

УДК 616-022.14-543.435-001.8

*К.М. Алибаева, Н.А. Бердиярова, Н.К. Мухамеджанова,
А.М. Маймакова, к.м.н., А.Д. Нурахова, к.м.н., доцент*

Областная детская клиническая больница
Шымкентская городская инфекционная больница
г. Шымкент, Казахстан
Казахский медицинский университет непрерывного образования
г. Алматы, Казахстан

АНАЛИЗ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ С-РЕАКТИВНОГО БЕЛКА И ПРОКАЛЬЦИТОНИНА У ПАЦИЕНТОВ С ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИЕЙ

АННОТАЦИЯ

Описан многолетний опыт использования определения С-реактивного белка при лечении больных с воспалительной реакцией в условиях детского стационара и инфекционной больницы. Описана сравнительная характеристика методов определения С-реактивного белка и прокальцитонина.

Ключевые слова: С-реактивный белок, прокальцитонин, ИФА, турбидиметрия, иммунохимический метод.

Исследование С-реактивного белка рассматривается как достоверный тест воспаления при бактериальных заболеваниях. Общеизвестно, что С-реактивный белок является белком острой фазы и содержится в крови здоровых людей в минимальных количествах, которые можно уловить только высокочувствительными методами. Содержание С-реактивного белка увеличивается в сыворотке крови при воспалении (инфекционных заболеваниях), некрозе, травме. С-реактивный белок – это α -2-глобулин, синтезируется гепатоцитами в ответ на секрецию клетками рыхлой соединительной ткани первичных медиаторов воспаления. Основная функция С-реактивного белка состоит в активации иммунных реакций организма, в том числе фагоцитоза. Он участвует во взаимодействии Т- и В-лимфоцитов, активирует систему комплемента по классическому типу. Уровень С-реактивного белка в сыворотке крови повышается через 3-6 ч воспаления (до начала увеличения количества гранулоцитов) и удваивается примерно каждые 8 ч. В итоге уровень С-реактивного белка при воспалении может превышать верхнюю границу нормы, характерную для здоровых людей, в десятки, сотни и тысячи раз. Причём выше уровень

С-реактивного белка в крови, тем выше вероятность наличия у больного повреждения тканей, воспалительного, инфекционного или онкологического заболевания. При успешном выздоровлении его уровень быстро снижается. С уровнем С-реактивного белка в сыворотке крови коррелируют показатели СОЭ, лейкоцитоз и нейтрофилез, но уровень С-реактивного белка растёт и снижается быстрее [1,2].

Функциональной особенностью С-реактивного белка является очень широкий диапазон концентраций при воспалении. Уровень С-реактивного белка при вирусной и спирохетной инфекции возрастает незначительно, поэтому его высокие значения в сыворотке крови при отсутствии травмы указывают на наличие бактериальной инфекции. Согласно данным литературы определение уровня С-реактивного белка в сыворотке крови используют при инфекционной патологии с целью диагностики инфекции и оценки тяжести воспаления у новорождённых, в том числе при сепсисе; дифференцирования бактериального и вирусного менингита у детей; бактериальных осложнений при хирургических вмешательствах. Диагностика инфекционных заболеваний и контроль эффективности антибактериальной терапии

составляют основную цель диагностического применения С-реактивного белка [3,4].

Прокальцитонин – гликопротеин, предшественник кальцитонина. В норме их синтез осуществляется в С-клетках щитовидной железы. У здоровых людей концентрация прокальцитонина низкая, его референсная величина в плазме крови составляет менее 0,05 нг/мл. Увеличение уровня прокальцитонина в крови происходит при невирусных инфекциях. Значительное повышение прокальцитонина обнаруживают у пациентов с бактериальным сепсисом. При генерализации бактериальной инфекции происходит активная выработка прокальцитонина в нейроэндокринных клетках легких, в поджелудочной железе, печени, макрофагах, моноцитах и других тканях. Уровень прокальцитонина в сыворотке крови возрастает в течение 3-12 ч после генерализации инфекции. Уровень прокальцитонина четко коррелирует с тяжестью воспалительного процесса. По литературным данным, при уровне прокальцитонина более 2 нг/мл существует высокий риск тяжелого сепсиса. В клинической практике исследование прокальцитонина все чаще проводится для диагностики сепсиса, синдрома полиорганной недостаточности и септического шока. Это обусловлено тем, что динамика изменений уровня прокальцитонина в крови при этих состояниях значительно отличается от других маркеров воспалительного процесса, в том числе и С-реактивного белка, так как выделение прокальцитонина избирательно индуцируется при бактериальной инфекции. Секрция прокальцитонина вообще не увеличивается при вирусных инфекциях, аутоиммунных процессах, неоплазиях и операционной травме. В связи с этим определение прокальцитонина рекомендовано использовать для дифференциации бактериального и небактериального воспалительного процесса. Большим достоинством определения уровня прокальцитонина в крови по сравнению с С-реактивным белком является то, что он повышается довольно быстро после возникновения инфекции и не подвержен значительным колебаниям в течение дня [5].

Целью настоящей работы является определение диагностической ценности методов количественного определения С-реактивного белка и прокальцитонина крови при обследовании больных стационара с различными воспалительными заболеваниями.

Материал и методы. Использован автоматизированный метод иммунотурбидиметрии с применением реактивов BioSystems. С-реактивный белок сыворотки вызывает агглютинацию частиц латекса, покрытых антителами к человеческому С-реактивному белку. Агглютинация латексных частиц пропорциональна концентрации С-реактивного белка и измеряется турбидиметрически с использованием светофильтра на 536 нм. Этот метод позволяет определить уровень С-реактивного белка в интервале от 0,001 до 0,005 г/л и выше.

Для количественного определения уровня прокальцитонина применялся набор реагентов «Прокальцитонин-ИФА-Бест». Набор предназначен для количественного определения концентрации прокальцитонина в сыворотке крови человека методом твердофазного ИФА. Метод определения основан на «сэндвич»-варианте ИФА. Специфическими реагентами набора являются моноклональные антитела к прокальцитонину, сорбированные на поверхности лунок разборного полистерольного планшета; поликлональные антитела к прокальцитонину человека с биотином.

На первой стадии анализа исследуемые и контрольные образцы инкубируют в лунках с иммобилизованными антителами. Имеющийся в образцах прокальцитонин связывается с иммобилизованными антителами. Затем связавшийся прокальцитонин взаимодействует при инкубации с конъюгатом №1 (биотин). На третьей стадии связавшийся конъюгат №1 взаимодействует при инкубации с конъюгатом №2 (стрептовидин с пероксидазой хрена). Количество связавшегося конъюгата №2 определяют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы хрена-перекиси водорода и хромогена - тетраметилбензидина. Интенсивность желтого окрашивания пропорциональна концентрации прокальцитонина в образце. После измерения оптической плотности раствора в лунках рассчитывается концентрация прокальцитонина в анализируемых образцах.

Результаты и обсуждение. Было сделано 419 определений С-реактивного белка в Областной детской клинической больнице и 188 анализов в инфекционном стационаре. У всех обследованных имел место воспалительный процесс, так как отмечался лейкоцитоз со сдвигом лейкоцитарной формулы влево, ускоренное СОЭ и клинические проявления

болезни. Результаты анализов показали нормальное или незначительное повышение концентрации С-реактивного белка у больных с ОРВИ и 10-кратное и более чем 100-кратное увеличение уровня С-реактивного белка у больных с бактериальными формами воспаления. Таких результатов было всего 242 из 419 анализов в детском стационаре и 104 из 188 анализов в инфекционном стационаре.

Согласно полученным результатам отмечается параллельное повышение уровней С-реактивного белка и прокальцитонина в случаях бактериального воспаления. При вирусных пневмониях нарастания измеряемых параметров не отмечалось, несмотря на наличие лейкоцитоза и ускоренного СОЭ.

Наиболее значимыми для клинической практики являются гормоны – прокальцитонин (PCT), адреномедуллин, пептиды, связанные с экспрессией генов кальцитонина (CGRP-I, CGRP-II), нейропептиды, а также некоторые острофазовые белки – С-реактивный протеин, липополисахарид – связывающий белок. На сегодняшний день наиболее хорошо изученным и достаточно широкоиспользуемым в клинической практике является PCT. У здоровых людей гормон кальцитонин (КТ) секретируется С-клетками щитовидной железы после внутриклеточного расщепления прогормона.

Вот уже несколько десятилетий сепсис и тяжелые инфекции остаются одной из актуальных проблем современной медицины в силу неуклонной тенденции к росту числа больных и стабильно высокой летальности, несмотря на использование новых принципов и методов лечения [6]. Это часто происходит из-за отсроченной постановки диагноза и начала лечения, а также по причине отсутствия возможности точно оценить эффективность лечения. Поэтому проблема своевременной диагностики сепсиса и эффективного контроля течения заболевания стоит в настоящее время достаточно остро [7].

В клинической практике существуют 2 основные проблемы при диагностировании тяжелой инфекции. *Первая* – это дифференцирование между инфекцией *per se*, т. е. локальной и генерализованной инфекцией, сопровождающейся соответствующими системными реакциями. Патологические эффекты синдрома системного воспалительного ответа (ССВО) могут быть определены клинически

по наличию признаков (таблица), но тяжесть синдрома и прогноз клинически оценить гораздо труднее [8].

Критерии тяжелой инфекции согласно Конференции согласия (АССР) [8]

Синдром системного воспалительного ответа (ССВО)

Два или более признака из следующих:

- Количество лейкоцитов в крови > 12,000, или < 4,000 в 1 мкл;
- либо относительное количество незрелых форм более 10 %-ная частота сердечных сокращений > 90 ударов в мин.;
- частота дыхания > 20 дыханий в 1 мин.;
- температура тела > 38 или < 36 °С).

Сепсис

ССВО в сочетании с подтвержденным наличием инфекции (например, положительные результаты посевов)

Тяжелый сепсис

Сепсис в сочетании с органной дисфункцией: *гипоперфузия* либо *гипотензия* (гипоперфузия включает, но не ограничивается лактацидозом олигурией, либо нарушением сознания)

Септический шок

Сепсис-индуцированная гипотензия, несмотря на адекватное восполнение жидкости и признаки гипоперфузии органов и тканей.

Вторая проблема при диагностировании сепсиса – это дифференцирование между инфекционной и другими причинами синдрома системного воспалительного ответа, такими, как травма и иммунокомплексные заболевания. Диагностика затруднена также тем, что у большей части пациентов с явной клинической картиной сепсиса гемокультура часто бывает отрицательной.

Воспаление, возникающее после какой-либо формы тканевого повреждения, сопровождается продукцией цитокинов и белков острой фазы, определение которых может свидетельствовать о наличии воспаления и степени его тяжести. В некоторых случаях определение белков острой фазы или цитокинов может свидетельствовать о природе воспалительного процесса или его осложнениях, хотя воспалительные процессы в целом очень схожи, независимо от причины. В этой связи понятен интерес исследователей и клиницистов к прогормонам кальцитонина и прежде всего к прокальцитонину (PCT), который, как считают некоторые исследователи

ли, является специфическим маркером инфекции.

Прокальцитонин является прогормоном кальцитонина, состоящим из 116 аминокислот. Человеческий геном содержит 4 гена для кальцитонина с различными генными продуктами: 3 расположены на коротком плече 11 хромосомы и 1 на коротком плече 12 хромосомы эти гены собирательно называются «семейством генов прокальцитонина». Кальцитонин кодируется геном CALC-I. Транскрипция с 6 экзонов CALC-I гена на РНК и альтернативный сплайсинг РНК – зависят от тканевой локализации.

В нормальной физиологии единственная роль, установленная для PCT, – это роль предшественника кальцитонина. Кальцитонин, как известно, регулирует метаболизм костей и кальция, а также ингибирует резорбцию кости остеокластами. Ранее предполагали, что кальцитонин (СТ), названный так за гипокалиемический эффект, имеет исключительно тиреоидное происхождение и играет важную роль в скелетном гомеостазе. Однако было выявлено, что при тиреоидектомии у людей не происходит никаких значительных патологических последствий в отношении гомеостаза кальция, и плотность костей в большинстве случаев остается прежней.

Таким образом, физиологические функции зрелого СТ у человека пока еще остаются неизвестными, не были также до сих пор определены нарушения, которые возникают в организме при избытке или дефиците зрелого кальцитонина. По традиционным представлениям в эндокринологии, предшественники кальцитонина вырабатываются главным образом в нейроэндокринных С-клетках щитовидной железы. В отсутствие инфекции экстратиреоидная транскрипция CALC-I гена подавлена и ограничивается селективной экспрессией в нейроэндокринных клетках, обнаруживаемых главным образом в щитовидной железе и легком. В этих нейроэндокринных клетках синтезируется зрелый гормон и запасается в секреторных гранулах. При тяжелой системной инфекции прокальцитонин продуцируется тканями вне щитовидной железы. Это подтверждается тем, что у пациентов, которые предварительно подверглись тотальной тиреоидектомии, все равно продуцируются высокие уровни прокальцитонина в течение тяжелой инфекции. Кроме тканей щитовидной железы PCT продуцируется ати-

пичными клетками мелкоклеточной карциномы легкого.

Кальцитонин и родственные пептиды обнаруживаются у человека в нейроэндокринных клетках легкого. Выявлено, что м-РНК прокальцитонина экспрессируется у человека в мононуклеарах периферической крови, а липополисахарид оказывает на эту экспрессию заметный стимулирующий эффект. Моноциты, выделенные из крови больных с септическим шоком, показывали более высокий базальный уровень и увеличение содержания PCT в ответ на стимуляцию липополисахаридом.

Определение уровней PCT в сыворотке и плазме крови, по данным разных авторов, может быть полезным в следующих ситуациях:

- В качестве диагностики сепсиса, септического шока и тяжелых бактериальных инфекций. Для дифференциального диагноза инфекционной и неинфекционной этиологии лихорадки неясного генеза.

- Для мониторинга состояния больных с сепсисом, шоком; оценки эффективности проводимого лечения; оценки прогноза для данного больного.

- PCT подходит для ранней диагностики инфекционных осложнений.

- PCT можно использовать для дифференциального диагноза.

1. Инфекционной и неинфекционной этиологии (например, ОРДСВ, острого панкреатита).

2. Бактериальных и вирусных инфекционных заболеваний (например, острого менингита, сепсиса новорождённых).

3. Острых бактериальных инфекций и хронических воспалительных процессов, например аутоиммунных заболеваний.

4. Реакций против трансплантата и инфекционных осложнений бактериальной и грибковой природы.

- Уровни PCT повышаются также при тяжелой пневмонии, перитоните, бактериальном менингите.

- Кроме того, уровни PCT могут повышаться при малярии, мелиодозе, системных грибковых инфекциях.

Клинико-диагностическая значимость определения С-реактивного белка и прокальцитонина в педиатрической и инфекционной практике очень велика, а в сравнении эти тесты почти равны. Однако, учитывая более высокую стоимость реактивов для разового опре-

деления прокальцитонина иммунохимическим методом и невозможность срочной постановки ИФА, представляется экономически более целесообразным использовать в лечебно-диагностическом процессе определение С-реактив-

ного белка. Вместе с тем необходимо развивать использование определения прокальцитонина путем централизации исследования в крупных лабораториях города.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Кишкун А.А. Руководство по лабораторным методам диагностики / 2-е изд., перераб. и доп. – М., 2013. – 540 с.
- 2 Коньков А.В., Попович С.Е. Диагностическое значение прокальцитонина, С-реактивного белка и трансрезонансной функциональной топографии в течении внебольничной пневмонии. Практикующему врачу // Саратов. науч.-мед. журн. – 2008. – № 3. – С. 5-9.
- 3 Титов В.Н. Экзогенные и эндогенные патологические факторы (патогенны) как причина воспаления // Клиническая лабораторная диагностика. – 2004. – № 5. – С. 9-12.
- 4 Титов В.Н. Диагностическое значение повышения уровня С-реактивного белка в «клиническом» и «субклиническом» интервалах // Клиническая лабораторная диагностика. – 2004. – № 6. – С. 10-14.
- 5 Титов В.Н., Блезнюков О.П. С-реактивный белок: физико-химические свойства, методы определения и диагностическое значение // Клиническая лабораторная диагностика. – 2004. – №4. – С. 15-23.
- 6 Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A. et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. NEngl // JMed2001; 344:699-709.
- 7 Beat Mullera, Kenneth L. Becker. Procalcitonin: how a hormone became a marker and mediator of sepsis // SWISS MED WKLY 2001;131:595-602 о www.smw.ch
8. American College of Chest Physician – Society of Critical Care Medicine Conference. Definitions of sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis // Crit. Care Med. 1992; 20: 864-875

ТҮЙІН

Балалар стационары және жұқпалы аурулар ауруханасында жағдайларында қабыну реакциялары бар науқас балаларды емдеу кезінде реактивті нәруыз зерттеулерінің көпжылдық қолданылу тәсілдері жазылған. С-реактивтік нәруызын пайдаланудың көпжылғы тәжірибесі сипатталған. С-реактивтік нәруызын және прокальцитонин анықтау әдістерінің салыстырмалы сипаттамасы берілген.

Түйінді сөздер: С-реактивтік нәруыз, прокальцитонин, ИФА, турбидиметрия, иммунохимиялық әдістер.

SUMMARY

Described many years of experience using the definition of C-reactive protein in patients with inflammatory response in terms of children's hospital and the Hospital for Infectious Diseases. Describes methods for determining the comparative characteristics of C-reactive protein and procalcitonin

Key words: C-reactive protein, procalcitonin, ELISA, turbidimetry, immunochemical method.