркое время года не допускать перегрева проб (оптимально, если температура будет около +20°C), в холодное время — избегать резкого переохлаждения.

Таким образом, сформулируем несколько основных правил преаналитического этапа для проб на общий анализ крови:

1. Правильно готовим пациента (мы не упомянули об этом в статье, т.к. это не было предметом нашего рассмотрения, но для качества анализа это очень важно) — кровь берется в утренние часы, строго натощак, до проведения других исследований (рентгеновского исследования, УЗИ) или физиотерапевтических процедур
2. Кровь берется из локтевой вены, в вакуумную пробирку, сделанную из полипропилена или полистирола с K2 ЭДТА. Тщательно, но аккуратно перемешивается (не надо встряхивать и трясти пробирку). При использовании невакуумных пробирок тщательно следите за соблюдением соотношения крови и антикоагулянта. Не допускается выливать кровь в пробирку через иглу шприца.
3. Проба с соблюдением температурного режима (без перегревов и охлаждений) и по возможности быстро доставляется в лабораторию.



ПАНКРЕАТИЧЕСКАЯ ЭЛАСТАЗА В КАЛЕ: совершенный тест для определения экзокринной функции поджелудочной железы

Несмотря на то, что заболевания поджелудочной железы широко распространены в популяции, клинические диагнозы хронического панкреатита и других заболеваний с выраженным дефицитом экзокринной функции поджелудочной железы ставятся довольно редко.

В первую очередь такое положение дел сложилось из-за трудностей в диагностике поражений поджелудочной железы: она труднодоступна для биопсийных методов, нередко плохо лоцируется при УЗИ, многие заболевания не имеют характерной ультразвуковой картины, привычными лабораторными методами сложно оценить нарушение ее экзокринной функции. Клинически недостаточность экзокринной функции неотличима от ряда кишечных синдромов: синдрома раздраженной толстой кишки, различных проявлений дисбиоза кишечника и т.п.

Значительным прорывом в этой области стала методика количественного определения эластазы в кале. Сегодня это единственный высокоточный достоверный способ, позволяющая надежно выявлять экзокринную недостаточность поджелудочной железы, в первую очередь, при хронических панкреатитах, а также при таких заболеваниях, как рак поджелудочной железы, сахарный диабет, синдром Швахмана, муковисцидоз (особенно при клинически стертых формах при гетерозиготном носительстве), холелитиаз.

Панкреатическая эластаза (ПЭ) — пищеварительный фермент, вырабатываемый только поджелудочной железой; в других органах он отсутствует. Эластаза содержится в соке поджелудочной железы и в норме расщепляет связи между

нейтральными аминокислотами белка. Причем по ходу движения пищевых масс по кишечнику концентрация ПЭ не падает, а содержание фермента в кале в 5-6 раз превышает содержание в панкреатическом соке. Начиная с возраста 2 недель, концентрация эластазы в кале относительно постоянна и не зависит от возраста. Установлена прямая зависимость концентрации эластазы в кале от функции поджелудочной железы, что позволяет оценивать экзокринную функцию поджелудочной железы. В отличие от фекального химотрипсина, результаты определения эластазы не зависят от приема пациентами панкреатических ферментов. Концентрация эластазы в кале не изменяется при целиакии, воспалительных заболеваниях кишечника, инфекционной диарее. Специфичность теста при исследовании кала составляет 93 %, чувствительность — 93 %.

Материалом для исследования является утренняя разовая порция кала. Удобным является и то, что при подготовке к исследованию пациенту не требуется отказываться от привычных ферментных препаратов. Собранный материал стабилен в течение недели при хранении в холодильнике, что позволяет собирать пробы кала без ущерба качеству в централизованной лаборатории.

Оценка результата: в норме концентрация панкреатической эластазы в кале постоянна, не зависит от пола и возраста и составляет свыше 200 мкг/1 г кала. Концентрация 100-200 мкг/1 г кала расценивается как умеренная, менее 100 мкг/1 г кала — как тяжёлая экзокринная панкреатическая недостаточность.

| Микроорганизм | Морфология и свойства | Значение группы микроорганизмов в биоценозе |
|--------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Clostridium spp. | Облигатные анаэробы, грам (+) палочки и кокки, образующие эндоспоры | Нормальные обитатели кишечника, в урогенитальном тракте — условно-патогенные микроорганизмы, могут участвовать в развитии бактериального вагиноза (Fredericks D.N., et al. 2005) |
| Lachnobacterium spp. | Анаэробные, трудно-культивируемые, грам (+) палочки | Ассоциированы с развитием бактериального вагиноза (Fredericks D.N. et al., 2005) |
| Peptostreptococcus spp. | Анаэробные грам (+) кокки, образующие цепочки | Условно-патогенные микроорганизмы, могут участвовать в развитии бактериального вагиноза (Spiegel C.A., et al 1980) |
| Sneathia spp. | Анаэробные, трудно-культивируемые грам (-) палочки | Sneathia sanguinegens — микроорганизм, участвующий в формировании бактериального вагиноза (David N., Fredricks et al, 2005) |
| Leptotrichia spp. | Анаэробные грам (-) извитые формы | Leptotrichia spp. ассоциирована с развитием бактериального вагиноза. (Fredricks D.N. et al, 2007) |
| Fusobacterium spp. | Анаэробные грам (-) палочки | Условно-патогенные микроорганизмы, могут участвовать в развитии бактериального вагиноза. (Piot P. et al, 1983) |
| Mobiluncus spp. | Граммвариабельные анаэробные микроорганизмы, не образующие спор | Условно-патогенные микроорганизмы, принимающие участие в развитии бактериального вагиноза (Spiegel C.A., et al, 1980) |
| Corynebacterium spp. | Преимущественно анаэробные грам (+) палочки, не образующие спор | Условно-патогенные микроорганизмы, могут вызывать инфекции урогенитального тракта (Funke G, 1997) |
| Atopobium vaginae | Анаэробные грам (+) очень мелкие кокки или палочки | Микроорганизм, имеющий этиологическое значение в развитии бактериального вагиноза (Ferris M.J. et al, 2004) |
| Mycoplasma hominis | Бактерии без клеточной стенки | Условные патогены (Waites K.B., 2005) |
| Ureaplasma urealyticum + Ureaplasma parvum | Бактерии без клеточной стенки | |
| Candida spp. | Аэробные микроорганизмы, грибы | Условно-патогенные микроорганизмы |



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 беременных.
- Выявление более 40 возбудителей инфекционных заболеваний методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).
- Биохимические исследования.
- Исследования системы гемостаза.
- Бактериологические исследования.
- Цитологические и гистологические исследования.



Адрес:

г. Новосибирск, Красный проспект, 77Б

Телефон: (383) 201-02-17

Время работы:

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

Web: www.dnklab.ru

Сеть медицинских центров

