

Федеральное медико-биологическое агентство
(ФМБА России)

Система стандартизации
в здравоохранении Российской Федерации
Группа 12. Требования к профилактике заболеваний,
защите населения от повреждающих факторов,
охране репродуктивного здоровья
и оказанию медико-социальной помощи

**МЕТОДЫ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ
И ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ДВС-СИНДРОМА
ПРИ ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ
ЗАБОЛЕВАНИЯХ У ДЕТЕЙ**

Методические рекомендации

МР ФМБА России 36-2019

Санкт-Петербург
2019

ВВЕДЕНИЕ

Методы ранней диагностики и прогнозирования ДВС-синдрома при генерализованных инфекционных заболеваниях у детей:

Методические рекомендации / С. С. Бессмельцев, А. В. Четкин, Л. П. Папаян, В. Н. Чеботкевич, С. И. Капустин. — СПб., ФМБА, 2019. — Агентство «ВиТ-принт», 2019. — 32 с.

Методические рекомендации разработаны в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России).

*В настоящем руководстве реализованы требования
Федерального закона Российской Федерации от 21 ноября 2011 № 323-ФЗ
«Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации».*

*Утверждены заместителем руководителя
Федерального медико-биологического агентства Ю. В. Мирошниковой
13.08.2019 г.*

Рецензент: Доктор медицинских наук, профессор *Цыпкина Л. П.*
Доктор медицинских наук, профессор *Исаков В. А.*

Введены впервые.

Область применения

1. Методические рекомендации распространяются на этапы диагностики и терапии генерализованных инфекционных заболеваний, в том числе осложненных развитием ДВС-синдрома, проведение которой обеспечивает быструю и надежную коррекцию патологических изменений гемостаза у детей с ГИЗ с целью снижения риска развития и тяжести течения полиорганной недостаточности в этой группе.
2. В документе представлены новые методы выполнения ранней диагностики и прогнозирования ДВС-синдрома у детей с генерализованными инфекционными заболеваниями по результатам клинико-лабораторной оценки их эффективности.
3. Методические рекомендации предназначены для применения в учреждениях ФМБА России и могут быть использованы в деятельности врачей-гематологов, детских врачей-инфекционистов, врачей клинической лабораторной диагностики, гемостазиологов и бактериологов.

© Коллектив авторов, 2019
© ООО «Агентство “ВиТ-принт”», 2019

Генерализованные инфекционные заболевания (ГИЗ) характеризуются системным воспалением и всегда связаны с активацией системы гемостаза вплоть до развития синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови (ДВС) [1, 2]. Сепсис, возникающий в результате ГИЗ, является тяжелым жизненно опасным осложнением многих заболеваний, требующим незамедлительной этиотропной терапии. Он является одной из ведущих причин госпитальной летальности. Даже в развитых странах велика смертность от сепсиса. Например, в США, по разным оценкам, ежегодно регистрируется от 900 тысяч до 3 миллионов случаев бактериального или грибкового сепсиса, из которых летально заканчиваются 15–30% [1]. Велик риск развития тяжелых инфекций у детей. Смертность педиатрических пациентов с сепсисом в педиатрических отделениях реанимации и интенсивной терапии составила в США 26,4% [3].

Проблема эффективного лечения ГИЗ у детей носит двоякий характер. С одной стороны, актуальной является ранняя и точная диагностика инфекционного агента, поскольку задержка этиотропного лечения приводит к повышению вероятности развития сепсиса и полиорганной недостаточности (ПОН), которая является основной причиной инвалидизации и летальности при ГИЗ [1]. В то же время, необходимо учитывать, что ведущим звеном патогенеза ПОН является синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови (ДВС). Поэтому для успешного лечения детей с ГИЗ необходима разработка надежных методов ранней диагностики и прогнозирования характера течения ДВС-синдрома, позволяющих, в том числе, оценить риск развития тяжелых форм ПОН.

Как показывают многочисленные исследования, успех в лечении и, особенно, в предупреждении «септического» ДВС-синдрома в значительной мере определяется правильностью выбора стартовой эмпирической антибактериальной терапии. При задержке этиотропной терапии, инфекции кровеносного русла у детей зачастую приводят к развитию сепсиса, вплоть до септического шока, с летальным исходом. Показано, что каждый час задержки адекватной терапии при тяжелом сепсисе и септическом шоке приводит к повышению летальности на 7,6% [4]. Аналогичные результаты были получены также и при педиатрическом сепсисе [5].

Классические микробиологические методы диагностики позволяют выявить возбудителя слишком поздно, что затрудняет своевременное принятие лечебных мер. В связи с этим, в настоящее время для этиоло-

гической диагностики инфекций кровеносного русла, тяжелых пневмоний с бактериемией, менингита широко используются автоматические инкубаторы типа ВаСТ/ALERT. Они позволили значительно сократить время проведения анализа и исследовать образцы крови от больных даже на фоне интенсивной антибактериальной терапии (за счет добавления сорбентов антибиотиков в питательную среду).

Однако длительность процедуры идентификации выделенных гемокультур при использовании обычных фенотипических методов выявления бактерий и определения их чувствительности к антибиотикам, составляющая как минимум 48 часов, существенно ограничивает ценность микробиологического метода. Поэтому в последние годы разрабатываются и уже используются на практике молекулярно-биологические методы ускоренной идентификации бактерий и грибов [6]. К таким методам относится, в частности, метод мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ). Разрабатываются методики и наборы реагентов для выявления возбудителей инфекций кровотока, а также выявления генетических маркеров антибиотикорезистентности.

Важность выявления и прогностическая значимость ДВС-синдрома при сепсисе являются, на сегодняшний день, дискуссионными, что связано, в том числе, и с различием подходов к диагностике ДВС. Согласно критериям Международного общества по тромбозу и гемостазу, для его диагностики используется балльная система и диагноз «явного» ДВС-синдрома устанавливается при сумме 5 баллов и более. По этим критериям, ДВС-синдром встречается у 25–50% пациентов с сепсисом, хотя многие исследователи сомневаются в объективности такого подхода. Другой подход к диагностике ДВС-синдрома при сепсисе основан на определении признаков тромбинемии, поскольку известно, что гиперкоагуляционные изменения характеризуют начальную стадию этой патологии гемостаза [7, 8]. Одним из наиболее значимых факторов, провоцирующих развитие тромбинемии при ГИЗ, является вовлечение в патологический процесс сосудистого эндотелия, как за счет непосредственного локального повреждения, так и вследствие активации, связанной с воздействием множественных медиаторов воспаления, токсинов, продуктов распада бактерий. Нарушение функций и проницаемости эндотелия капилляров считается одной из наиболее значимых причин развития ДВС-синдрома, снижения тканевой перфузии, развития полиорганной недостаточности [9–12].

Исследования последних лет показали, что большинство существующих методов оценки системы гемостаза оказываются нечувствительными к выявлению гиперкоагуляции [7, 13]. Например, результаты

таких рутинно используемых коагуляционных тестов, как определение активированного парциального тромбопластинового времени (АПТВ) и протромбинового теста, чаще всего, остаются неизменными даже при развитии тромбоза [7, 13]. Исследование отдельных факторов — концентрации фибриногена, активности факторов VIII и Виллебранда, а также активности естественных антикоагулянтов (антитромбина, протеинов С и S), может выявить отклонения соответствующих показателей от референтного интервала, но не позволяет судить о наличии гиперкоагуляции в целом. Объясняется это тем, что изменения отдельных компонентов свертывающей системы крови могут быть нивелированы в организме включением компенсаторных механизмов. Исследование таких маркеров активации гемостаза, как уровень D-димера, ТАТ-комплексов, фрагментов протромбина F1+2 дает лишь косвенную оценку выраженности тромбинемии.

Таким образом, получая результаты большого количества лабораторных исследований гемостаза, клиницист, чаще всего, не может адекватно соотнести все проанализированные показатели между собой и точно определить, будет ли в результате их взаимодействия смещен гемостатический баланс в сторону гиперкоагуляции или нет. В связи с этим, для широкой клинической практики, наряду с результатами общепринятых методов исследования коагуляционного звена гемостаза, представляются важными данные интегральных тестов, которые отражают функциональное состояние системы гемостаза в целом, с учетом взаимодействия всех составляющих ее звеньев [14, 15]. Это диктует необходимость включения в общепринятый алгоритм исследования гемостаза у детей с ГИЗ новых информативных методов обследования, с целью диагностики ДВС-синдрома на ранней стадии его развития.

В последнее время убедительно доказана клиническая целесообразность использования интегральных лабораторных методов оценки состояния гемостаза, учитывающих взаимодействие про- и антикоагулянтных механизмов. К числу таких интегральных методов относится тест генерации тромбина (ТГТ), который позволяет получить количественную характеристику процесса генерации тромбина у конкретного пациента с учетом взаимодействия различных звеньев гемостаза. С помощью различных модификаций постановки теста, в частности, при определении особенностей процесса генерации тромбина в системе без добавления и с добавлением тромбомодулина в реакционную смесь, возможно оценить не только уровень тромбинемии, но и вклад в генерацию тромбина антикоагулянтной системы протеина С, которая в значительной степени определяется состоятельностью сосудистого эндотелия [16, 17, 18].

Актуальной представляется оценка эффективности использования калиброванной автоматизированной тромбограммы, полученной с помощью ТГТ, для выявления тромбинемии как следствия гиперкоагуляции у детей с ПОН на фоне ГИЗ. Определение критериев ранней диагностики ДВС-синдрома на основе сравнительного анализа показателей ТГТ и результатов стандартного гемостазиологического обследования будет способствовать снижению частоты развития и тяжести ПОН у детей с генерализованными инфекционными заболеваниями и, как следствие, может привести к значительному снижению летальности и инвалидизации у данной категории больных.

Как показал ряд исследований, характер течения и вариант исхода ДВС-синдрома могут определяться не только типом инфекционного возбудителя, но и особенностями ответа организма больного, связанного, в том числе, с его биохимическим и генетическим профилем [19–25]. Активация гемостаза, в том числе, в ответ на различные воспалительные процессы, может носить индивидуальный характер и определяться, в частности, особенностями фенотипической экспрессии генов иммунного ответа, регуляции системы гемостаза и ряда других систем, участвующих в развитии синдрома системного воспалительного ответа. В свою очередь, индивидуальный профиль экспрессии указанных генов, как и функциональная активность кодируемых ими белков, во многом являются генетически запрограммированными и зависят от генотипа человека, определяемого в соответствии с особенностями его ДНК-полиморфизма [26].

Несомненный интерес при установлении возможных предикторов тяжелого течения ДВС-синдрома представляют белки острой фазы воспаления (фибриноген, фактор VIII), а также другие компоненты, влияющие на процесс стабилизации и лизиса фибринового сгустка (фактор XIII свертывания крови, тканевой активатор плазминогена — ТРА, ингибитор активатора плазминогена 1-го типа — PAI-1). Для генов каждого из этих факторов установлено наличие нескольких аллельных изоформ, ассоциированных с различным уровнем продукции или/и активности соответствующего белкового продукта. Так, нуклеотидная замена «–455G/A» в гене b-субъединицы фактора I (F1-B) приводит к повышению его конститутивной экспрессии [27]. Известно также, что вариант «–455A» в большей степени, по сравнению с аллелем «–455G», подвержен активации под действием интерлейкина-6 и, возможно, других медиаторов иммунного ответа [28]. Manocha S. et al. выявили ассоциацию между полиморфизмом гена F1-B, риском развития полиорганной недостаточности и летального исхода у больных с сепсисом [29]. Аминокислотная замена Thr312Ala в α -субъединице фибриногена (F1-A) приводит к изме-

нению толщины волокон фибриновых нитей и пористости образуемого в ходе гемостатических реакций тромба, в результате чего он становится более прочным и устойчивым к фибринолизу [30]. Данные о влиянии полиморфизма гена F1-A, приводящего к указанной замене, на характер течения и прогноз ДВС-синдрома, в том числе у детей с ГИЗ, отсутствуют. Однако известно, что данный полиморфизм ассоциирован с риском возникновения артериальных и венозных тромбозов [30].

Важнейшими биологическими регуляторами фибринолитической активности плазмы крови являются белки ТРА и PAI-1. Инсерционно-делеционный полиморфизм *Alu*-повтора размером 311 пар нуклеотидов (п.н.) в интроне 8 гена ТРА (311 п.н. Ins/Del) ассоциирован со скоростью локальной секреции этого фактора эндотелиальными клетками [31]. Носительство аллеля «311 п.н. Ins» сопряжено с примерно 8-кратным риском развития венозного тромбоза на фоне беременности у женщин европеоидной расы [32]. Роль полиморфизма гена ТРА в патогенезе других тромбгеморрагических расстройств, в том числе, ДВС-синдрома остается пока невыясненной.

Одной из наиболее хорошо изученных наследственных детерминант снижения активности фибринолиза является полиморфизм «4G/5G» в 5' — нетранслируемой области гена PAI-1, который связан с инсерцией или делецией одного нуклеотида (гуанина) в позиции «–675». В эксперименте *in vitro* было показано, что аллели «4G» и «5G» не только характеризуются различным базальным уровнем экспрессии PAI-1 (у гомозигот «4G/4G» он на 25–30% больше, чем у носителей аллеля «5G»), но и по-разному отвечают на стимуляцию интерлейкином-1 [33]. Возможно, развитие гипофиринолиза вследствие увеличения продукции PAI-1 является одним из важнейших патогенетических механизмов ДВС-синдрома и ассоциированной с ним ПОН. В ряде исследований убедительно показана неблагоприятная прогностическая роль генотипа «PAI-1 4G/4G» у взрослых пациентов с ДВС-синдромом [19, 20, 34]. Binder A. et al. обнаружили ассоциацию между развитием ДВС-синдрома у детей с генерализованной менингококковой инфекцией и генотипом «PAI-1 4G/4G» [24].

Важную роль в формировании и стабилизации фибринового сгустка играет фактор XIII свертывания крови, под действием которого образуются ковалентные связи между мономерами фибрина. Полиморфизм «163 G/T» в гене A-субъединицы фактора XIII (FXIII-A) приводит к замене валина (Val) на лейцин (Leu) в аминокислотной позиции 34. Указанный полиморфизм может оказывать влияние как на кинетику образования фибринового сгустка, так и на его структуру [35], а, следовательно, устойчивость к фибринолизу.

Наряду с генетическим полиморфизмом компонентов системы гемостаза, важную роль в патогенезе ДВС-синдрома могут играть индивидуальные особенности иммунного ответа на инфекционное поражение, которые также во многом определяются генотипом пациента. Именно на примере ДВС-синдрома наиболее четко прослеживается взаимосвязь процессов коагуляции и иммунного воспаления [36]. Помимо регуляции экспрессии генов TPA, PAI-1 и фибриногена, такие провоспалительные цитокины, как фактор некроза опухоли- α (TNF- α), интерлейкин (IL)-1 и IL-6, могут иными путями воздействовать на систему гемостаза и способствовать тромбообразованию. Наиболее известными механизмами являются активация коагуляционного каскада за счет усиления экспрессии тканевого фактора и снижения активности естественных антикоагулянтов [37].

Кроме того, гиперпродукция указанных цитокинов приводит к увеличению проницаемости сосудистой стенки, нарушению регуляции сосудистого тонуса, повышению адгезии лейкоцитов и тромбоцитов к эндотелию [37, 38].

Имеется большое количество публикаций, посвященных изучению роли полиморфизма провоспалительных цитокинов в патогенезе сепсиса, ДВС-синдрома и ПОН. Наиболее клинически значимыми и хорошо изученными являются аллельные варианты, обусловленные однонуклеотидными заменами в регуляторной области соответствующих генов (IL-1 β T-31C, IL-1 β C-511T, IL-6 G-174C, TNF- α G-308A) и приводящие к их усиленной экспрессии [39–41]. Однако результаты проведенных исследований не позволяют сделать вывод о целесообразности использования какого-либо отдельного генетического маркера в качестве прогностического критерия течения ДВС-синдрома у детей с ГИЗ. Возможно, это связано с тем, что до сих пор авторами не предполагалась комплексная оценка генотипа пациента, необходимая для более полного понимания значимости взаимодействия патологических механизмов гемостаза и иммунного воспаления на особенности клинического течения ДВС-синдрома, развивающегося на фоне ГИЗ.

В связи с этим, в данных методических рекомендациях описаны методы, позволяющие проводить раннюю диагностику основных инфекционных возбудителей, ассоциированных с возникновением ГИЗ у лиц детского возраста, а также прогнозировать развитие ДВС-синдрома и тяжесть его течения, в том числе, оценить риск возникновения ПОН.

1. НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

1. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 15 ноября 2012 года № 930н «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи населению по профилю «гематология»».
2. Федеральный закон от 21 ноября 2011 года № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации».
3. СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности и возбудителями паразитарных болезней».
4. СП 1.3.2518-09 Дополнения и изменения N1 к СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности и возбудителями паразитарных болезней».
5. МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории».
6. МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I – IV групп патогенности».
7. СП 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами»

Примечание: При пользовании настоящим документом целесообразно проверить действие ссылочных нормативных документов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодно издаваемому указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный документ заменен (изменен), то при пользовании настоящей методикой следует руководствоваться заменяющим (измененным) документом. Если ссылочный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

2. ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Генерализованные инфекционные заболевания (ГИЗ) — диссеминация возбудителя из первичного очага через кровоток

Ген — единица наследственной информации, детерминирующая развитие того или иного признака, неделимая в функциональном отношении

ДВС-синдром — синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови, характеризующийся образованием диссеминированных тромбов (фибриновых, эритроцитарных и гиалиновых) в сосудах микроциркуляторного русла в сочетании с несвертываемостью крови, приводящей к множественным массивным кровоизлияниям

Полиорганная недостаточность — тяжёлая неспецифическая стресс-реакция организма, совокупность недостаточности нескольких функциональных систем организма

3. ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АПТВ — активированное парциальное тромбопластиновое время

ГИЗ — генерализованные инфекционные заболевания

ГМИ — генерализованная менингококковая инфекция

ДВС — диссеминированное внутрисосудистое свертывание

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота

ПДРФ — полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

ПОН — полиорганная недостаточность

ПТ — протромбиновый тест

ПЦР — полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ — полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

СПОН — синдром полиорганной недостаточности

ТАТ-комплекс — тромбин-антитромбиновый комплекс

ТГТ — тест генерации тромбина

ТМ — тромбомодулин

Cal — калибратор

ЕТР — эндогенный потенциал тромбина

IL — интерлейкин

РАI-1 — ингибитор активатора плазминогена 1-го типа

ТРА — тканевой активатор плазминогена

rh-TF — рекомбинантный человеческий тканевой фактор

rh-TM — рекомбинантный человеческий тромбомодулин

4. МЕТОДИКИ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

4.1. Методика выявления инфекционных возбудителей, ассоциированных с развитием ГИЗ у детей

Суть использованного метода выявления бактериальных возбудителей состоит в следующем. У пациента производится посев крови во флаконы с питательной средой. Стандартно используют два флакона (аэробный и анаэробный). Флаконы с образцами крови инкубировали в автоматизированной системе типа Vact/ALERT 3D в течение 7 суток в соответствии с инструкцией производителя. При наличии роста, из флакона, содержащего положительную культуру, отбирается проба для проведения идентификации выделенного патогена с помощью ПЦР-РВ.

Материалы

Анализ проводится на образцах гемокультур, полученных от больных. Для молекулярно-биологической идентификации используют ДНК возбудителей, выделенную из гемокультур, в которых обнаружен рост бактерий.

Реактивы и оборудование

Стандартное оборудование для бактериологической и ПЦР-лаборатории отечественного и зарубежного производства, имеющее номера Государственной регистрации в Российской Федерации:

- автоматический бактериологический анализатор;
- ДНК-амплификаторы;
- флаконы для бактериологического анализатора;
- одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером на 0,5–10 мкл, 1–200 мкл и 100–1000 мкл;
- одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл;
- одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР на 0,2 мл (плоская или выпуклая крышка в зависимости от типа используемого прибора);
- набор реагентов «АмплиПрайм® Флоро-Ценоз-Аэробы», для выявления ДНК бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, а также *Streptococcus spp.* и *Staphylococcus spp.* (выявление до уровня рода);
- набор реагентов «ИМП-G+», для выявления ДНК бактерий рода *Enterococcus* (выявление до уровня рода);

- набор реагентов «G-», для выявления ДНК *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*;
- набор реагентов «ИМП-скрин-FL», для выявления ДНК *Escherichia coli*;
- набор реагентов «АмплиСенс®MRSA-скрин-титр-FL», для выявления ДНК метициллинчувствительного и метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus*, а также метициллин-резистентных коагулазонегативных *Staphylococcus spp.*;
- набор реагентов «АмплиСенс®MDR MBL-FL», для выявления генов приобретенных карбапенемаз класса металло-β-лактамаз, групп VIM, IMP, NDM;
- набор реагентов «АмплиСенс®MDR KPC/OXA-48-FL», для выявления генов приобретенных карбапенемаз групп KPC и OXA-48-подобных;
- набор реагентов «АмплиСенс®Флоро-Ценоз/Кандиды-FL», для выявления ДНК *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis*;
- набор реагентов «АмплиСенс® *N.meningitidis* / *H.influenzae* / *S.pneumoniae*-FL».

Подготовка к выполнению исследования

Посев крови осуществляют во флаконы, после чего проводят культивирование в автоматизированной системе Vact/ALERT 3D в соответствии с инструкцией изготовителя.

Выделение бактериальной ДНК из гемокультуры производится с помощью набора для экстракции нуклеиновых кислот «ДНК-сорб-AM» (ООО «ИнтерЛабСервис», ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия) в модификации (добавлено предварительное центрифугирование образца для получения рабочего осадка; лизис клеток проводится без присутствия сорбента; увеличен до 200 мкл объем ТЕ-буфера, добавляемого при растворении ДНК).

Проведение исследования и учет результатов

Анализ и учет результатов микробиологического исследования проводится в соответствии с инструкцией по использованию автоматического бактериологического анализатора. Молекулярно-биологический анализ, включая выделение ДНК из гемокультуры, и учет результатов реакции проводится в соответствии с инструкцией по применению наборов реагентов для обнаружения ДНК бактерий и грибов рода *Candida*, а также наборов для определения генов приобретенных карбапенемаз и метициллинрезистентности бактерий.

Алгоритм выявления и видовой идентификации бактерий, схематично представленный на рисунке 1, состоит в следующем: производится посев и культивирование крови в бактериологическом анализаторе. При наличии роста, из флакона, содержащего положительную гемокультуру, отбирается проба для проведения родовой и видовой идентификации молекулярно-биологическим методом. Если выявляются грамотрицательные бактерии, то пробу дополнительно тестируют на наличие карбапенемаз; при выявлении *Staphylococcus spp.*, проводится дополнительное тестирование для определения метициллин-резистентности, после чего общий результат анализа сообщается врачу. При отсутствии роста в течение 7 суток врачу сообщается результат — «роста нет».

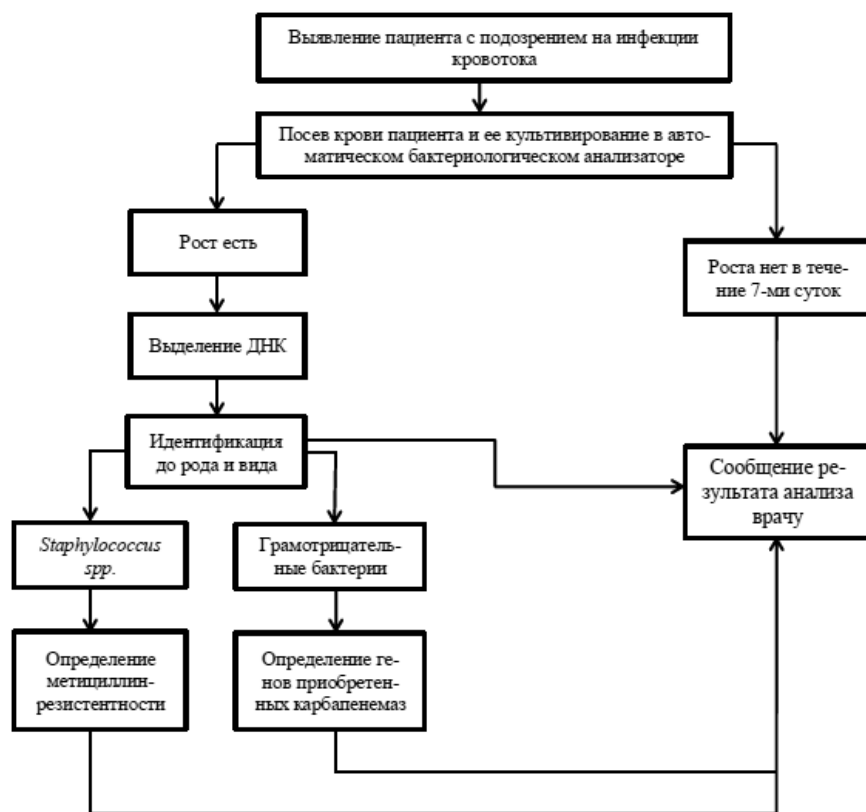


Рисунок 1. Алгоритм выявления и видовой идентификации бактерий, выявленных в гемокультурах.

4.2. Методика оценки состояния гемостаза

Для прогнозирования развития синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови (ДВС-синдрома) у детей с ГИЗ проводят интегральную оценку функционального состояния системы гемостаза с помощью теста генерации тромбина.

Материалы

Анализ проводят на образцах плазмы, полученной из кубитальной вены самотеком в пробирки типа Vacuett, содержащие 3,2% раствор цитрата натрия основного в молярной концентрации 0,109, при соотношении антикоагулянта и крови 1:9. Кровь центрифугируют при комнатной температуре в два этапа: после 10 минут при 130g отбирают полученную плазму и центрифугируют вторично 30 минут при 2500g. После этого полученные образцы аликвотируют и хранят при температуре -70°C до момента проведения исследования.

Реактивы

Выполнение теста генерации тромбина осуществляют с использованием следующих реактивов производства «Thrombinoscope bv», Нидерланды:

- триггерный реагент «PPP-Reagent-TM» — смесь рекомбинантного человеческого тканевого фактора (rh-TF) и отрицательно заряженных прокоагулянтных фосфолипидов (фосфатидилсерина 20%, фосфатидилэтаноламина 20% и фосфатидилхолина 60%) в конечной концентрации 5 пМоль и 4 мМоль, соответственно;
- триггерный реагент «PPP-Reagent + TM» с добавлением рекомбинантного человеческого тромбомодулина (rh-TM);
- «Thrombin Calibrator» — тромбиновый калибратор (синтетический аналог тромбина с заведомо известной активностью, высокоспецифичный к добавляемому в реакцию субстрату);
- «Fluo-Substrate» — специфичный тромбину, медленно реагирующий флюорогенный субстрат;
- «Fluo-Buffer», содержащий хлорид кальция.

В качестве контрольного материала используется аликвотированная пулированная плазма от 20 доноров крови.

Оборудование

- иглы инъекционные диаметром 0,9 мм;
- перчатки резиновые хирургические;

- вакуумные пробирки типа Vacuett;
- полипропиленовые центрифужные пластиковые пробирки объемом 12 мл;
- дозаторы пипеточные переменного объема одноканальные (типа Биохит, Финляндия) со сменными наконечниками (5–1000 мкл, допустимая погрешность до 2,5 %);
- центрифуга лабораторная настольная, поддерживающая режим центрифугирования с ускорением 130 и 2500g;
- пробирки пластиковые типа Эппендорф объемом 1,5 мл;
- 96-луночный планшет типа Immulon 2HB производства «ТермоФишер Саентифик», США;
- планшетный флуориметр, оборудованный диспенсером, типа Флуроскан Асцент производства ТермоФишер Саентифик, Финляндия (с прилагаемым программным обеспечением Thrombinoscope®, версия 3.0.0.26.). Длина волны экстинкции составляет 390 нм, эмиссии — 460 нм.

Подготовка к выполнению исследования

Перед началом работы во флаконы с триггерными реагентами и калибратором добавляют по 1 мл дистиллированной воды и выдерживают 30 минут. Образцы плазмы размораживают, постановку осуществляют в дублях.

В первые две лунки горизонтального ряда планшета помещают по 20 мкл раствора триггерного реагента, не содержащего тромбомодулин (rh-TM -), в соседние две лунки — по 20 мкл раствора триггерного реагента с тромбомодулином (rh-TM +), и в следующие две лунки — по 20 мкл раствора тромбинового калибратора (Cal) (рисунок 2).

rh-TM -	rh-TM -	rh-TM +	rh-TM +	Cal	Cal	rh-TM -	rh-TM -	rh-TM +	rh-TM +	Cal	Cal
rh-TM -	rh-TM -	rh-TM +	rh-TM +	Cal	Cal	rh-TM -	rh-TM -	rh-TM +	rh-TM +	Cal	Cal
rh-TM -	rh-TM -	rh-TM +	rh-TM +	Cal	Cal	rh-TM -	rh-TM -	rh-TM +	rh-TM +	Cal	Cal
rh-TM -	rh-TM -	rh-TM +	rh-TM +	Cal	Cal	rh-TM -	rh-TM -	rh-TM +	rh-TM +	Cal	Cal
rh-TM -	rh-TM -	rh-TM +	rh-TM +	Cal	Cal	rh-TM -	rh-TM -	rh-TM +	rh-TM +	Cal	Cal
rh-TM -	rh-TM -	rh-TM +	rh-TM +	Cal	Cal	rh-TM -	rh-TM -	rh-TM +	rh-TM +	Cal	Cal
rh-TM -	rh-TM -	rh-TM +	rh-TM +	Cal	Cal	rh-TM -	rh-TM -	rh-TM +	rh-TM +	Cal	Cal
rh-TM -	rh-TM -	rh-TM +	rh-TM +	Cal	Cal	rh-TM -	rh-TM -	rh-TM +	rh-TM +	Cal	Cal

Рисунок 2. Расположение реактивов в 96-луночном планшете.

Проведение исследования

После этого в лунки с триггерными реагентами и калибратором добавляют по 80 мкл исследуемой плазмы (в исследовании одного

образца плазмы задействованы 6 лунок) в соответствии с протоколом исследования, созданном с помощью программного обеспечения. Таким образом, за одну постановку выполняется исследование 15 плазм и 1 контрольного материала (рисунок 3).

Образец 1	Образец 1	Образец 1	Образец 1	Образец 1	Образец 1	Образец 9	Образец 9	Образец 9	Образец 9	Образец 9	Образец 9
Образец 2	Образец 2	Образец 2	Образец 2	Образец 2	Образец 2	Образец 10	Образец 10	Образец 10	Образец 10	Образец 10	Образец 10
Образец 3	Образец 3	Образец 3	Образец 3	Образец 3	Образец 3	Образец 11	Образец 11	Образец 11	Образец 11	Образец 11	Образец 11
Образец 4	Образец 4	Образец 4	Образец 4	Образец 4	Образец 4	Образец 12	Образец 12	Образец 12	Образец 12	Образец 12	Образец 12
Образец 5	Образец 5	Образец 5	Образец 5	Образец 5	Образец 5	Образец 13	Образец 13	Образец 13	Образец 13	Образец 13	Образец 13
Образец 6	Образец 6	Образец 6	Образец 6	Образец 6	Образец 6	Образец 14	Образец 14	Образец 14	Образец 14	Образец 14	Образец 14
Образец 7	Образец 7	Образец 7	Образец 7	Образец 7	Образец 7	Образец 15	Образец 15	Образец 15	Образец 15	Образец 15	Образец 15
Образец 8	Образец 8	Образец 8	Образец 8	Образец 8	Образец 8	Контроль	Контроль	Контроль	Контроль	Контроль	Контроль

Рисунок 3. Расположение исследуемых плазм в 96-луночном планшете.

Подготовленный планшет с исследуемыми плазмами загружается в прибор и инкубируется 10 минут при 37°С. В это время подготавливается смесь из реагентов «Fluo-Buffer» (предварительно прогретого до 37°С) и «Fluo-Substrate» в количестве 3200 и 80 мкл соответственно. По окончании инкубации приготовленная смесь автоматически добавляется в каждую лунку планшета с помощью диспенсера, после чего немедленно запускается измерение флуоресценции через 20-секундные интервалы на протяжении всего процесса генерации тромбина. Построение и расчет показателей кривых генерации тромбина производится, исходя из первичных данных изменения флуоресценции во времени, с помощью программного обеспечения Thrombinoscope®.

После калибровки результатов ТГТ, которая производится автоматически путем сопоставления сигналов, получаемых из лунки с исследуемым образцом и лунки с калибратором, программным обеспечением выстраивается кривая генерации тромбина. Для оценки результатов, отражающих количественные и динамические характеристики генерации тромбина, используют параметры кривой, представленные на рисунке 4.

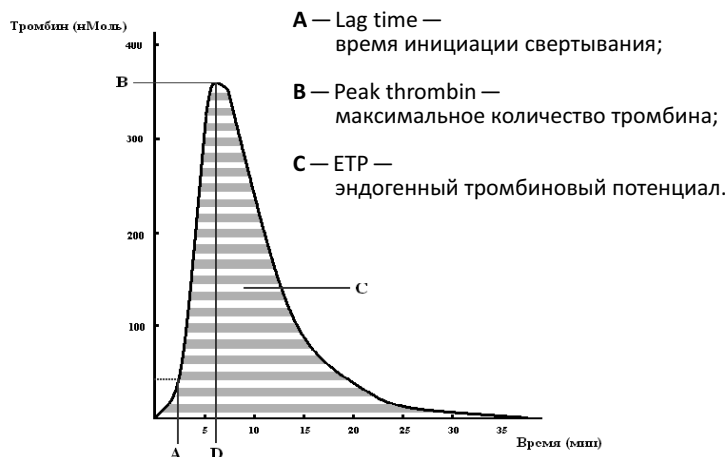


Рисунок 4. Кривая генерации тромбина и измеряемые параметры.

В кривой генерации тромбина оценивают следующие показатели:

- Lag time (время запаздывания, мин) — время, измеренное от момента внесения смеси флюорогенного субстрата и ионизированного кальция в лунку с образцом и активатором, до момента отклонения флюоресцентного сигнала от основной горизонтальной линии более чем на 2 стандартных отклонения; характеризует начало образования тромбина достаточного для образования первых нитей фибрина;
- Peak thrombin (пиковое количество тромбина, нМоль) — максимальное количество тромбина, образующееся в процессе его генерации в образце плазмы;
- Time to peak, обозначаемый как ttPeak (время достижения пика, мин), — время, за которое в образце образуется максимальное количество тромбина;
- Endogenous thrombin potential, обозначаемый как ЕТР (эндогенный тромбиновый потенциал, нМоль*мин), измеряется площадью под кривыми генерации тромбина.

Кроме того, существуют и расчетные показатели, характеризующие процесс генерации тромбина:

Чувствительность к тромбомодулину (%) определяется следующим образом: из значений ЕТР, Peak thrombin, полученных в постановке без добавления тромбомодулина, вычитается значение ЕТР, и Peak thrombin соответственно, полученное в параллельной постановке с добавлением тромбомодулина, и полученная разница делится на значение ЕТР или Peak thrombin в постановке без добавления тромбомодулина:

$$\text{Чувствительность к тромбомодулину} = \frac{ETP_{(без\ rh-TM)} - ETP_{(с\ rh-TM)}}{ETP_{(без\ rh-TM)}} \times 100\%$$

$$\text{Чувствительность к тромбомодулину} = \frac{Peak\ thrombin_{(без\ rh-TM)} - Peak\ thrombin_{(с\ rh-TM)}}{Peak\ thrombin_{(без\ rh-TM)}} \times 100\%$$

4.3. Методика проведения молекулярно-генетического исследования полиморфизма генов плазменных факторов гемостаза и провоспалительных цитокинов

Для прогнозирования тяжести течения ДВС-синдрома и риска развития ПОН у детей с ГИЗ проводят идентификацию аллельного полиморфизма генов, кодирующих плазменные факторы гемостаза (F1-A, F1-V, FXIII-A, PAI-1, TPA) и провоспалительные цитокины (IL-6, IL-1B, TNF-A). Для генотипирования рекомендуется использовать описанный ниже метод ПЦР-ПДРФ, основанный на проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим анализом длин фрагментов, полученных в результате обработки продуктов ПЦР с помощью специфических эндонуклеаз рестрикции (рестриктаз).

Материалы

Анализ проводится на образцах венозной или капиллярной крови, стабилизированной ЭДТА или цитратом натрия. Возможно проведение генотипирования как непосредственно после отбора крови, так и после ее хранения в соответствующих условиях. Допускается хранить пробирку с кровью в течение не более 1-х суток при комнатной температуре, в течение не более 3-х суток — при температуре от +2 °С до +8 °С, либо в течение не более 3-х месяцев при температуре от -18 °С до -25 °С (не допуская размораживания).

Реактивы и оборудование

- аппарат для проведения ПЦР в пробирках объемом 0,5–0,6 мл;
- пробирки для ПЦР объемом 0,6 мл;
- дозаторы полуавтоматические одноканальные с переменным объемом со сменяемыми наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,5–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (ошибка не более 3%), и подходящие к ним наконечники с фильтрами;
- центрифуга гематокритная;
- микроцентрифуга, развивающая ускорение 12 000 g;
- смеситель вихревой;
- твердотельный термостат, поддерживающий заданную температуру от +20 °С до +95 °С;
- система гель-документации;
- суховоздушный термостат, поддерживающий заданную температуру от +25 °С до +60 °С;
- спектрофотометр, позволяющий проводить измерение оптической плотности раствора при длинах волн 260 нм и 280 нм;
- пробирки полипропиленовые вместимостью 15 мл;
- пробирки полипропиленовые вместимостью 500 мкл;
- пробирки полипропиленовые вместимостью 1500 мкл;
- штативы для пробирок объемом 500 мкл и 1500 мкл;
- лабораторный холодильник с морозильной камерой, обеспечивающей поддержание температуры в пределах от -20 °С до -25 °С;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- перчатки резиновые хирургические;
- трис-аминометан;
- натрия хлорид;
- натрия додецилсульфат;
- агароза;
- акриламид;
- масло минеральное;
- метилен-бис-акриламид;
- аммония персульфат;
- аммония хлорид;
- протеиназа К;
- натрия этилендиаминтетраацетат (ЭДТА);
- термостабильная Taq-полимераза;
- 10-кратный буфер для Taq-полимеразы, содержащий магния хлорид;

- дезоксирибонуклеотидтрифосфаты (dANTP, dTTP, dCTP, dGTP);
- олигонуклеотиды;
- эндонуклеазы рестрикции;
- этидиум бромид.

Выделение геномной ДНК из лейкоцитов периферической венозной крови

Для выделения геномной ДНК из периферических лейкоцитов использовали метод, описанный в литературе [42]. К 3–4 мл периферической венозной крови, стабилизированной ЭДТА в конечной концентрации 0,25% или трехзамещенным основным цитратом натрия в конечной концентрации 0,38% и перелитой после перемешивания в пробирки вместимостью 15 мл, необходимо добавить 10 мл холодного (+4 °С) 0,83% раствора аммония хлорида. После этого перемешать содержимое переворачиванием пробирки в течение 30 секунд и оставить при комнатной температуре на 10–15 минут (лизис эритроцитов). Затем центрифугировать пробирку в течение 10 минут при 2000g, надосадочную жидкость (супернатант) слить и добавить к осадку лейкоцитов 2,5 мл раствора, содержащего 10 мМ Трис-НСl, pH 8,0; 0,4 М NaCl; 2 мМ ЭДТА; 0,5% додецилсульфат натрия (SDS) и протеиназу К в конечной концентрации 125 мкг/мл. Смесь инкубировать в течение 2–3 суток при 37 °С. После полного лизиса лейкоцитов добавить в пробирку 1 мл 5 М NaCl с последующим интенсивным перемешиванием на встряхивателе и центрифугированием в течение 20 мин при 5500g. Аккуратно, не затрагивая верхнюю пленку и плотный осадок, отобрать супернатант в стерильный стеклянный стаканчик на 50 мл или бакпечатку. Осадить ДНК из надосадочной жидкости добавлением 5 мл 96% этилового спирта, намотать ее на стеклянную палочку и после высушивания при комнатной температуре в течение 5–10 минут растворить в 200 мкл бидистиллированной воды. После растворения ДНК в течение суток при +4 °С определить ее концентрацию путем измерения оптической плотности на спектрофотометре при длине волны 260 нм. При необходимости исходные образцы ДНК развести до концентрации 50–100 нг/мкл с помощью бидистиллированной воды перед проведением ПЦР.

Выделение геномной ДНК из лейкоцитов капиллярной крови

Капиллярную кровь в объеме 200–250 мкл отобрать в пробирку на 1500 мкл, содержащую 30 мкл 2,5% раствора ЭДТА, и сразу добавить 1 мл холодного (+4 °С) 0,83% раствора аммония хлорида. Перемешать содержимое пробирки ее переворачиванием в течение 30 секунд и оставить пробирку при комнатной температуре на 10–15 минут. Центрифугировать пробирку в течение 10 минут при 2000g, су-

пернатант слить или удалить с помощью водоструйного насоса. Добавить к осадку лейкоцитов 250 мкл раствора, содержащего 10 мМ Трис-HCl, pH 8,0; 0,4 М NaCl; 2 мМ ЭДТА; 0,5 % SDS и протеиназу К в конечной концентрации 125 мкг/мл. После инкубации смеси в течение 16–24 часов при 37 °С или 2–3 часов при 55–60 °С (до полного лизиса лейкоцитов) добавить в пробирку 100 мкл 5 М раствора NaCl и тщательно перемешать на встряхивателе. Затем центрифугировать в течение 15 мин при 12 000g и отобрать супернатант (200–300 мкл) в стерильную пробирку на 1500 мкл. Добавить к нему 500 мкл 96 % этилового спирта и перемешать переворачиванием пробирки 5–6 раз. Центрифугировать 10 мин при 12 000g, затем аккуратно удалить супернатант. Добавить 1 мл 70 % этилового спирта комнатной температуры и перемешать на встряхивателе в течение 20–30 секунд. Центрифугировать в течение 3 мин при 12 000g, после чего аккуратно удалить супернатант. Высушить осадок ДНК на твердотельном термостате при 60–65 °С до полного испарения спирта и растворить в 120 мкл бидистиллированной воды в течение 16–24 часов при +4 °С. Полученный образец ДНК можно использовать без разведения для постановки ПЦР. Перед постановкой ПЦР рекомендуется все образцы ДНК прогревать при 60–65 °С в течение 30 минут.

Проведение исследования

В таблице 1 приведены гены и варианты их аллельного полиморфизма, которые исследуются в данной методике. Типирование полиморфизма проводят на основе амплификации ДНК *in vitro* с помощью ПЦР. Подробно условия проведения ПЦР для каждого гена описаны в библиографических источниках, указанных в таблице 1. Для идентификации аллельных вариантов гена ТРА непосредственно после окончания ПЦР проводят разделение продуктов реакции методом электрофореза в 7 % полиакриламидном геле (допускается проведение анализа в 2–3 % агарозном геле).

Таблица 1

Исследуемые генетические варианты и методы их идентификации

Ген (сокращение)	Полиморфизм	Неблагоприятные генотипы	Метод	Источник
Гены плазменных факторов гемостаза:				
Фактор I, β-субъединица (F1-B)	-455 G/A	-455 G/A -455 A/A	ПЦР-ПДРФ	[43]
Ингибитор активатора плазминогена типа I (PAI-1)	-675 4G/5G	-675 4G/4G	ПЦР-ПДРФ	[44]

Продолжение таблицы

Тканевой активатор плазминогена (ТРА)	311 п.н. Ins/Del	Del/Del	ПЦР	[45]
Фактор I, α-субъединица (F1-A)	4266 A/G	4266 G/G	ПЦР-ПДРФ	[46]
Фактор XIII, A-субъединица (FXIII-A)	163 G/T	163 T/T	ПЦР-ПДРФ	[47]
Гены провоспалительных цитокинов:				
Фактор некроза опухоли-альфа (TNFA)	-308 G/A	-308 G/A -308 A/A	ПЦР-ПДРФ	[48]
Интерлейкин-6 (IL-6)	-176 G/C	-176 C/C	ПЦР-ПДРФ	[49]
Интерлейкин-1β (IL-1β)	-31 T/C	-31 C/C	ПЦР-ПДРФ	[50]

В остальных случаях для выявления однонуклеотидных замен используется метод ПЦР-ПДРФ, предполагающий обработку ПЦР-продукта специфической эндонуклеазой рестрикции. После проведения рестрикционного анализа фрагменты ДНК разделяют электрофорезом в 7 % (а для полиморфизма генов F1-A и PAI-1 — в 10 %) полиакриламидном геле.

Проведение ПЦР и рестрикционного анализа

Общий объем реакционной смеси составляет 15 мкл. Для постановки ПЦР в пробирку объемом 0,6 мл последовательно вносят: 7 мкл бидистиллированной воды, 3 мкл смеси дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (концентрация каждого в смеси — 1 мМ), 1,5 мкл смеси олигонуклеотидов (концентрация каждого в смеси — 5 мкМ), 1,5 мкл 10-кратного буфера для Taq-полимеразы, содержащего магния хлорид, 0,2 мкл Taq-полимеразы (5 ед/мкл) и 2 мкл образца геномной ДНК (в концентрации 50–100 нг/мкл). Сверху накладывают 30–40 мкл минерального масла и помещают пробирку в термоциклер. Далее проводят ПЦР в условиях, которые подробно описаны в указанных в таблице 1 источниках. После проведения 40 циклов ПЦР количество и качество образовавшегося продукта анализируют путем электрофореза аликвоты (3 мкл) в 2 % агарозном геле. К оставшемуся в ПЦР-пробирке продукту добавляют 8 мкл рестрикционной смеси, содержащей 6 мкл бидистиллированной воды, 2 мкл 10-кратного буфера и 10–15 ед. соответствующей эндонуклеазы рестрикции. После инкубации в течение 16–20 часов при 37 °С или 55 °С (в зависимости от условий, рекомендуемых производителем для каждой эндонуклеазы рестрикции) продукты

анализируют с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. По окончании электрофореза гель окрашивают с помощью раствора этидиума бромиды в концентрации 1 мкг/мл и визуализируют фрагменты ДНК на трансиллюминаторе. После документирования результатов анализа с помощью системы гель-документации проводят оценку генотипа анализируемых образцов геномной ДНК по количеству и размерам образовавшихся фрагментов рестрикции.

Оценка результатов

При оценке результатов идентификации полиморфизма генов плазменных факторов гемостаза и провоспалительных цитокинов необходимо учитывать наличие у пациента неблагоприятных генотипов, указанных в *таблице 1*. Данные генетические варианты ассоциированы с повышенной склонностью индивида к протромботическим сдвигам в системе гемостаза и риском развития ДВС-синдрома. Генотип TPA Del/Del, ассоциированный со сниженной продукцией тканевого активатора плазминогена, является маркером неблагоприятного течения ГИЗ и развития СПОН, тогда как у гетерозигот по гену TPA (Ins/Del) риск возникновения данного осложнения существенно ниже. Генотип PAI-1 4G/4G также связан со снижением фибринолитической активности плазмы крови и должен расцениваться как фактор риска неблагоприятного течения ДВС-синдрома.

При оценке риска развития СПОН у детей с ГИЗ наиболее информативным является комплексный анализ генотипа пациента, предполагающий проведение генотипирования полиморфизма всех указанных в *таблице 1* генов. Сочетание в генотипе большого двух и более неблагоприятных вариантов изученных генов является наиболее значимым показателем для прогнозирования тяжелого течения ДВС-синдрома и риска развития ПОН у детей с ГИЗ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эффективность лечения генерализованных инфекций у детей во многом определяется правильностью выбора начальной терапии и максимально короткими сроками ее назначения. При ГИЗ первоочередной задачей является идентификация возбудителя, а также установление его особенностей, способных вызвать резистентность к тому или иному виду антибактериальной терапии. Предлагаемая в данных рекомендациях методика позволяет существенно сократить сроки проведения идентификации микроорганизмов в гемокультуре и определения генов антибиотикорезистентности (от 48 и более до 5–7 часов). Результаты, полученные бактериологическим и молекулярно биологическим методами, хорошо согласуются.

Используемые сегодня рутинные коагулологические тесты далеко не всегда отражают степень активации гемостаза, в том числе, и уровень тромбинемии, что не позволяет эффективно и своевременно проводить раннюю диагностику ДВС-синдрома. В отличие от них, ТГТ позволяет количественно оценить динамику образования тромбина с учётом не только про-, но и антикоагулянтных реакций, направленных на ограничение этого процесса. Анализ возможности использования этого метода для оценки уровня тромбинемии показал его эффективность при проведении ранней диагностики и прогнозировании характера течения ДВС-синдрома у детей с ГИЗ. Преимуществом данного метода, по сравнению с традиционными тестами для оценки степени активации системы гемостаза, является возможность выявления нарушений в антикоагулянтной системе протеина С, угнетение которой признано важным механизмом развития ДВС-синдрома на фоне ГИЗ.

Известно, что тромбогеморрагические расстройства характеризуются значительной гетерогенностью клинических проявлений. Это связано, в том числе, с индивидуальными биохимическими особенностями функционирования системы гемостаза и родственных с ней систем, возникающими вследствие генетической вариативности, или полиморфизма, большинства вовлеченных компонентов. Наибольший интерес при установлении прогностических критериев ДВС-синдрома представляет изучение аллельного полиморфизма генов компонентов плазменного звена гемостаза, в том числе, влияющих на процесс стабилизации и лизиса фибринового сгустка, а также генов провоспалительных цитокинов. Результаты проведенного нами исследования позволяют говорить о возможности практического применения результатов генотипирования детей с ГИЗ с целью прогнозирования характера течения ДВС-синдрома и риска развития СПОН. Комплексная оценка

генотипа, включающая анализ аллельного полиморфизма восьми изученных генов, является в данном случае наиболее информативной. Наличие в генотипе двух и более неблагоприятных вариантов изученных генов ассоциировано с тяжелым течением ДВС-синдрома и риском развития СПОН. Кроме того, результаты исследования показали, что полиморфизм гена ТРА может в некоторой степени определять характер течения ДВС-синдрома у детей с ГИЗ. В частности, генотип ТРА Del/Del может являться самостоятельным маркером неблагоприятного течения заболевания и развития ПОН.

Таким образом, представленные в методических рекомендациях методы позволяют оценить риск возникновения и прогноз течения ДВС-синдрома и существенно ускорить его диагностику на ранних стадиях у детей с ГИЗ, что способствует повышению эффективности лечения больных детей и снижению вероятности неблагоприятных исходов, обусловленных, в частности, синдромом полиорганной недостаточности.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Gaieski D. E. Benchmarking the Incidence and mortality of severe sepsis in the United States // *Crit. Care Medicine*. — 2013. — Vol. 41, № 5. — P. 1167–1174.
2. Sepsis definitions: time for change / J-L. Vincent, S. M. Opal, J. C. Marshall et al. // *Lancet*. — 2013. — Vol. 381. — P. 774–775.
3. Pediatric severe sepsis: current trends and outcomes from the Pediatric Health Information Systems database / A. Ruth, C. McCracken, J. Fortenberry, M. Hall, H. Simon, K. Hebbar // *Pediatr. Crit. Care Medicine*. — 2014. — Vol. 15. — P. 828–838.
4. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock / A. Kumar, D. Roberts, K. E. Wood et al. // *Crit. Care Medicine*. — 2006. — Vol. 34. — P. 1589–1596.
5. Delayed antimicrobial therapy increases mortality and organ dysfunction duration in pediatric sepsis / S. L. Weiss, J. C. Fitzgerald, F. Balamuth et al. // *Crit. Care Medicine*. — 2014. — Vol. 42. — P. 2409–2417.
6. Совершенствование лабораторных методов раннего выявления и видовой идентификации бактерий и микромицетов в крови с использованием ПЦР в режиме «реального времени» / Е. Е. Киселева, Е. И. Кайтанджан, Н. П. Стижак и соавт. // *Медицина экстремальных ситуаций*. — 2018. — Т. 20. — № 1. — С. 64–70.
7. Момот А. П. Патология гемостаза. Принципы и алгоритмы клинико-лабораторной диагностики. — СПб. ФормаТ, 2006. — 208 с.
8. Кречетова А. В., Галстян Г. М., Васильева С. А. Система свертывания крови при сепсисе // *Гематология и трансфузиология*. — 2010. — Т. 55, № 5. — С. 20–34.
9. Bannerman D. D., Goldblum S. E. Mechanisms of bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial apoptosis // *Am J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* — 2003. — Vol. 284. — P. 899–914.
10. Dysfunction of endothelial protein C activation in severe meningococcal sepsis / S. N. Faust, M. Levin, O. B. Harrison et al. // *N. Engl. J. Med.* — 2001. — Vol. 345. — P. 408–416.
11. McGill S. N., Ahmed N. A., Christou N. Increased plasma von Willebrand factor in the systemic inflammatory response syndrome is derived from generalized endothelial cell activation // *Crit. Care Med.* — 1998. — Vol. 26. — P. 296–300.
12. Levi M., Poll T., Schultz M. Systemic versus localized coagulation activation contributing to organ failure in critically ill patients // *Semin. Immunopathol.* — 2012. — Vol. 34. — P. 167–179.

13. Hemker H. C., Dieri R. Al., Béguin S. Thrombin generation assays: accruing clinical relevance // *Curr. Opin. Hematol.* — 2004. — Vol. 11. — P. 170–175.
14. Van Veen J. J., Gatt A., Makris M. Thrombin generation testing in routine clinical practice: are we there yet? // *British J. of Haemat.* — 2008. — Vol. 142. — P. 889–903.
15. Elevated endogenous thrombin potential is associated with an increased risk of a first deep venous thrombosis but not with the risk of recurrence / A. Hylckama, S. Christiansen, R. Luddington et al. // *British J. of Haemat.* — 2007. — Vol. 138. — P. 769–774.
16. Aird. W. C. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome // *Blood.* — 2003. — Vol. 101. — P. 3765–3777.
17. Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system / H. C. Hemker, R. Al. Dieri, E. Smedt et al. // *Thromb. Haemost.* — 2006. — Vol. 96. — P. 553–561.
18. Dieri Al. R., Laat B., Hemker H. C. Thrombin generation: what have we learned? // *Blood.* — 2012. — Vol. 26. — P. 197–203.
19. Воробьева Н. А., Капустин С. И. Роль генетического мониторинга системы гемостаза при тяжелом течении острого ДВС-синдрома // *Экология человека.* — 2005. — № 12. — С. 25–30.
20. Воробьева Н. А., Капустин С. И. Роль генетических полиморфизмов системы гемостаза в формировании полиорганной недостаточности при остром ДВС-синдроме // *Анестезиология и реаниматология.* — 2007. — № 2. — С. 55–57.
21. Differential expression of leukocyte receptors in disseminated intravascular coagulation: prognostic value of low protein C receptor expression / J. Y. Sung, J. E. Kim, K. S. Kim et al. // *Thromb. Res.* — 2014. — Vol. 134. — P. 1130–1134.
22. Decreased thrombomodulin mRNA expression on peripheral monocytes in disseminated intravascular coagulation patients relates to poor outcomes: the ex vivo effects of lipopolysaccharide and thrombin on monocyte thrombomodulin and CD14 mRNA / S. K. Hong, J. E. Kim, K. S. Han, H. K. Kim // *Thromb Res.* — 2013. — Vol. 132. — P. 392–397.
23. Serum thrombomodulin as a prognostic marker of disseminated intravascular coagulation / N. Kotajima, T. Kanda, Y. Fukumura, I. Kobayashi // *J. Med.* — 1999. — Vol. 30. — P. 19–29.
24. 4G4G genotype of the plasminogen activator inhibitor-1 promoter polymorphism associates with disseminated intravascular coagulation in children with systemic meningococemia / A. Binder, G. Endler, M. Müller et al. // *J. Thromb. Haemost.* — 2007. — Vol. 5. — P. 2049–2054.
25. A functional single nucleotide polymorphism in the thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) gene associates with outcome of meningococcal disease / J. A. Kremer Hovinga, R. F. Franco, M. A. Zago et al. // *J. Thromb. Haemost.* — 2004. — Vol. 2. — P. 54–57.
26. Геном человека и гены “предрасположенности”. (Введение в предиктивную медицину) / В. С. Баранов, Е. В. Баранова, Т. Э. Иващенко, М. В. Асеев // *СПб.: Интермедика.* — 2000. — 272 с.
27. Variation in the promoter region of the b fibrinogen gene is associated with plasma fibrinogen levels in smokers and non-smokers / A. Thomas, F. Green, C. Kelleher et al. // *Thromb. Haemost.* — 1991. — Vol. 65. — P. 487–490.
28. Dalmon J., Laurent M., Courtois G. The human b fibrinogen promoter contains a hepatocyte nuclear factor 1-dependent interleukin-6-responsive element // *Mol. Cell. Biol.* — 1993. — Vol. 13. — P. 1183–1193.
29. Fibrinogen-beta gene haplotype is associated with mortality in sepsis / Manocha S., Russell J. A., Sutherland A. M. et al. // *J. Infect.* — 2007. — Vol. 54. — P. 572–577.
30. Carter A. M., Catto A. J., Grant P. J. The association of the α -fibrinogen Thr312Ala polymorphism with post-stroke mortality in subjects with atrial fibrillation // *Circulation.* — 1999. — Vol. 99. — P. 2423–2426.
31. Jern C., Ladenvall P., Wall U., Jern S. Gene polymorphism of t-PA is associated with forearm vascular release rate of t-PA // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 1999. — Vol. 19. — P. 454–459.
32. The relationship between the tissue plasminogen activator Alu I/D polymorphism and venous thromboembolism during pregnancy / W. C. Hooper, M. El-Jamil, A. Dilley et al. // *Thromb. Res.* — 2001. — Vol. 102. — P. 33–37.
33. The two allele sequences of a common polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene respond differently to interleukin-1 in HepG2 cells // *J. Biol. Chem.* — 1993. — Vol. 268. — P. 10739–10745.
34. 4G/5G polymorphism of PAI-1 gene is associated with multiple organ dysfunction and septic shock in pneumonia induced severe sepsis: prospective, observational, genetic study / K. Madách, I. Aladzsity, A. Szilágyi et al. // *Crit. Care.* — 2010. — Vol. 14. — P. R79.
35. Factor XIII Val34Leu polymorphism in primary intracerebral haemorrhage / J. Corral, J. A. Iniesta, R. González-Conejero et al. // *Hematol. J.* — 2000. — Vol. 4. — P. 269–273.
36. Franchini M., Lippi G., Manzato F. Recent acquisitions in the pathophysiology, diagnosis and treatment of disseminated intravascular coagulation // *Thromb. J.* — 2006. — Vol. 4. — P. 4.

37. Esmon CT. The impact of the inflammatory response on coagulation // *Thromb. Res.* — 2004. — Vol. 114. — P. 321–327.
38. Grignani G., Maiolo A. Cytokines and hemostasis // *Haematologica.* — 2000. — Vol. 85. — P. 967–972.
39. Analysis of inflammation- and atherosclerosis-related gene / I. Steinbrugger, A. Haas, R. Maier et al. // *Molecular Vision.* — 2009. — Vol. 15. — P. 609–618.
40. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 β gene with secretion of interleukin-1 β protein / S. K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel et al. // *Arthritis & Rheumatism.* — 2004. — Vol. 50. — P. 1976–1983.
41. Genotype at a promoter polymorphism of the interleukin-6 gene is associated with baseline levels of plasma C-reactive protein / M. A. Vickers, F. R. Green, C. Terry et al. // *Cardiovascular Research.* — 2002. — Vol. 53. — P. 1029–1034.
42. Miller S. A., Dykes D. D., Polesky H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells // *Nucl. Acid. Res.* — 1988. — Vol. 16. — P. 1215–1218.
43. Variation in the promoter region of the b fibrinogen gene is associated with plasma fibrinogen levels in smokers and non-smokers / A. Thomas, F. Green, C. Kelleher et al. // *Thromb. Haemost.* — 1991. — Vol. 65. — P. 487–490.
44. An alternative method for PAI-1 promoter polymorphism (4G/5G) typing / M. Margaglione, E. Grandone, G. Cappucci et al. // *Thromb. Haemost.* — 1997. — Vol. 77. — P. 605–606.
45. The relationship between the tissue plasminogen activator Alu I/D polymorphism and venous thromboembolism during pregnancy / W. C. Hooper, M. El-Jamil, A. Dilley et al. // *Thromb. Res.* — 2001. — Vol. 102. — P. 33–37.
46. Carter A. M., Catto A. J., Grant P. J. The association of the α -fibrinogen Thr312Ala polymorphism with post-stroke mortality in subjects with atrial fibrillation // *Circulation.* — 1999. — Vol. 99. — P. 2423–2426.
47. Factor XIII Val34Leu polymorphism in primary intracerebral haemorrhage / J. Corral, J. A. Iniesta, R. González-Conejero et al. // *Hematol. J.* — 2000. — Vol. 4. — P. 269–273.
48. Tumor necrosis factor alpha G—>A–238 and G—>A–308 polymorphisms in juvenile idiopathic arthritis / S. Ozen, M. Alikasifoglu, A. Bakkaloglu et al. // *Rheumatology.* — 2002. — Vol. 41. — P. 223–227.
49. Genotype at a promoter polymorphism of the interleukin-6 gene is associated with baseline levels of plasma C-reactive protein /

M. A. Vickers, F. R. Green, C. Terry et al. // *Cardiovascular Research.* — 2002. — Vol. 53. — P. 1029–1034.

50. A functional polymorphism in the IL1B gene promoter, IL1B –31C>T, is not associated with cerebral malaria in Thailand / J. Ohashi, I. Naka, A. Doi et al. // *Malar. J.* — 2005. — Vol. 4. — P. 38.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
1. Нормативные ссылки	9
2. Термины и определения	10
3. Обозначения и сокращения.....	11
4. Методики проведения исследований.....	12
 Заключение	 25
 Библиография	 27

Методические рекомендации

**МЕТОДЫ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ
И ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ДВС-синдрома
ПРИ ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ
ЗАБОЛЕВАНИЯХ У ДЕТЕЙ**

Технический редактор: *Кронберг Т. В.*
Компьютерная верстка: *Дмитриева О. С.*

Бумага офсетная «Светокопи». Печать офсетная.
Гарнитура «Calibri». Подписано в печать 15.10.2019 г.
Печ. л. 4. Формат 60×90¹/₁₆.
Тираж 500 экз. Заказ № 413.

Отпечатано в типографии ООО «Типография «Победа»».
191167, Санкт-Петербург, наб. Обводного канала, д. 23, лит. «Б».
Тел.: (812) 612-40-92, 612-40-93
E-mail: vit-print@mail.ru