

Диагностика в диалоге



**Контроль аналитического качества
клинических исследований:
задачи и возможности
современных лабораторий**

**Логистика как часть
комплексного решения**

**1981–2016: эволюция подходов
к излечению ВИЧ-инфекции**

Уважаемые читатели!

У всех сотрудников группы компаний Рош, в какой бы стране мира мы ни работали, одно общее кредо: предлагать инновационные продукты и решения, чтобы предотвращать, диагностировать и лечить заболевания. Мы хотим значительно улучшить качество жизни пациентов.

Наша цель – двигать медицину вперед. И что может быть на этом пути вернее, чем бороться со многими типами и категориями заболеваний, для которых пока не существует лечения?

Всемирная организация здравоохранения классифицирует около 12 400 из 20 000 известных заболеваний. Есть тысячи заболеваний, для которых пока не существует адекватной терапии. Как компания мы, к сожалению, не можем охватить все эти нужды и все области медицины. Мы поставили своей задачей определенные направления: онкологию (включая онкоморфологию), инфекционные заболевания (включая вирусологию), воспалительные и аутоиммунные заболевания, кардиологию и коагулологию, метаболические расстройства, заболевания центральной нервной системы, заболевания женской репродуктивной системы, критические состояния и сахарный диабет.

Мы делаем свое дело со всей ответственностью и осознанием того, что мы – часть большой компании: в 150 странах на пяти континентах. У нас лидирующие позиции на рынке фармацевтических препаратов и *in vitro*-диагностики, широкое портфолио для научных исследований.

Наша сила как компании заключается во взаимодействии этих областей, которые формируют основу для всех медицинских про-

цессов, включают все элементы ранней диагностики, лечения и мониторинга терапии. Отсюда и огромный потенциал для синергии в исследовании, разработке и продвижении продукции на рынке.

В последние годы индустрия здравоохранения во всем мире претерпела огромные изменения в связи с меняющейся демографией, ужесточившимся нормативным регулированием и финансовым давлением.

В эти сложные времена для нас по-прежнему пациент остается в фокусе всей нашей деятельности, во всех представительствах группы компаний Рош по всему миру и для всех ее функциональных подразделений: клинических исследований, маркетинга, технического сервиса, логистики...

Группа компаний Рош всегда нацелена на новые исследовательские разработки: открывать, развивать и продвигать инновационную диагностическую продукцию и решения как для централизованных лабораторий, так и для лабораторий со средними потоками.

В 2015 году группа компаний Рош приобрела Ariosa Diagnostics – пионера на рынке неинвазивного пренатального тестирования, основанного на анализе ДНК.

Пренатальный тест Harmony (RUO) представляет собой ранний скрининг-тест крови – новый тип скрининг-теста, который проводится путем анализа ДНК, содержащейся в отобранном образце крови, для оценки риска развития синдрома Дауна (трисомии 21) и двух других генетических состояний: трисомии 18 (синдром Эдвардса) и трисомии 13 (синдром Патау). Тест Harmony является более точным, нежели традиционные тесты, и может быть проведен уже на 10-й неделе беременности.

В ходе клинических исследований было установлено, что тест Harmony выявляет более 99% случаев развития синдрома Дауна, при этом коэффициент ложноположительных результатов составляет менее 0,1%. Наивысшая точность и меньшая частота ложноположительных результатов при проведении тестов Harmony, по сравнению с традиционными тестами, сводят к минимуму вероятность того, что дальнейшее тестирование будет рекомендовано в связи с ложноположительными результатами. Более подробно о технологии Harmony будет рассказано в одном из следующих номеров нашего журнала.

Мы очень рады, что можем уже в этом году включить в свое портфолио такой исключительный тест и предложить его нашим пользователям. Мы твердо верим в гигантский потенциал трансляции науки в терапию, которая облегчит страдания людей и поможет им жить дольше и счастливее.



Руководитель отдела логистики и качества
ООО «Рош Диагностика Рус»
Лучина Ирина Альбертовна

Содержание

Организация лаборатории

Контроль аналитического качества клинических исследований: задачи и возможности современных лабораторий	4
--	---

Возможные источники ошибок при определении МНО и пути их решения	8
---	---

Комплексные решения

Логистика как часть комплексного решения	12
--	----

Диагностика функции щитовидной железы	14
---	----

История успеха анализаторов критических состояний Roche: от истоков к совершенству	18
--	----

Медицина и наука

1981–2016: эволюция подходов к излечению ВИЧ-инфекции	22
---	----

Таргетное секвенирование – новый путь к диагностике наследственных заболеваний	26
--	----

Ответ иммунной системы пациента на злокачественное новообразование: диагностика и перспективы специализированной терапии	29
---	----

Журнал «Диагностика в диалоге»
Рекламно-информационное издание
для медицинских специалистов

Учредитель: ООО «Рош Диагностика Рус»

Редакционная коллегия: И.А. Агапова, Е.Н. Байкова, В.С. Берестовская, М.А. Радциг, А.В. Шалупин, Т.В. Яшина

Выпуск № 6, 16.05.2016

Тираж: 950 экз.

Объем: 32 полосы

Периодичность: 2 раза в год

Бесплатно

Адрес редакции и издателя: ООО «Рош Диагностика Рус»,
115114, Москва, ул. Летниковская, д. 2, стр. 2, БЦ «Вивальди Плаза»

Тел.: +7 (495) 229-69-99; факс: +7 (495) 229-62-64

www.rochediagnostics.ru

Адрес типографии: ООО «Компания БОРГЕС», 115162, Москва, ул. Хавская, д. 18, корп. 2

Контроль аналитического качества клинических исследований: задачи и возможности современных лабораторий



Систему правил и методов оценки качества клинических исследований можно сравнить с живым организмом. Требования регулярно меняются и пересматриваются параллельно с развитием технологий и совершенствованием аналитических систем. Несомненно, грамотная организация управления качеством – залог получения достоверной информации клиницистом и, как следствие, принятия верного диагностического решения.

Несмотря на то что ошибки аналитического этапа исследований составляют лишь 7% от общего количества⁷, традиционно именно его контролю в литературе уделяется наибольшее внимание. Это неслучайно: процедуры оценки качества аналитического этапа основаны на статистических методах, а грамотный подход к его планированию требует наличия компетентных специалистов и временных затрат.

В данном обзоре описываются основные инструменты, доступные лабораториям для совершенствования качества исследований. Цель обзора – не только привлечь внимание к проблеме, но и осветить актуальные вопросы, которые встанут перед специалистами клинической диагностики в ежедневной работе.

Построение системы эффективной оценки аналитического качества исследований

Прежде всего определим понятие «качество» для клинико-диагностических лабораторий. В странах Европейского Сообщества (ЕС) принято следующее определение: «Качество, применительно к медицинским лабораториям, – это правильно и своевременно назначенный нуждающемуся в нем пациенту тест, выполненный на достаточном аналитическом уровне, с необходимой информацией для его интерпретации»⁷. Таким образом, обязательным условием качественных результатов является правильная организация процессов на всех этапах «технологической цепочки» – начиная с момента назначения исследования и заканчивая принятием решения о той или иной терапии клиницистом. Аналитический этап включает ту часть процесса, которая проводится непосредственно в клинико-диагностической лаборатории: от подготовки аналитической системы, выполнения протокола исследования и проведения процедур контроля качества до оценки получаемых результатов. Очевидно, качество аналитического этапа определяется состоянием аналитической системы, компонентами которой являются не только анализатор, реагенты и вспомогательное оборудование (оборудование для водоподготовки, дозаторы

и пр.), но и компетентность задействованных специалистов.

На сегодняшний день основными документами, отображающими требования к качеству лабораторного анализа, являются международный стандарт ISO 15189¹, а также его национальный аналог – РФ ГОСТ Р ИСО 15189 текущей версии². Учитывая безусловную значимость данных документов, обратим внимание на то, что, согласно обоим, «руководство лаборатории должно нести ответственность за разработку, внедрение, поддержание и улучшение системы управления качеством». Вместе с тем стандарты не предлагают конкретных инструкций, в большей степени обозначая принципиальную значимость вопроса. Более детально мероприятия по контролю качества, принятые в России, изложены в национальных документах: Приказ МЗ РФ № 45 от 07.02.2000⁵, Приказ МЗ РФ № 220 от 26.05.2003⁶, ГОСТ Р 53133.2-2008⁴ и пр. Базовым механизмом оценки в них являются статистические методы анализа, а главным «инструментом» – контрольный материал. Его анализ («контрольные измерения») дает возможность делать заключения о достоверности получаемых результатов.

Что же такое «контрольный материал» и каковы современные требования к данному продукту? В отечественных и международных документах достаточно подробно описаны его критерии^{1,4-6}. Согласно определению, используемому в ГОСТ 53133.2-2008, контрольным материалом является «однородный материал человеческого или животного происхождения или искусственный материал, приближающийся, насколько это возможно, по своим <...> свойствам к исследуемому биологическому материалу пробы». Кроме того, согласно ГОСТ, концентрация контрольного материала должна быть приближена к зоне принятия клинических решений и соответствовать аналитическому методу, используемому в лаборатории. Важно понимать, что, помимо анализируемых составляющих, любой контрольный материал промышленного производства содержит дополнительные компоненты (стабилизаторы, консерванты), сохраняющие его свойства на протя-

жении заявленного срока годности. Разумеется, любые посторонние включения потенциально способны создавать эффекты, искажающие результат (так называемый «эффект матрицы»), и для качественного контрольного материала такие влияния должны быть минимизированы.

Цели и мероприятия внутрилабораторного контроля качества

Под внутрилабораторным контролем качества (ВЛК) понимают, прежде всего, проверку результатов по каждому тесту в каждой аналитической серии, то есть для большинства лабораторий – измерений контрольных материалов, осуществляемых ежедневно⁴⁻⁶. Целью ВЛК являются выявление и устранение недопустимых отклонений от стабильного выполнения теста. Мероприятия ВЛК можно разделить на два блока:

1. «Подготовительный этап», включающий выполнение установочных серий с целью определения контрольных пределов.
2. Проведение «оперативного контроля качества» – ежедневное измерение контрольных материалов, отображение результатов на контрольной карте и их оценка с помощью правил Вестгарда.

Исследование контрольного материала должно проводиться как минимум на двух уровнях концентраций аналита: норма (соответствует состоянию здорового пациента) и патология (соответствует состоянию болезни)⁴. Например, PreciControl ClinChem Multi 1 производства группы компаний Рош отражает концентрации аналитов здорового пациента, а PreciControl ClinChem Multi 2 – патологические (рис. 1).

Работу с новым видом (лотом) контрольного материала начинают с оценки внутрисерийной воспроизводимости –



Рисунок 1. Цветная маркировка флаконов различных уровней контрольных материалов Рош для удобства работы специалистов

Host

Con

C1

E1

E2

Stand By

17:04:45

bmserve

13/04/16

18:44

Workplace

Reagent

Calibration

QC

Utility

Status

Run Status

Individual

Cumulative

Control

Install

Test	Reagent Lot No.	Analyze Module	Control	S. Type	Control Lot No.	Target Mean	Target SD	N	Mean	Unit	SD	CV(%)	Result
A-HCV I		E1-2	PC AHCV	Ser/PI	1673550	0.15	0.075	1	0.063	COI			0.063
A-HCV I		E1-2	PC AHCV	Ser/PI	1673560	5.30	0.53	26	4.75	COI	0.962	20.27	5.17
A-HCV I		E2-2	PC AHCV	Ser/PI	1673550	0.15	0.075	1	0.061	COI			0.061
A-HCV I		E2-2	PC AHCV	Ser/PI	1673560	5.30	0.53	30	4.85	COI	0.113	2.33	4.75
ADA		C1	8990U	Ser/PI	01120-0	10.1	1.7	73	7.57	U/L	0.36	4.76	7.8
ADA		C1	8990W	Ser/PI	101130	31.8	5.4	74	25.68	U/L	11.19	43.57	25.6
ADA		C1	8990X	Ser/PI	AD2011	146.4	24.9	73	113.85	U/L	4.73	4.15	116.4
AFP		E1-1	8990V	Ser/PI	1237EC	44.6	4.45	26	44.67	U/L	1.03	2.31	43.31
AFP		E1-1	8990Y	Ser/PI	1201EC	9.91	0.995	24	9.73	U/L	0.250	2.57	9.56
AFP		E1-1	8990Y	Ser/PI	40791	31.77	4.6	17	30.21	U/L	1.72	5.69	31.10
AFP		E1-1	8990Z	Ser/PI	1236EC	211	21	25	212.6	U/L	5.36	2.52	206.7
AFP		E1-1	8990Z	Ser/PI	40793	212.3	31.5	17	200.4	U/L	19.75	9.85	206.7
AFP		E1-2	8990V	Ser/PI	1237EC	44.6	4.45	23	45.82	U/L	1.28	2.79	44.21
AFP		E1-2	8990Y	Ser/PI	1201EC	9.91	0.995	23	10.02	U/L	0.304	3.03	9.90
AFP		E1-2	8990Y	Ser/PI	40791	31.77	4.6	17	30.98	U/L	2.87	9.25	31.46
AFP		E1-2	8990Z	Ser/PI	1236EC	211	21	23	218.1	U/L	5.56	2.55	215.2

Chart

Realtime QC

Accumulate

Delete

Рисунок 2. Раздел Контроля Качества меню программы анализаторов cobas®: экран индивидуальных измерений (Individual), отображающий результаты ежедневных измерений контрольных материалов и их статистические показатели

так называемой сходимости – результатов его измерения. Для этого один и тот же контрольный материал измеряется десятикратно в пределах одной аналитической серии, а затем результаты сравниваются с предельно допустимыми значениями (ПДЗ)⁴⁻⁶.

К измеряемым характеристикам относятся:

- **Среднее значение (X)** – среднее арифметическое результатов, отображающее их математическое ожидание;
- **Стандартное отклонение (SD)** и производный от него **коэффициент вариации (CV)**, характеризующие разброс результатов и вычисляемые по формулам

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (X_i - X)^2}{N-1}},$$

$$CV = \frac{SD}{X} \cdot 100\%;$$

- **Систематическая погрешность, или смещение (B%, Bias)**, характеризующее правильность измерений, то есть разницу между предполагаемым результатом и ожидаемым. Для установочной серии смещение оценивается относительно паспортного значения (аттестованного значения, A3) контрольного материала:

$$B = \frac{X - A3}{A3} \cdot 100\%.$$

Меню программ современных анализаторов, как правило, автоматически рассчитывает базовые статистические параметры, освобождая специалистов от необходимости делать это вручную (рис. 2). Экран результатов индивидуальных контрольных измерений (Individual) анализаторов семейства cobas® в табличной форме отображает лоты контрольных материалов (столбец Control Lot No.): число измерений (N), среднее (Mean), отклонение (SD) и коэффициент вариации (CV). Собственные данные можно сравнить с целевыми (Target Mean, Target SD). В качестве целевых программа автоматически загружает паспортные значения и допустимые диапазоны. Со временем они могут быть вручную откорректированы в соответствии с результатами установочной серии.

Если значения CV и B% превышают рекомендуемые ПДЗ (для сходимости – не более половины от целевых значений для 10 измерений), необходимо выявить источники погрешностей и устранить их. Если же сходимость методики соответствует рекомендуемым критериям, переходят к следующей стадии – выполнению установочных серий. Проводят десятикратное измерение контрольного материала в 10-ти аналитических сериях

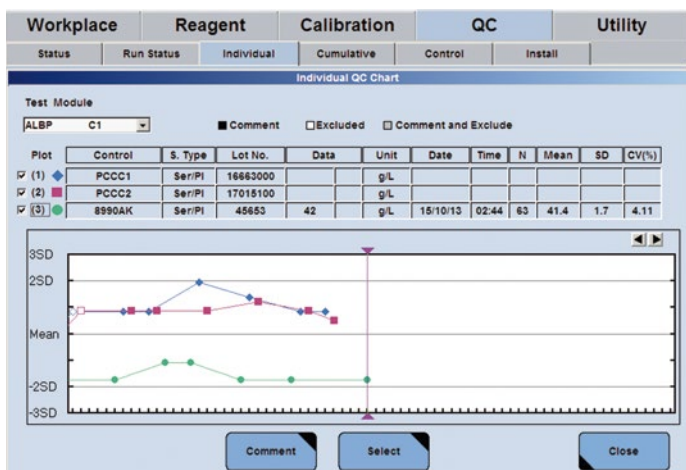


Рисунок 3. Раздел Контроля Качества меню программы анализаторов **cobas**[®]: пример контрольной карты с одновременным отображением результатов по трем уровням контрольных материалов. Исключенные из статистической обработки точки отображаются незакрашенными

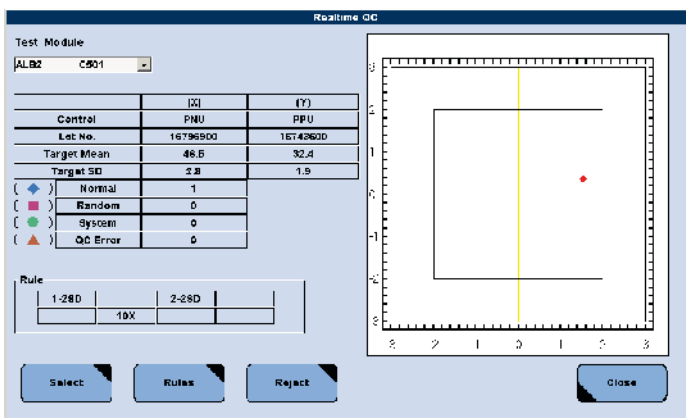


Рисунок 5. Раздел Контроля Качества меню программы анализаторов **cobas**[®]: экран «Контроля Качества в режиме реального времени» (Real Time QC), отображающий соответствие контрольных измерений критериям настроенных правил Вестгарда, а также их расположение в координатах графика Юдена

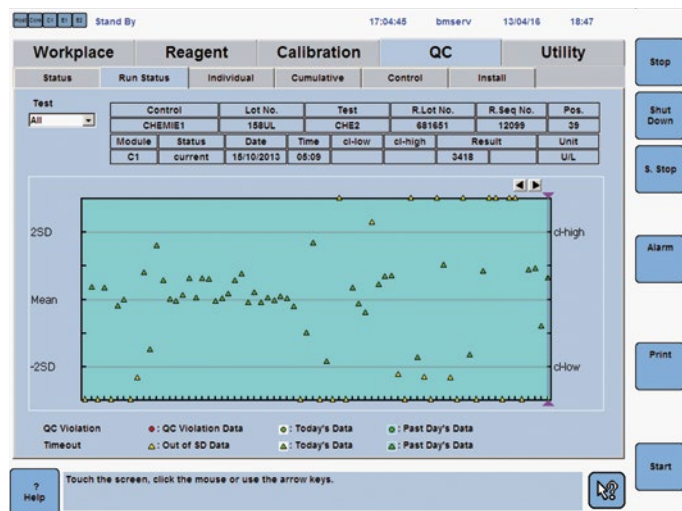


Рисунок 4. Раздел Контроля Качества меню программы анализаторов **cobas**[®]: экран текущего статуса ВЛК (Run Status), отображающий результаты по 500 последним контрольным измерениям

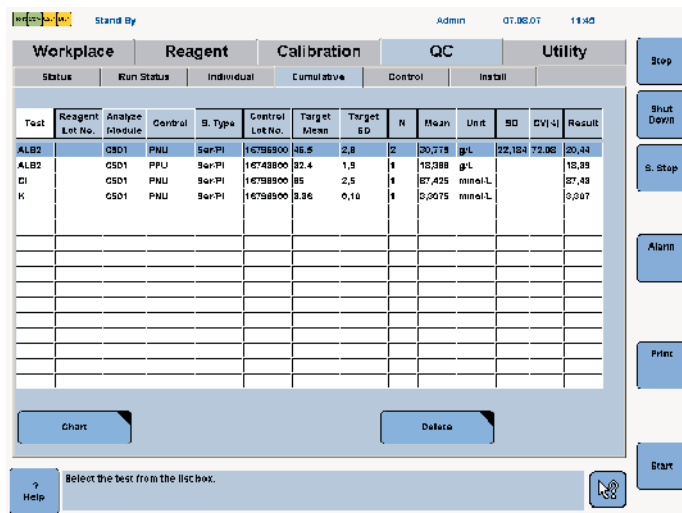


Рисунок 6. Раздел Контроля Качества меню программы анализаторов **cobas**[®]: кумулятивный экран для долговременного хранения результатов контрольных измерений, отображаемых в виде табличных значений или контрольных карт

(то есть, как правило, ежедневное измерение в течение 10 дней), снова рассчитывают их статистические параметры и сравнивают с ПДЗ. Если полученные значения не превышают допустимые, проводят 10 дополнительных измерений, после чего проверяют статистические показатели общей (20 результатов) выборки. Если они не превышают ПДЗ, переходят к построению контрольных карт. На графике по оси абсцисс откладываются номера аналитических серий (или даты), а по оси ординат – среднее значение и контрольные пределы ($\pm 3SD$). На этом подготовительный этап заканчивается, и лаборатория может переходить к выполнению «оперативного ВЛК».

«Оперативный ВЛК» заключается в ежедневном измерении контрольных материалов и отображении результатов на контрольных картах (рис. 3). Далее результаты оцениваются с помощью системы контрольных правил Вестгарда⁴⁻⁷. Меню программы анализаторов **cobas**[®] дает возможность активировать базовые контрольные правила в индивидуальном порядке для каждого аналита. При их нарушении результаты автоматически выделяются на экране текущего статуса ВЛК (Run Status) специфическими окрашенными значками (рис. 4).

Развернутый спектр правил Вестгарда может быть настроен в поле «Контроля Качества в режиме реального времени»

(Real Time QC). На графике Юдена наглядно изображаются точки двух уровней контрольных материалов в пределах границ допустимого диапазона отклонения, а также статусы ошибок (случайная/систематическая) для «выпавших» результатов (рис. 5).

Для оценки стабильности на длительных временных интервалах программа дает возможность «аккумулировать» данные с выбранной периодичностью (раз в неделю, месяц или др.). При аккумуляции программа вычисляет среднее по результатам контрольных измерений в заданный промежуток или предлагает оператору выбрать индивидуальную точку для сохранения. Аккумуля-

лированные результаты отображаются на Кумулятивном (Cumulative) экране. Возможность построения контрольных карт для аккумулярованных данных помогает визуально оценивать колебания результатов в течение длительных периодов – нескольких месяцев/лет (рис. 6).

Внешняя оценка качества: функции и особенности

Отметим, что в большей степени ВЛК дает информацию о воспроизводимости (степени близости друг к другу) результатов, то есть о том, насколько стабилен наш аналитический процесс. Второй элемент – *Внешняя оценка качества (ВОК)* – направлен на обеспечение единообразия лабораторных измерений. Сущность ВОК заключается в анализе «слепых» (неизвестного состава) проб, рассылаемых внешней организацией, и последующем сопоставлении результатов с результатами других лабораторий. В отличие от ВЛК, цель которого – удостовериться, что разброс данных находится под контролем, основная цель ВОК – оценить, насколько получаемые результаты близки к «истинному», т.е. оценить «правильность» измерений. Какую же величину принимает ВОК за истинную? Как правило, это среднее значение результатов, полученных при помощи такого же метода или идентичной аналитической системы (так называемая «группа сравнения»). Важная отличительная черта ВОК – периодичность исследований и ретроспективное получение результатов: если результаты ВЛК дают достаточно быструю ежедневную оценку, то обработка результатов ВОК занимает от нескольких дней до нескольких недель, а измерение проб осуществляется лишь ограниченное количество раз в год. В связи с этим некоторые специалисты используют дополнительные программы межлабораторного сравнения, позволяющие оценивать правильность результатов в режиме реального времени. В Приказе № 45 МЗ РФ утверждается: «Регулярно проводимая внешняя оценка качества

и повседневно проводимый внутрилабораторный контроль качества дополняют, но не заменяют друг друга». Таким образом, как ВЛК, так и ВОК обязательны для выполнения в любой диагностической лаборатории.

Установление требований к качеству «за пределами» установочной серии

Рассмотренные требования национальных стандартов ограничиваются установочной серией и, кроме набора правил Вестгарда, не дают инструкций для дальнейшей работы. Какие же дополнительные механизмы могут использоваться специалистами при проведении ежедневных контрольных измерений?

Прежде всего, не стоит останавливаться на вычисленных для установочной серии показателях. В процессе работы у лаборатории будет накапливаться более объемная выборка, в связи с чем рекомендуется корректировать целевые значения с учетом пятидесяти, ста и более результатов. Что касается систематической ошибки (B%), корректнее вычислять ее не относительно аттестованного значения, а относительно среднего группы сравнения программ ВОК^а. Аттестованные значения получают производителем при тестировании ограниченным числом приборов. Очевидно, выборка программ ВОК, в которых принимают участие тысячи лабораторий по всей стране / всему миру, позволит объективнее оценить правильность результатов.

И еще один важный момент: современный подход не подразумевает наличия универсальных требований к качеству, хотя бы потому, что в каждой лаборатории – свои условия хранения реагентов, потоки биоматериала, особенности эксплуатации анализатора, профессиональный уровень специалистов и сервисного обслуживания и пр. Раздел 3.3 стандарта ГОСТ Р 53022.2-2008 предполагает, что «решение о применении требований по точности лабораторных исследований <...> принимается руководителем учреждения по представлению заведующего лабораторией». Представленные в таблице 2 Приказа № 45 и ГОСТ Р 53022.2-2008 требования

к качеству сфокусированы на сравнении CV и B% результатов ВЛК с нормами, полученными на основании данных о биологической вариации аналита. Приказ № 45 предлагает опираться на базовый уровень, а ГОСТ Р 53022.2-2008 рекомендует три уровня оценки: минимальный (наиболее «мягкий»), базовый и оптимальный (наиболее «строгий»). Уровень подбирается индивидуально для каждого аналита в зависимости от специфики конкретной лаборатории. Лаборатория может использовать данные критерии для оценки текущего состояния исследований, а также стремится переходить на более высокий уровень. В методических рекомендациях^в подробно рассматриваются алгоритмы данных процессов, при желании доступные для освоения в любой лаборатории.

Заключение

Разумеется, рассмотренный подход к обеспечению качества требует наличия ресурсов, которыми располагает далеко не каждая медицинская организация. К сожалению, зачастую, обладая энтузиазмом улучшать качество исследований, руководители лабораторий сталкиваются с такими ограничениями, как отсутствие возможности выделить отдельного специалиста по контролю качества, оснастить лабораторию анализаторами нового поколения и специализированными компьютерными программами и пр. Однако, цитируя известного политического деятеля М. Ганди, можно сказать: «Если хочешь перемены в будущем – стань этой переменной в настоящем». Мы верим, что долгий, но верный путь в направлении совершенствования качества клинических исследований станет однажды «светлым настоящим» отечественной лабораторной диагностики.

Автор статьи:

Е.С. Корникова

Специалист по обучению клиентов
ООО «Рош Диагностика Рус»

Литература

1. ISO 15189:2012. *Medical laboratories – Requirements for quality and competence*. 3rd ed. International Organisation for Standards, Geneva, Switzerland, 2012.
2. РФ ГОСТ Р ИСО 15189-2009 «Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности». М.: Стандартинформ, 2010.
3. Национальный стандарт ГОСТ Р 53022.2-2008 «Требования к качеству клинических лабораторных исследований», часть 2: «Оценка аналитической надежности методов исследования (точность, чувствительность, специфичность)». Федеральное агентство по техническому регулированию и метрологии. М., 2009.
4. Национальный стандарт РФ ГОСТ Р 53133.2-2008 «Контроль качества клинических лабораторных исследований», часть 2: «Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов». Федеральное агентство по техническому регулированию и метрологии. М., 2009.
5. Приказ МЗ РФ № 45 от 7 февраля 2000 г. «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации».
6. Приказ МЗ РФ № 220 от 26 мая 2003 г. «Об утверждении отраслевого стандарта «Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов».
7. Мошкин А.В., Долгов В.В. Обеспечение качества в клинической лабораторной диагностике. М.: Медиздат, 2004.
8. Арефьева И.А., Федорова М.М., Мошкин А.В. Планирование аналитического качества количественных лабораторных исследований с использованием коммерческих контрольных материалов. Методические рекомендации. М.: Тверь: Триада, 2013.

Возможные источники ошибок при определении МНО и пути их решения



Несмотря на появление новых оральных антикоагулянтов, антагонисты витамина К (АВК) продолжают широко использоваться для лечения и профилактики тромбоэмболических осложнений, а у больных с искусственными клапанами сердца им пока нет альтернативы. При приеме АВК у больных синтезируются измененные факторы протромбинового комплекса (протромбин, факторы X, IX и VII, а также два компонента противосвертывающей системы – протеин С и протеин S), утратившие способность связываться с поверхностью фосфолипидов. В результате существенно снижается вероятность внутрисосудистого тромбообразования, но степень антикоагуляции индивидуальна и требует контроля для каждого пациента. Для контроля используется протромбиновый тест (ПТ-тест), в основе которого лежит определение времени свертывания плазмы пациента после добавления к ней тромбопластина и хлорида кальция (протромбинового времени). Тромбопластин – это экстракт тканей животных, содержащий тканевый фактор и фосфолипиды. Как показала практика, определение степени антикоагуляции по протромбиновому времени – непростая задача. Дело в том, что разные препараты тромбопластина обладают разной чувствительностью к снижению содержания факторов протромбинового комплекса, время свертывания нормальной и патологиче-

ской плазмы зависит от используемого препарата тромбопластина и отличается даже для разных серий тромбопластина одного и того же производителя. Кроме того, протромбиновое время зависит от используемого метода (коагулометра). Специально для оценки степени антикоагуляции у больных, находящихся на терапии оральными антикоагулянтами, ВОЗ была принята система представления результатов ПТ-теста в виде МНО (международного нормализованного отношения).

Калибровка протромбинового теста

В зависимости от источника получения различают тромбопластины из тканей человека, кроликов или крупного рогатого скота. Созданы также препараты тромбопластинов, содержащие рекомбинантный тканевый фактор человека. Тромбопластин, состоящий только из экстракта тканей, с добавлением хлорида кальция, называют «простым». Существуют также «комбинированные» тромбопластины, которые помимо тканевого экстракта содержат адсорбированную бычью плазму в качестве источника дополнительного фактора V и фибриногена. В соответствии с рекомендациями ВОЗ очень важно корректно прокалибровать каждый используемый тромбопластин. Это необходимо для того, чтобы результаты определения МНО были воспроизводимы и сопоставимы независимо от источника про-

исхождения и серии тромбопластина. ВОЗ была принята методика калибровки тромбопластина, основанная на линейной зависимости между логарифмами протромбинового времени, полученного на плазме больных, находящихся на терапии оральными антикоагулянтами, и определенного с разными тромбопластинами. Методика подробно описана в технических сообщениях ВОЗ¹, а также в русскоязычной литературе². В соответствии с требованиями ВОЗ для калибровки тромбопластина необходимо использовать свежую плазму, полученную не менее чем от 20-ти здоровых доноров, и патологическую, полученную не менее чем от 60 больных, находящихся в стабильной фазе терапии оральными антикоагулянтами¹. Позднее было показано, что количество патологических плазм можно уменьшить до 20. С помощью этого метода определяется важный калибровочный параметр тромбопластина – международный индекс чувствительности (МИЧ), который характеризует чувствительность тромбопластина к содержанию активируемых факторов протромбинового комплекса. Чем выше значение МИЧ, тем менее чувствительным является тромбопластин. При использовании в работе тромбопластина с известным МИЧ результаты определения протромбинового времени можно выражать в единой шкале, а именно в виде МНО. Однако в дальнейшем было показано, что МИЧ тромбопластина зависит также и от особенностей применяемых в разных коагулометрах ме-

$$\text{МНО} = \frac{(\text{ПВ больного})}{\text{СНПВ}} \cdot \text{МИЧ}$$

тодов определения времени образования сгустков, поэтому величина МНО, определенная с использованием одного тромбопластина, но на разных коагулометрах, может заметно различаться. Для решения этой проблемы был предложен метод локальной калибровки пары «прибор – тромбопластин», заключающийся в использовании четырех калибровочных плазм: одной нормальной и трех, полученных от больных, находящихся на

терапии оральными антикоагулянтами с высокой, средней и низкой степенью антикоагуляции³. Другой особенностью этого метода калибровки является то, что он позволяет преодолеть проблему вычисления «среднего нормального протромбинового времени» (СНПВ).

Вычисление МНО заключается в возведении в степень МИЧ протромбинового отношения (ПО), которое определяется путем деления протромбинового времени (ПВ) плазмы больного на СНПВ.

По рекомендованной ВОЗ методике для определения СНПВ необходимо измерить ПВ плазм 20 доноров и вычислить среднее геометрическое для полученного массива данных. Выполнение этой рекомендации в лаборатории клиники сопряжено с определенными трудностями, особенно если учесть, что это придется повторять при переходе к новой серии тромбопластина. Упрощенными, но тем не менее позволяющими в ряде случаев получать удовлетворительное качество определения являются замена показателя СНПВ на ПВ пула плазм доноров, содержание факторов протромбинового комплекса в котором принимается за 100%, или вычисление соответствующего значения из калибровочного графика по Квику. Последнее представляется более реальным, т.к. для качественного приготовления пула плазм доноров необходимы условия для мгновенной заморозки аликуот и их хранения при температуре ≤ -70 °С.

Для построения калибровки по Квику необходима плазма-калибратор с известным значением %-ПТ. Универсальных, т.е. приемлемых для любой пары «реактив – прибор», калибраторов для протромбинового теста не существует. Проблема в том, что консерванты и стабилизаторы, добавляемые к плазме перед лиофилизацией, могут по-разному влиять на ПВ, определяемое с разными тромбопластинами и на разных приборах⁴⁻⁷. Поэтому этот подход к вычислению знаменателя формулы МНО, а также и %-ПТ по Квику приемлем только для указанных в паспорте калибратора реактивов и приборов.

К сожалению, некоторые отечественные производители тромбопластинов проигнорировали эту особенность ПТ-теста и в инструкциях по его выполнению предлагают очень простой способ вычисления эквивалента СНПВ, заключающийся в умножении измеренного в лаборатории ПВ контрольной (нормальной) плазмы на некий коэф-

фициент (к, ПОпк). В действительности такой способ коррекции был бы возможен, если бы: 1) зависимость времени свертывания от содержания факторов описывалась линейным уравнением $y = ax$, т.е. графически выглядела бы как прямая, выходящая из начала координат; 2) понятия «контрольная плазма» и «калибратор» были бы синонимами.

Пример из практики

Приведем пример проблемы, возникшей при построении калибровки ПТ-теста на импортном коагулометре с использованием отечественного тромбопластина (МИЧ = 1,2) и контрольной плазмы (рис.). По рекомендуемой производителем методике в дублях ПВ контрольной плазмы и трех ее разведений. Как видно на графиках, параллельные измерения показали хорошее совпадение. Прибор выдал уравнение: $y = 0,0006x + 0,0061$, $R^2 = 0,973$ и калибровку принял, хотя линейность графика оставляла желать лучшего (рис.). Действительно, из уравнения следует, что ПВ100% равно 6,5 секунды, что много ниже, чем фактически измеренное на контрольной нормальной плазме в процессе калибровки и 14,9 секунды, рассчитанных по предложенному производителем k для определения МНО. По полученной калибровке 14,9 секунды соответствует 66,5% ПТ по Квику. Естественно, что с контролем качества у лаборатории возникли проблемы.

На наш взгляд, одним из источников проблемы было использование 8-кратного разведения контрольной плазмы. Судя по видимому загибу калибровочного графика для данной пары «прибор – реактив», оно было явно избыточным. Действительно, при построении графика только по трем первым парам цифр его линейность повышается, и значение

ПВ100% = 12,7 секунды, вычисленное по новой формуле, выглядит уже более правдоподобно. Тем не менее оно остается значительно ниже, чем «скорректированное» по предложенному производителем тромбопластина k, которому соответствует 82,6% ПТ по новой калибровке. Другой причиной расхождения ПВ100%, рассчитанных из калибровки по Квику и по «поправочным» коэффициентам, является то, что в первом случае расчет основан на хорошо известной зависимости секунд свертывания от содержания факторов ПТ-комплекса, а в другом – на линейной.

Нам могут возразить, что описан уникальный случай. Насколько это так, могут определить лаборатории, использующие столь оригинальный метод вычисления СНПВ (ПВ100%). Данные циклов ФСВОК, в которых анализировались результаты определения в патологических плазмах (МНО > 2), свидетельствуют о том, что этот случай вряд ли является уникальным.

Косвенным признаком ошибки в определении ПВ100% (СНПВ) может служить характер распределения результатов ПТ-теста. У доноров, сотрудников, проходящих профосмотр, и даже у большинства нетяжелых больных значения %-ПТ и МНО должны не просто попадать в диапазон нормальных значений, а распределяться примерно пополам выше и ниже 100% и 1 соответственно. Значительное смещение в одну или другую сторону является серьезным основанием для проверки правильности определения ПВ100% (СНПВ), даже если результаты контроля качества в области нормы являются удовлетворительными.

Особенностью ПТ-теста является то, что вероятность выявления ошибки в определении СНПВ или МИЧ возрастает с увеличением МНО. Поэтому контроль



качества теста должен обязательно включать образцы со значениями вблизи верхней и нижней границ терапевтической области (40–20% ПТ, МНО 2–3,5).

Определение протромбина в капиллярной крови

Использование капиллярной крови для анализа представляется привлекательным, т.к. не требует пункции вены и центрифугирования крови, однако при кажущейся простоте в действительности сопряжено с рядом проблем.

Первая и главная заключается в большей вероятности активации свертывания при заборе капиллярной крови. Кровь, проходя через поврежденную ткань, контактирует с тромбогенной поверхностью и может активироваться. Это увеличивает вероятность преаналитической ошибки. Быстро и аккуратно собрать даже 50 мкл крови – минимум, который необходим для одного определения с обычным тромбопластином при рабочем объеме кюветы коагулометра 150 мкл, – удается не всегда. В капилляре кровь с антикоагулянтом практически не перемешивается, поэтому предварительный забор цитрата в капилляр проблему не решает, а только усложняет процедуру определения, т.к. требует использования стерильного цитрата.

Вторая проблема связана со сложностью калибровки и отсутствием адекватной системы контроля качества для предлагаемых отечественными производителями тромбопластинов методик выполнения ПТ-теста, предполагающих использование цельной крови и обычного тромбопластина. Более высокая вязкость и плотность крови по сравнению с плазмой снижают эффективность перемешивания реакционной смеси в кювете коагулометра, что может отразиться на результате анализа быстро

протекающих реакций, к которым относится ПТ-тест.

Определение протромбина в капиллярной крови возможно с применением комбинированных реактивов, в состав которых кроме тромбопластина входят фибриноген и фактор V. Наличие этих добавок позволяет выполнять определение с использованием всего 10–20 мкл капиллярной крови, что составляет 1/20 от конечного объема среды реакции. Тест может выполняться вручную или на механических коагулометрах. Высокое разведение крови реактивом позволяет использовать для контроля качества лиофилизированные плазмы, которые вносятся в объеме 1/2 от объема крови. Влиянием клеток крови (< 3% от объема реакционной среды) в этом случае можно пренебречь. Однако на ПВ цельной крови величина гематокрита оказывает значительное влияние, поэтому калибровка реактива для определения ПВ цельной крови должна включать также и построение номограммы, позволяющей скорректировать влияние гематокрита.

Многие вышеперечисленные проблемы могут быть решены за счет использования профессиональных экспресс-анализаторов МНО, работающих на тест-полосках с человеческим рекомбинантным тромбопластином (МИЧ = 1), автоматической калибровкой по чип-коду, малым объемом крови (8 мкл), ограничением нанесения пробы (до 20 секунд с момента прокола), внутренним контролем качества в тест-полосках и внутри прибора, использованием внешнего контроля качества и выдачей результата за 1 минуту^{8–11}.

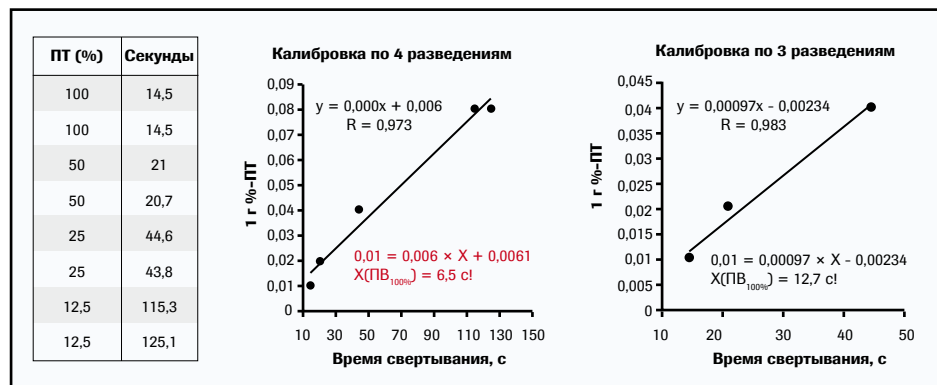
Все эти преимущества позволяют использовать портативные анализаторы МНО непосредственно в кабинете у врача, который ведет такого больного, принимающего непрямые антикоагулян-

ты. Это может быть врач-кардиолог, терапевт, хирург, невролог или фельдшер. Согласно Приказу Минздрава России № 918н от 15 ноября 2012 г. «Об утверждении порядка оказания медицинской помощи больным с сердечно-сосудистыми заболеваниями», в стандарт оснащения кардиологического кабинета входит портативный аппарат для экспресс-определения МНО. Тем более в настоящее время имеются российские данные об экономической целесообразности открытия специализированных кабинетов контроля МНО или антикоагулянтных кабинетов с централизацией результатов и удаленным ведением пациентов¹².

Самоконтроль МНО

Основной проблемой лечения АВК является необходимость регулярного контроля уровня антикоагуляции. Особую проблему это создает для пожилых людей, проживающих вдали от крупных городов, а также тех, чья работа связана с длительными командировками. Преодолеть эти трудности можно с помощью портативных коагулометров для самостоятельного определения МНО. Кроме того, по данным ряда исследований, самостоятельное мониторирование МНО уменьшает риск осложнений терапии и существенно облегчает подбор, а при необходимости и коррекцию дозы антикоагулянта.

Для оценки качества терапии АВК обычно учитывают продолжительность времени, при котором значение МНО находится в терапевтической области (ВТО), и частоту критических значений МНО, т.е. значений меньше 1,5 или больше 5, при которых существенно возрастает вероятность развития осложнений. Результаты метаанализа 53 исследований больных ТГВ/ТЭЛА, находящихся на терапии АВК, показали, что 58% от всех случаев тромбоэмболий пришлось на период (25% времени), когда уровень антикоагуляции был ниже, а 48% больших кровотечений – соответственно на период (15% времени), когда уровень антикоагуляции был выше терапевтического⁸. По данным этого анализа, среднее ВТО составило 61%, а в больших тщательно контролируемых исследованиях, в которых сравнивалась эффективность варфарина и новых оральных антикоагулянтов, ВТО варьировалось в пределах 55–68%¹³. Результаты большого ретроспективного исследования STABLE, в котором был проведен анализ



Влияние разведения контрольной плазмы на измеряемое протромбиновое время

данных более 29 000 больных из рутинной клинической практики, показали, что при самоконтроле МНО с помощью портативных коагулометров ВТО составило 69,7%. Анализ разных возрастных групп показал, что даже у пациентов старше 75 лет самоконтроль позволяет достичь такого уровня стабильности антикоагуляции¹⁰. В другом исследовании, в котором сравнивали результаты самоконтроля МНО с использованием двух портативных коагулометров CoaguChek XS и INRatio2, ВТО составило 68,9% для стандартного диапазона МНО 2–3 и 87,9% для расширенного диапазона МНО 2–3,5. Частота выявления критических значений МНО (< 1,5 или > 5) составила всего 2,4%¹⁴.

Обеспечение более высокой эффективности и безопасности терапии АВК при самоконтроле уровня антикоагуляции подтверждают данные мета-

анализов о снижении риска смерти на 26–42%, тромбоэмболических осложнений – на 50%, а больших кровотечений – на 35%^{15,16}.

В целом можно сделать заключение, что определение МНО с помощью портативных коагулометров значительно облегчает больным процедуру контроля терапии АВК. При налаженной системе обучения пациентов и контроля со стороны специалистов этот метод позволяет снизить количество неблагоприятных исходов терапии. Также определение МНО на двух мониторах CoaguChek XS (для контроля МНО пациентом дома) и CoaguChek XS Plus (профессиональная версия для кабинета врача или экспресс-лаборатории) с параллельным определением в лаборатории показало хорошее совпадение данных. Результаты для венозной и капиллярной крови, полученные на экспресс-коагулометре,

сравнивались с результатами для венозной крови, полученными лабораторным эталонным методом Innovin (компания Dade Behring). Установлено, что большая часть угловых коэффициентов находится в диапазоне от 0,93 до 1,04 для венозной крови и от 0,92 до 1,03 для капиллярной крови. Коэффициент вариации (CV*) при использовании капиллярной или венозной крови составил < 4,5% для капиллярной крови и < 3,5% для венозной крови в диапазоне нормальных значений и в терапевтическом диапазоне^{9–11}.

Авторы статьи:

Е.В. Титаева, А.Б. Добровольский
ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс»
Минздрава России, Москва
Данная статья была напечатана в журнале «Поликлиника», 2015, № 6 (1).

Литература

1. Guidelines for thromboplastin and plasma used to control oral anticoagulant therapy. WHO Technical Report Series, 889, 1999.
2. Панченко Е.П., Добровольский А.Б. Тромбозы в кардиологии. Механизмы развития и возможности терапии. М.; 1999. 217–243.
3. Houbouyan LL, Goguel AF. Long-term French experience in INR standardization by a procedure using plasma calibrants. *Am J Clin Pathol*, 1997. 108: 83–89.
4. Poller L, Barrowcliffe TW, Van Den Besselaar AMHP, Jespersen J, Tripodi A, Houghton D. The European Concerted Action on Anticoagulation (ECAA) Evaluation of a Set of Lyophilized Normal Plasmas to Establish the Normal Prothrombin Time for Coagulometer Systems. *Thromb Haemost*, 1998. 122–128.
5. Van Den Besselaar AMHP, Barrowcliffe TW, Houbouyan-Reveillard LL, Jespersen J, Johnston M, Poller L, Tripodi A. On behalf of the subcommittee on control of anticoagulation of the scientific and standardization committee of the ISTH. Guidelines on preparation, certification, and use of certified plasmas for ISI calibration and INR determination. *J Thromb Haemost*, 2004. 2: 1946–1953.
6. Poller L, Ibrahim S, Keown M, Pattison A, Jespersen J. The prothrombin time/international normalized ratio (PT/INR) Line: derivation of local INR with commercial thromboplastins and coagulometers – two independent studies. *J Thromb Haemost*, 2011. 9: 140–148.
7. Tripodi A, Chantarangkul V, Legnani C, Frontoni R, Testa S. Discrepancy of the international normalized ratio observed in the external quality assessment survey: a cause for concern. *J Thromb Haemost*, 2012. 10: 714–716.
8. Mearns ES, Kohn CG, Song J-S et al. Meta-Analysis to Assess the Quality of International Normalized Ratio Control and Associated Outcomes in Venous Thromboembolism Patients. *Thrombosis Research*, 2014. 134: 310–319.
9. Plesch W, Wolf T, Breitenbeck N et al. Results of the performance verification of the CoaguChek XS System. *Thromb Res*, 2008. 123: 381–389.
10. Deom A, Reber G, Tsakiris DA et al. Evaluation of the CoaguChek XS Plus system in a Swiss community setting. *Thromb Haemost*, 2009. 101: 988–990.
11. Multicenter Performance Evaluation of the CoaguChek XS System; Evaluation Report from Roche Diagnostics available upon request.
12. Хруслов М.В. Оценка экономической эффективности системы централизованного мониторинга пациентов, принимающих непрямые антикоагулянты. Лаборатория ЛПУ, 2014. 4: 40–43.
13. Ruff CT, Giugliano RP, Braunwald E. Comparison of the efficacy and safety of new oral anticoagulants with warfarin in patients with atrial fibrillation: a meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 2013; published online Dec 4. [http://dx.doi.org/10.1016/S01406736\(13\)62343-0](http://dx.doi.org/10.1016/S01406736(13)62343-0).
14. DeSantis G, Hogan-Schlientz J, Liska G et al. STABLE Results: Warfarin Home Monitoring Achieves Excellent INR Control. *Am J Manag Care*, 2014. 20 (3): 202–209.
15. Brouwer JLP, Stoevelaar H, Sucker C. The Clinical Impact of Different Coagulometers on Patients Outcomes. *Adv Ther*, 2014. 31: 639–656.
16. Heneghan C, Ward A, Perera R et al. Self-monitoring of oral anticoagulation: systematic review and meta-analysis of individual patient data. *Lancet*, 2012. 379: 322–334.

Логистика как часть комплексного решения



Развитие и совершенствование цепи поставок является одной из важных составляющих решений, которые предлагает компания ООО «Рош Диагностика Рус» для централизованных лабораторий на российском рынке.

В современных условиях экономическая целесообразность и конкурентоспособность приобретают все большее значение. Поэтому главная задача логистики – доставить нужный продукт к назначенному сроку при минимальных затратах – видеоизменяется и для нашей компании звучит так: «Мы стремимся достичь высокого уровня мастерства через инновации и надежность, тем самым повышая ценность и качество предлагаемых нашим пользователям услуг и давая им дополнительную причину покупать продукцию производства группы компаний Рош».

Для того чтобы претворить в жизнь эти слова, задействованы передовые складские технологии, мощные программные средства, ведущие транспортные компании и тысячи сотрудников группы компаний Рош. Стоит упомянуть, что суммарная дистанция поставок нашей продукции соответствует 78 расстояниям до Луны и обратно.

Крупнейшие логистические распределительные платформы группы компаний Рош находятся в г. Манхайме,

Германия, и в г. Индианаполисе, США. ООО «Рош Диагностика Рус» получает продукцию из Манхайма, где сотрудники департамента логистики ежегодно обслуживают более миллиона заказов, осуществляя поставки в 170 стран общим весом более 55 000 тонн в год. На складе в Манхайме хранятся 27 424 артикульные позиции (реагенты, инструменты, запчасти, расходные материалы), занимающие более 92 000 паллет и требующие соблюдения различных температурных условий (-70°C , -20°C , $+4^{\circ}\text{C}$ и др.). Склад оснащен новейшими системами контроля уровня запасов и сборки товара, включая автоматическую подборку, системы безбумажного подбора заказа (по световому или звуковому сигналу), скоростные штабелеры, подвесные и напольные конвейеры, тележки с автоматическим управлением и т.д.

Высокий уровень клиентского сервиса является главным показателем, который определяет все остальные индикаторы эффективности работы сотрудников отдела логистики. Среди ключевых компонентов стратегии можно выделить: активное управление жизненным циклом продукта, статистическое прогнозирование потребления, оптимизацию производственных циклов и логистические стандарты, упорядочивающие и регламентирующие операционную деятельность.

Согласно упомянутым логистическим стандартам, пополнение склада ООО «Рош Диагностика Рус» осуществляется на еженедельной основе: каждый четверг автогрузовые рефрижераторы отправляются из Манхайма в Москву, преодолевая тысячи километров и пересекая несколько границ, а на таможенном посту Северо-Западного таможенного управления происходит декларирование груза с уплатой таможенных платежей для выпуска в свободное обращение (для внутреннего потребления). Поступившая затем на склад в Москве продукция распределяется на места хранения – высотные 8-уровневые стеллажи.

Особый интерес обычно представляет собой тема пополнения склада, т.е. определения оптимальной тактики поддержания такого уровня запасов, при котором не было бы ни дефицитов (или перебоев с поставками), ни чрезмерных излишков и, как следствие, существенного отвлечения капитала в оборотные средства. Большой ассортимент и наличие сроков годности, а также высокая моральная ответственность за наличие на складе медицинских изделий, необходимых для работы лаборатории, делают эту оптимизационную задачу вдвойне более сложной.

Вся продукция, поставляемая на российский рынок нашей компанией, подразделяется на две большие категории:



Складской комплекс в г. Манхайме, Германия

«складская» продукция (buy-to-stock) и «заказная» продукция (buy-to-order).

Первая категория продукции закупается нашей компанией «на склад». К этой категории относится продукция с высоким и/или стабильным уровнем потребления. В эту же категорию мы включили отдельные виды продукции, объем которых должен поддерживаться на достаточном уровне вне зависимости от спроса, – те, которые необходимы для бесперебойной работы лаборатории, например определенные расходные материалы и аксессуары, даже если их продажи единичны. Такая «складская» продукция отгружается после поступления заказа и согласования условий поставки, как правило, в течение двух дней.

Вторая категория продукции закупается в Германии после поступления заказа от клиента. Это, как правило, редко закупаемая продукция с труднопрогнозируемым уровнем спроса. Поступающие заказы еженедельно консолидируются и отправляются на сборку в Манхайм, откуда доставляются на рефрижераторах-грузовиках с контролем температурного режима. Срок поставки такой продукции в среднем занимает около 30 дней после размещения заказа.

Задача планирования актуальна для первой категории продукции – «складской». Для того чтобы рассчитать правильный уровень запаса, используются различные методы, исходя из ABC-XYZ-классификации продукции (приоритетность/стабильность):

- нормирование запаса;
- пороговый уровень запаса;
- резервный запас;
- комбинированный подход к прогнозированию потребности.

Так как спрос отличается сезонностью и относительной нерегулярностью, особое место в планировании занимает метод экспертных оценок.

Для повышения точности прогнозов и своевременного удовлетворения спроса наша компания располагает различными статистическими инструментами – такими, например, как: специальное приложение DP Light со встроенными математическими моделями спроса и специальные транзакции ERP-системы (системы управления ресурсами) SAP для расчета точки заказа и размера страхового запаса.

При расчете складского запаса мы задаем уровень клиентского сервиса 95%, и это означает, что при размещении заказа

на «складскую» продукцию она должна быть доступна к отгрузке с вероятностью 95% (100%-ный уровень обслуживания, к сожалению, недостижим, поскольку при этом размер запаса стремится к бесконечности).

Чтобы соответствовать этой высокой планке, мы поддерживаем относительно высокий уровень запасов: склад нашей продукции в Москве занимает 2700 паллетомест. Дистрибьюторы – наши партнеры в логистической цепочке – также поддерживают определенный уровень запаса, исходя из потребностей своих клиентов. Эта система складов позволяет обеспечить надлежащий уровень клиентского сервиса и свести риск дефицита продукции к минимуму.

Не только наличие реагентов, но и скорость и качество их доставки играют значимую роль. Время обработки заказов, время сборки и время транспортировки строго регламентируются.

Администраторы, принимающие заказ, информируют клиента о наличии товара или времени его поступления, сроках годности и особых условиях транспортировки. Наши сотрудницы проходят регулярные курсы по обслуживанию и эффективным коммуникациям, а также тренинги по продукции, так как нам очень важно, чтобы каждый человек в компании твердо знал, что мы работаем с совершенно особенной продукцией и совершенно особенными клиентами; что наша первейшая задача – исключительное внимание к деталям и содействие общему результату, а именно – своевременному предоставлению врачам и пациентам достоверных результатов диагностических тестов.

Для ускорения передачи информации нами налажен электронный обмен документами с дистрибьюторами (EDI), что позволяет значительно сократить время обработки документов и, следовательно, ускорить поставку конечному пользователю.

Мы постоянно работаем над расширением «складского» ассортимента и регулярно пересматриваем список позиций, которые можно было бы держать на складе на постоянной основе, руководствуясь статистическими данными и информацией от менеджеров по продукции о значимости конкретных реагентов для работы лабораторий.

Сейчас мы занимаемся внедрением в жизнь пилотного проекта по VMI (Vendor Managed Inventory) – планированием



склада покупателя, когда компания берет на себя ответственность за поддержание необходимого запаса в лаборатории, сама контролирует приход и отслеживает расход путем сканирования входящей/исходящей продукции и анализа потребления. Это – амбициозная задача и большая ответственность. Тем не менее мы верим в свои силы, так как аналогичные проекты у наших коллег в других странах полностью себя оправдали, и мы будем использовать их положительный опыт. Также мы уверены в значительной пользе такой модели работы для наших пользователей, поскольку в результате ее применения в лаборатории уменьшаются трудозатраты на планирование, поставки становятся предсказуемыми и ритмичными.

Инновации во всех аспектах бизнеса – главное условие нашего успеха. Активно работая в высокотехнологичных областях, мы должны выявлять новые тенденции на самых ранних стадиях и быть открытыми для новых идей.

Мы постоянно сравниваем наши принципы и достижения со стандартами и передовыми методами работы нашей отрасли. Это дает нам стимул двигаться вперед – предлагать пользователям все более инновационные продукты и качественный сервис.

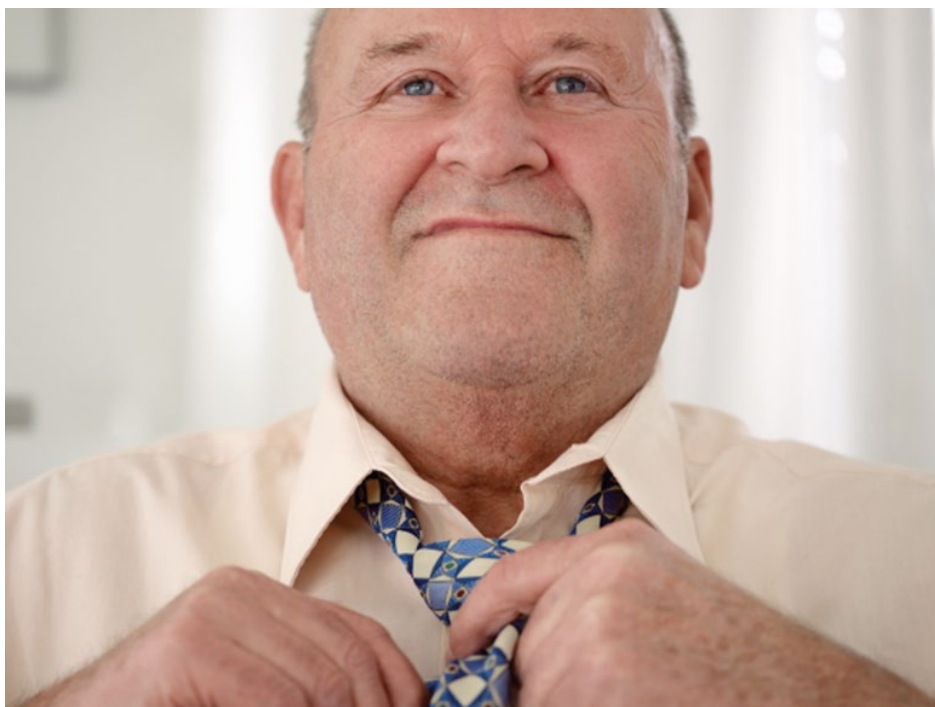
Автор статьи:

И.А. Лучина

Руководитель отдела логистики и качества

ООО «Рош Диагностика Рус»

Диагностика функции щитовидной железы



Щитовидная железа на латыни называется *glandula thy(r)eoidea* и является одной из ключевых эндокринных желез человека. Гормоны, вырабатываемые щитовидной железой, участвуют в регуляции обмена веществ и росте отдельных клеток, а также организма в целом. По данным Всемирной организации здравоохранения, среди эндокринных нарушений заболевания щитовидной железы занимают второе место после сахарного диабета. Более 665 миллионов человек в мире имеют эндемический зоб или страдают другими тиреоидными патологиями; полтора миллиарда человек сталкиваются с риском развития йододефицитных заболеваний. При этом, согласно статистике, прирост числа заболеваний щитовидной железы в мире составляет 5% в год¹.

Функция щитовидной железы зависит от синтеза и метаболизма целого ряда белков. Так, тиреоглобулин является наиболее важным компонентом, необходимым для формирования тиреоидных гормонов. Он образуется в тиреоцитах и накапливается в просвете фолликула щитовидной железы. Под влиянием фермента тиреоид-специфичной пероксидазы (ТПО) в структуре тиреоглобулина происходит йодирование тирозина, в результате чего образуются

гормоны щитовидной железы тироксин и трийодтиронин. В процессе синтеза тиреоглобулина и транспорта его в фолликулы небольшое количество этого белка может попадать в кровоток, при этом после успешной тотальной тиреоидэктомии тиреоглобулин в крови не определяется². При врожденном гипотиреозе определение тиреоглобулина можно использовать для дифференциальной диагностики тиреоидной аплазии, гипоплазии и других патологических состояний. В то же время при повреждении стенок фолликулов могут быть выявлены повышенные показатели тиреоглобулина в крови, в связи с чем тиреоглобулин считается маркером морфологической целостности щитовидной железы^{3,4}. Определение тиреоглобулина можно также использовать для дифференциальной диагностики подострого тиреоидита и искусственного тиреотоксикоза. В последнем случае низкие значения тиреоглобулина являются результатом супрессии тиреотропного гормона⁵. Таким образом, количественное определение тиреоглобулина используется для подтверждения диагноза при заболеваниях щитовидной железы и для мониторинга после тотальной тиреоидэктомии.

Присутствие в крови антител к тиреоглобулину (анти-ТГ) может привести к искажению полученного результата при

анализе на тиреоглобулин. Для исключения этого влияния при оценке концентрации тиреоглобулина рекомендуется также определять уровень анти-ТГ⁶.

Для количественного определения **тиреоглобулина** в плазме и сыворотке группа компаний Рош предлагает тест **Elecsys® Tg**

Линейный диапазон измерения – от 0,100 до 1000 нг/мл

Объем образца – 20 мкл

Повышенные концентрации анти-ТГ могут быть обнаружены у пациентов с аутоиммунным тиреоидитом, а сочетание высоких концентраций анти-ТГ и антител к тиреоид-специфичной пероксидазе (анти-ТПО) указывает на хронический лимфоцитарно-инфильтративный тиреоидит (тиреоидит Хашимото). Исследование анти-ТГ имеет большое значение в мониторинге течения тиреоидита Хашимото⁷ и при дифференциальной диагностике: в случаях с подозрением на аутоиммунный тиреоидит неизвестного происхождения с отрицательными результатами тестирования на анти-ТПО⁸, болезнь Грейвса без лимфоцитарной инфильтрации⁷, а также для исключения воздействия ТГ-аутоантител на результаты теста на тиреоглобулин⁹.

Для количественного определения **антител к тиреоглобулину** в плазме и сыворотке группа компаний Рош предлагает тест **Elecsys® Anti-Tg**

Линейный диапазон измерения – от 10,0 до 4000 МЕ/мл

Объем образца – 10 мкл

Тиреоид-специфическая пероксидаза присутствует на мембранах тиреоцитов и выделяется апикальной поверхностью клеток. Вместе с тиреоглобулином этот фермент существенно участвует в процессе йодирования тирозина и, как следствие, образования тиреоидных гормонов. ТПО является потенциальным аутоантигеном. Повышенные сывороточные титры анти-ТПО обнаруживаются при нескольких формах аутоиммунного тиреоидита. Высокие титры анти-ТПО обнаруживаются почти

у 90% пациентов с хроническим тиреоидитом Хашимото¹⁰. При болезни Грейвса 70% пациентов также имеют повышенный титр. Несмотря на то что чувствительность диагностической процедуры может быть повышена путем одновременного определения других тиреоидных антител (анти-ТГ, антитела к рецепторам тиреотропного гормона), отрицательный результат не гарантирует отсутствия аутоиммунного заболевания. Величина титра антител не коррелирует с клинической активностью заболевания, так как первоначально повышенные титры могут смениться на отрицательные результаты после продолжительного периода заболевания или во время ремиссии. Если антитела обнаруживаются снова после ремиссии, возможен рецидив заболевания¹¹.

Для количественного определения антител к тиреоид-специфической пероксидазе в плазме и сыворотке группа компаний Рош предлагает тест **Elecsys® Anti-TPO**

Линейный диапазон измерения – от 5,00 до 600 МЕ/мл

Объем образца – 20 мкл

Щитовидная железа производит два тиреоидных гормона, отличающихся наличием или отсутствием дополнительного атома йода в молекуле: тироксин (Т4) и трийодтиронин. От 60 до 80% общего количества тиреоидных гормонов, производимых щитовидной железой, поступает в кровь в форме Т4, который является относительно малоактивным тиреоидным гормоном, фактически – прогормоном, и слабо связывается непосредственно с рецепторами тиреоидных гормонов в тканях.

Гормон Т4 представляет собой основной продукт секреции щитовидной железы и образуется в результате реакции связывания двух молекул 3,5-дийодтирозина. Т4 сохраняется в связанном с тиреоглобулином виде в просвете тиреоидных фолликулов и секретируется, как правило, под влиянием тиреотропного гормона¹². Основная часть общего Т4 (> 99%) находится в сыворотке в связанной с белком форме. Поскольку концентрация транспортных белков в сыворотке подвержена влиянию экзогенных и эндогенных факторов, при оценке концентрации Т4 в сыворотке необходимо также учитывать состояние связывающих белков. В противном случае изменения таких белков (например,

обусловленные эстрогенсодержащими препаратами, связанные с беременностью или наличием нефротического синдрома и т.д.) могут привести к ошибочной оценке состояния тиреоидного обмена^{13,14}. Определение Т4 может быть использовано для выявления гипертиреоза, обнаружения первичного и вторичного гипотиреоза, а также для мониторинга терапии супрессии тиреотропного гормона¹⁵.

Для количественного определения тироксина в плазме и сыворотке группа компаний Рош предлагает тест **Elecsys® T4**

Линейный диапазон измерения – от 5,40 до 320,0 нмоль/л

Объем образца – 15 мкл

Определение свободного, не связанного с транспортными белками Т4 – очень важный элемент в повседневной клинической диагностике. Свободный Т4 измеряется параллельно с тиреотропным гормоном при подозрении на нарушение функции щитовидной железы¹⁶. Кроме того, измерение свободного Т4 используется для мониторинга тиреоид-супрессивной терапии. Определение свободного Т4 имеет преимущество – оно не зависит от изменений концентрации и характеристик связывающих белков, поэтому не требуется дополнительно определять индекс связывания (Т-захват, тироксинсвязывающий глобулин).

Для количественного определения свободного тироксина в плазме и сыворотке группа компаний Рош предлагает тест **Elecsys® FT4**

Линейный диапазон измерения – от 0,300 до 100 пмоль/л

Объем образца – 15 мкл

Перед тем как оказать действие на клетки органов-мишеней, большая часть Т4 конвертируется в биологически активную форму – трийодтиронин.

Трийодтиронин (3,5,3'-трийодтиронин, Т3) – это основной гормон, ответственный за развитие эффектов тиреоидных гормонов на ткани различных органов-мишеней. Он образуется главным образом вне щитовидной железы, в основном в печени, путем энзиматического 5'-дейодирования Т4. Соответственно концентрация Т3 в сыворотке в большей степени отражает функциональное состояние периферической ткани, чем

секреторную функцию щитовидной железы. Уменьшение процесса конверсии Т4 в Т3 приводит к снижению концентрации Т3. Это может происходить, например, под влиянием медикаментов, таких как пропранолол, глюкокортикоиды или амиодарон, и при серьезных общих заболеваниях нетиреоидного происхождения и называется «синдромом низкого трийодтиронина». Аналогично Т4, Т3 более чем на 99% связывается транспортными белками, но его сродство к ним примерно в 10 раз ниже¹⁷. Определение Т3 используется в диагностике трийодтиронин-гипертиреоза, при выявлении ранних стадий гипертиреоза и как показатель диагностики искусственного тиреотоксикоза¹⁸.

Для количественного определения трийодтиронина в плазме и сыворотке группа компаний Рош предлагает тест **Elecsys® T3**

Линейный диапазон измерения – от 0,300 до 10,0 нмоль/л

Объем образца – 30 мкл

Свободный Т3 является физиологически активной формой Т3. Как и в случае с тироксином, определение свободного Т3 имеет преимущество: оно не зависит от изменений концентрации и характеристик связывания связывающих белков¹⁷.

Для количественного определения свободного трийодтиронина в плазме и сыворотке группа компаний Рош предлагает тест **Elecsys® FT3**

Линейный диапазон измерения – от 0,400 до 50,0 пмоль/л

Объем образца – 15 мкл

Выработка тиреоидных гормонов находится под контролем тиреотропного гормона (тиреотропин, ТТГ). ТТГ, воздействуя на специфические рецепторы, находящиеся на поверхности эпителиальных клеток щитовидной железы, стимулирует выработку и активацию Т4. Выделение ТТГ регулируется системой с отрицательной обратной связью, а также рилизинг-факторами, которые выделяются нейросекреторными клетками гипоталамуса.

ТТГ образуется в специфических базофильных клетках передней доли гипофиза и подчиняется циркадному ритму секреции. Его выделение гипофизом оказывает

центральное регулирующее влияние на биологическую активность тиреоидных гормонов. ТТГ обладает стимулирующим действием на все стадии образования и секреции гормонов щитовидной железы, а также имеет пролиферативный эффект¹². Определение ТТГ является первичным тестом в диагностике нарушений функции щитовидной железы. Даже очень незначительные изменения концентрации свободных гормонов щитовидной железы сопровождаются значительно более существенными изменениями уровня ТТГ. Поэтому он является очень чувствительным и специфическим параметром для изучения функции щитовидной железы, используемым, в частности, для раннего выявления или исключения нарушений в центральном звене регуляции между гипоталамусом, гипофизом и щитовидной железой¹⁹.

Для количественного определения тиреотропного гормона в плазме и сыворотке группа компаний Рош предлагает тест Elecsys® TSH

Линейный диапазон измерения – от 0,005 до 100 мкМЕ/мл

Объем образца – 50 мкл

Гипертиреоз при болезни Грейвса (аутоиммунный гипертиреоз) возникает в результате выработки аутоантител к ре-

цепторам ТТГ (анти-ТТГ). Определение анти-ТТГ может быть полезным при диагностике и контроле этого заболевания. Большинство анти-ТТГ имитируют действие ТТГ. Поскольку они не контролируются системой обратной связи, стимуляция щитовидной железы этими антителами часто приводит к клинической картине тиреотоксикоза при болезни Грейвса²⁰.

Показания для определения анти-ТТГ:

• **Выявление или исключение аутоиммунного гипертиреоза и его дифференциальная диагностика от автономной эктопии щитовидной железы.**

Наличие анти-ТТГ указывает на то, что тиреотоксикоз у пациента скорее имеет аутоиммунное происхождение, чем является результатом токсического узлового зоба. Поскольку основное лечение болезни Грейвса может отличаться от лечения других форм тиреотоксикоза, необходимость определения анти-ТТГ становится очевидной²¹.

• **Мониторинг терапии болезни Грейвса и оценка вероятности рецидива у пациентов.** Определение анти-ТТГ очень важно для принятия решения при мониторинге лечения. Уровень анти-ТТГ имеет тенденцию к снижению в процессе лечения болезни Грейвса. Низкий уровень или отсутствие анти-ТТГ после курса лекарственной терапии может указывать на ремиссию и поэтому может служить показателем к отмене лечения²².

• **Определение анти-ТТГ в последнем триместре беременности.** Поскольку анти-ТТГ являются антителами класса IgG, они проникают через плаценту и могут спровоцировать заболевание щитовидной железы плода. Определение анти-ТТГ во время беременности у пациенток с заболеваниями щитовидной железы в анамнезе важно для оценки риска развития патологии щитовидной железы у плода.

Для количественного определения антител к рецепторам ТТГ в плазме и сыворотке группа компаний Рош предлагает тест Elecsys® Anti-TSHR

Линейный диапазон измерения – от 0,3 до 40 МЕ/л

Объем образца – 50 мкл

Важность комплексной диагностики функции щитовидной железы не вызывает сомнения. Группа компаний Рош предлагает консолидированное на платформах cobas®, автоматизированное решение для количественной оценки всех ключевых параметров функции щитовидной железы, объединенное в широкое меню тестов. Особенности тестов являются: высокая воспроизводимость, широкий линейный диапазон и малый объем образца, что гарантирует точный и надежный результат анализа для всех групп пациентов.

Каталожный номер	Название теста	Количество тестов в упаковке
11731459122	TSH ELECSYS Набор реагентов для определения ТТГ (тиреотропного гормона)	200 тестов
04738551190	TSH CalSet ELECSYS Набор калибраторов для определения ТТГ (тиреотропного гормона)	2 x 2 x 1,3 мл
11731360122	T3 ELECSYS Набор реагентов для определения Т3 (трийодтиронина)	200 тестов
11731548122	T3 CalSet ELECSYS Набор калибраторов для определения Т3 (трийодтиронина)	2 x 2 x 1 мл
03051986190	FT3 ELECSYS Набор реагентов для определения СТ3 (свободного трийодтиронина)	200 тестов
03051994190	FT3 CalSet ELECSYS Набор калибраторов для определения СТ3 (свободного трийодтиронина)	2 x 2 x 1 мл
12017709122	T4 ELECSYS Набор реагентов для определения Т4 (тироксина)	200 тестов
12017717122	T4 CalSet ELECSYS Набор калибраторов для определения Т4 (тироксина)	2 x 2 x 1 мл
11731297122	FT4 ELECSYS Набор реагентов для определения СТ4 (свободного тироксина)	200 тестов
11731661122	FT4 CalSet ELECSYS Набор калибраторов для определения СТ4 (свободного тироксина)	2 x 2 x 1 мл
05118921190	Tg Elecsys, cobas e Набор реагентов для определения Тг	100 тестов

Каталожный номер	Название теста	Количество тестов в упаковке
11820940122	Tg CalSet Elecsys, cobas e Набор калибраторов для определения Tg	2 x 2 x 1 мл
11731394122	T-Uptake ELECSYS Набор реагентов для определения Т-захвата	200 тестов
11731505122	T-Uptake CalSet ELECSYS Набор калибраторов для определения Т-захвата	2 x 2 x 1 мл
11731416190	PreciControl Universal ELECSYS Сыворотка контрольная универсальная	2 x 2 x 3 мл
06368590190	Anti-TPO Elecsys, cobas e Набор реагентов для определения Anti-TPO (антител к тиреопероксидазе)	100 тестов
06472931190	Anti-TPO CalSet Elecsys, cobas e Набор калибраторов для определения анти-ТПО-антител	2 x 2 x 1,5 мл
06368697190	Anti-Tg Elecsys, cobas e Набор реагентов для определения Anti-Tg (антител к тиреоглобулину)	100 тестов
06368603190	Anti-Tg CalSet Elecsys, cobas e Набор калибраторов для определения анти-ТГ-антител	2 x 2 x 1,5 мл
04388780190	Elecsys anti-TSHR Набор реагентов для определения антител к ТТГ-рецепторам	100 тестов
05042666191	Elecsys PreciControl Thyro AB Контрольные сыворотки для определения антитиреоидных антител	4 x 2 мл

Автор статьи:

Н.В. Коробан

Менеджер по продукции

ООО «Рош Диагностика Рус»

Литература

1. World Health Organization, United Nation Children's Fund, International Council for Control of Iodine Deficiency Disorders. Assessment of the iodine deficiency disorders and monitoring their elimination. Geneva: World Health Organization. 2001. WHO document WHO/NHD/01.1.
2. Rüter A., Smeds S., Lennquist S. Value of Serum Thyroglobulin Measurement in Patients Operated on for Well Differentiated Thyroid Carcinoma. Eur J Surg. 1998; 164: 665-671.
3. Druetta L., Croizet K., Bornet H., et al. Analyses of the molecular forms of serum thyroglobulin from patients with Graves' disease, subacute thyroiditis or differentiated thyroid cancer by velocity sedimentation on sucrose gradient and Western blot. Eur J Endocrinol. 1998; 139: 498-507.
4. Pacini F., Pinchera A. Serum and tissue thyroglobulin measurement: Clinical applications in thyroid disease. Biochemie. 1999; 81: 463-467.
5. Refetoff S., Lever E.G. The value of serum thyroglobulin measurement in clinical practice. JAMA. 1983; 250: 2352-2357.
6. Spencer C. International Thyroid Testing Guidelines. National Academy of Clinical Biochemistry, August, 2001; Section 3E, 11-14.
7. Thomas L. Thyroid function. Thyroglobulin antibodies. In: Thomas L (ed.). Deutsch: Labor und Diagnose. TH-Books, Frankfurt. 5th edition. 1998: 1043. English: Clinical Laboratory Diagnosis. 1st edition. 1998: 1021.
8. Feldt-Rasmussen U. Analytical and clinical performance goals for testing autoantibodies to thyroperoxidase, thyroglobulin, and thyrotropin receptor. Clin Chem. 1996; 42(1): 160-163.
9. Spencer C.A., Takeuchi M., Kazarosyan M., et al. Serum Thyroglobulin Antibodies: Prevalence, Influence on Serum Thyroglobulin Measurement, and Prognostic Significance in Patients with Differentiated Thyroid Carcinoma. J Clin Endocrinol Metab. 1998; 83(4): 1121-1127.
10. McIntosh R.S., Asghar M.S., Weetman A.P. The antibody response in human autoimmune thyroid disease. Clin Sci. 1997; (92)6: 529-541.
11. Volpé R. Rational Use of Thyroid Function Tests Crit Rev Clin Lab Sci. 1997; 34(5): 405-438.
12. Wheeler M.H., Lazarus J.H. Diseases of the Thyroid. London, Glasgow, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras: Chapman and Hall Medical. 1994: 108-115.
13. Wenzel K.W. Pharmacological interference with in vitro tests of thyroid function. Metabolism. 1981; 30(7): 717-732.
14. Burrow G.N. Thyroid status in normal pregnancy. J Clin Endocrinol Metab. 1990; 71: 274-275.
15. Nelson J.C., Wilcox R.B. Analytical performance of free and total thyroxine assays. Clinical Chemistry. 1996; 42: 1,146-154.
16. Ekins R.P. Measurement of free hormones in blood. Endocr Rev. 1990; 11: 5.
17. Klee G.G. Clinical usage recommendations and analytic performance goals for total and free triiodothyronine measurements. Clinical Chemistry. 1996. 42: 155-159.
18. Surks M.I., Chopra I.J., Mariash C.N., et al. American Thyroid Association guidelines for use of laboratory tests in thyroid disorders. JAMA. 1990; 63: 1529-1532.
19. Nicoloff J.T., Spencer C.A. The use and misuse of the sensitive thyrotropin assays. J Clin Endocr Metab. 1990; 71: 553-558.
20. Rapoport B., Chazenbalk G.D., Jaume J.C., et al. The thyrotropin (TSH) receptor: interaction with TSH and autoantibodies.
21. Quadbeck B., Hoermann R., Roggenbuck U., et al. Sensitive thyrotropin and thyrotropin-receptor antibody determinations one month after discontinuation of antithyroid drug treatment as predictors of relapse in Graves' disease. Thyroid. 2005; 15: 1047-1054.
22. Okamoto Y., Tanigawa S.I., Ishikawa K., et al. TSH receptor antibody measurements and prediction of remission in Graves' disease patients treated with minimum maintenance doses of antithyroid drugs. Endocr J. 2006; 53(4): 467-472.

История успеха анализаторов критических состояний Roche: от истоков к совершенству

На сегодняшний день ни одна многопрофильная больница или специализированный медицинский центр не обходится без такого прибора, как анализатор критических состояний. С его помощью текущее состояние пациента, находящегося в отделении реанимации или на операционном столе, определяется не более чем за минуту. В жестких условиях борьбы за жизнь пациента каждый момент может стать решающим. Вовремя скорректированный процесс лечения может переломить ситуацию и дать положительную динамику уже в течение первых суток.

Современный анализатор критических состояний от группы компаний Рош – это высокотехнологичный прибор, предоставляющий точные результаты за минимальное время. Он имеет сложную конструкцию, но при этом очень прост в использовании; изучение основных функций анализатора не займет много времени даже у начинающего врача. При выполнении анализа врач получает не только количественные значения жизненно важных показателей (концентрация газов крови, электролитов, метаболитов и параметров оксиметрии), но и карту кислотно-щелочного состояния (КЩС), на которой графически отображается предполагаемый диагноз пациента. Появилась возможность отслеживать изменения показателей, используя наглядные графики, построенные по результатам анализов конкретного пациента в течение суток.

Свое современное «лицо» анализатор приобрел за более чем полувековую историю. История развития анализа газового состава крови и его применения в различных областях медицины (хирургия, анестезиология, реаниматология, терапия, педиатрия и клиническая патология) напрямую связана с первыми работами исследователя-анестезиолога доктора Джона Венделла Северингхауса. В 1950-х годах молодому ученому удалось разработать первый прототип современного электрода для измерения парциального давления углекислого газа в крови (электрод Северингхауса – PCO_2). Для оценки вида нарушения КЩС наибольшее значение имеют три

показателя: pH , pCO_2 , pO_2 . Синергия медицины и техники явилась стимулом для создания первых систем биохимического и функционального контроля КЩС, а также газового состава крови и тканей. В 1958-1959 годах совместными усилиями группы врачей и инженеров был создан первый в мире анализатор для измерения трех основных параметров кислотно-основного равновесия, которые по праву являются «золотым стандартом» лабораторной экспресс-диагностики, – pH , парциального давления кислорода (pO_2) и углекислого газа (pCO_2) (рисунок 1)¹.

Тем временем создание отделений гемодиализа и активная разработка методики замещения функции почек путем диализа стали основным стимулом для разработки электродов, позволяющих определить концентрацию важнейших электролитов крови (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Cl^-), и последующего внедрения их в анализаторы газового состава крови.

В начале 1960-х годов стали доступны первые коммерческие анализаторы газового состава и электролитов крови, которые использовались в основном в клинических лабораториях и были дале-



Рисунок 1. Первая система для анализа газового состава крови, содержащая три основных электрода: pH , pO_2 , pCO_2 ²

ки от совершенства, но при этом отвечали основным требованиям экспресс-диагностики неотложных состояний:

- **Короткий цикл измерения – 1-2 минуты;**
- **Быстрое получение результата** от момента принятия решения о выполнении анализа до получения отчета об исследовании – **5-10 минут;**
- **Минимальный объем пробы крови – до 200 мкл**, учитывая необходимость достаточно частого взятия пробы³.

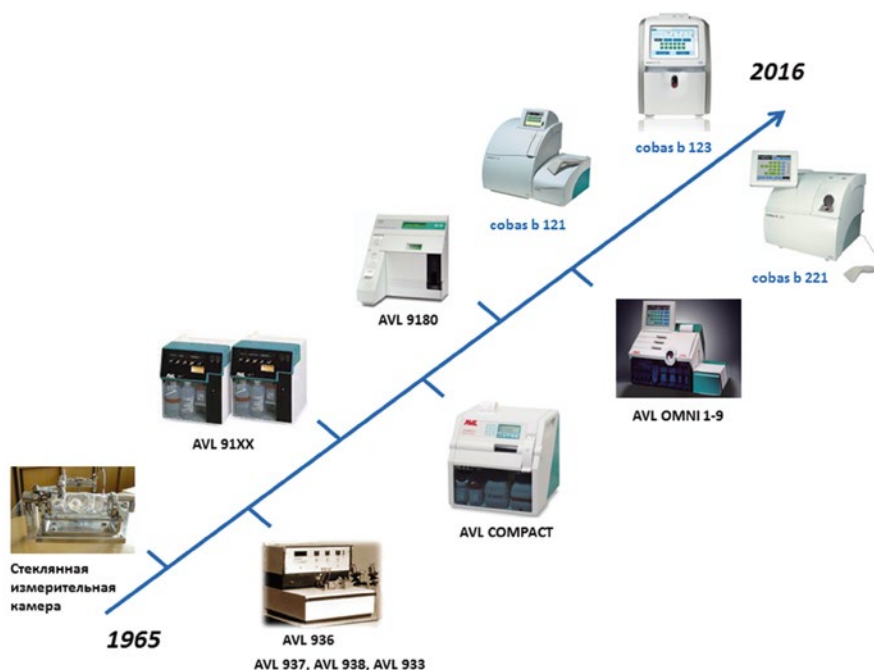


Рисунок 2. Эволюция развития анализаторов газов крови и электролитов производства группы компаний Рош

Одним из пионеров в разработке анализаторов газов крови и электролитов стал крупный австрийский концерн AVL, который в 1950-х годах являлся лидером в области разработки дизельных двигателей и измерительной техники. После открытия производства анализаторов AVL в городе Граце (Австрия) в 1960-х годах и использования в первых газовых анализаторах уникальной конструкции – стеклянной измерительной камеры – началась эра непрерывного развития и совершенствования технологий производства газовых анализаторов AVL. В 2000 году подразделение австрийского концерна AVL, производящее анализаторы газового состава крови, стало частью группы компаний Рош. На сегодняшний день группа компаний Рош совместно с AVL имеет богатейшую историю создания высокотехнологичных анализаторов газов крови и электролитов, которая насчитывает более 40 лет (рисунок 2).

Первые анализаторы критических состояний AVL, несомненно, отвечали требованиям того времени, но имели ряд недостатков: неполная панель измеряемых параметров в одном анализаторе, необходимость использования газовых баллонов для калибровки, большое количество расходных материалов, необходимость выполнения многочисленных процедур по обслуживанию анализатора непосредственно оператором.

Все недостатки первых несовершенных приборов задали основной вектор эволюции газовых анализаторов, которая строилась на основных принципах и особенностях исследований при критических состояниях пациента:

- Большое количество пользователей анализатора, а значит, приборы должны быть просты в использовании, ведь сотрудники также работают с большим количеством другого оборудования;
- Анализаторы и расходные материалы должны быть надежными;
- Анализаторы должны быть пригодными для использования во всех отделениях больницы, даже таких специфических, как детская реанимация.

Результатом многолетней эволюции анализаторов критических состояний AVL (в последующем группа компаний Рош) стало создание современных си-

стем для комплексного анализа газового, электролитного и метаболитного состава крови, которые могут быть использованы как в лабораториях различного уровня, так и непосредственно в реанимационном отделении. Для обеспечения высокого качества проводимых исследований, автоматизации процесса передачи и хранения данных системы измерения обладают большими возможностями соединения с различными информационными продуктами.

На сегодняшний день группа компаний Рош предлагает оптимальные решения для анализа критических состояний пациентов в зависимости от потребностей и масштабов лаборатории и клинических отделений: мультипараметровый анализатор **cobas b 221** для лабораторий с высокой пропускной способностью (свыше 700 измерений в сутки) и компактный картриджный анализатор **cobas b 123** для отделений реанимации и лабораторий, который не отстает по производительности от анализатора **cobas b 221** и при этом полностью отвечает современной концепции лабораторной экспресс-диагностики неотложных состояний, основанной на подходе ИМЛ (Исследование по Месту Лечения пациента)*.

К настоящему моменту уже более двухсот анализаторов **cobas b 221** введены в эксплуатацию в лечебно-профилактических учреждениях по всей стране. За это время они успели зарекомендовать себя как надежные и простые в управлении системы, которые рассчитаны на высокую нагрузку по количеству исследований, при этом качество исследований остается максимально высоким. В многопрофильных медицинских учреждениях с крупными отделениями реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) зачастую потребность в постоянном мониторинге кислотно-основного равновесия настолько высока, что даже при производительности анализатора 30 исследований в час невозможно ограничиться одним или даже двумя анализаторами **cobas b 221**. Наглядным примером высококлассной организации лабораторной службы и максимального использования анализатора **cobas b 221** служит крупнейший в Тюменской области лечебно-диагностический комплекс – ГБУЗ Тюменской области «Областная



Рисунок 3. Сотрудники лаборатории ГБУЗ Тюменской области «Областная клиническая больница № 1»

клиническая больница № 1» (рисунок 3). В ведении заведующей КДЛ Сорокиной Натальи Алексеевны находится шесть анализаторов критических состояний **cobas b 221**, четыре из которых работают непосредственно в экспресс-лаборатории, находящейся на территории операционного блока и в шаговой доступности от ОРИТ. В целях получения отзыва о многолетнем опыте работы на анализаторе **cobas b 221** мы решили задать несколько вопросов опытному сотруднику экспресс-лаборатории «Областной клинической больницы № 1» в г. Тюмени – врачу КДЛ Шарафутдиновой Наталье Владимировне.

– *Наталья Владимировна, как давно Вы используете анализатор **cobas b 221**? Всегда ли в рабочем режиме находятся все четыре анализатора **cobas b 221**? Какая в среднем нагрузка приходится на анализаторы в день?*

– *Мой опыт работы на анализаторах критических состояний **cobas b 221** на данный момент составляет уже более трех лет. Сотрудники экспресс-лаборатории стараются равномерно распределить нагрузку на приборы, так как мы постоянно работаем в условиях экстренного реагирования, и, конечно же, все анализаторы **cobas b 221** всегда находятся в режиме «Готов к работе». Параллельно в отделении может проходить несколько операционных процедур, следовательно, всегда хотя бы один анализатор должен быть свободен для измерений. В нашей зоне ответственности находится около 50 коек (детская и взрослая реанимация), и при интенсивной работе всех отделений нагрузка на анализаторы может составлять более 70 исследований в день.*

* ИМЛ равнозначно POC (Point-of-Care).

– Какие измеряемые параметры наиболее востребованы врачами и используете ли Вы все настройки меню анализатора при повседневной работе?

– В связи с тем что конфигурация анализатора **cobas b 221** позволяет измерять 18 наиболее важных при критических состояниях параметров, включая газы крови, электролиты, метаболиты, показатели оксиметрии и неонатальный билирубин, врачи часто предпочитают иметь результаты по всем параметрам для получения полной картины о состоянии пациента. В детской реанимации всегда очень востребовано измерение таких метаболитов, как глюкоза и лактат. Широкая панель расчетных параметров – а в анализаторе **cobas b 221** их 39 – вносит весомый вклад в интерпретацию полученных результатов. В случае необходимости у нас всегда есть возможность визуализировать и распечатать карту кислотно-щелочного состояния пациента, которая служит прекрасным инструментом графического представления зависимости между pH и парциальным давлением CO₂ (pCO₂).

– Наталья Владимировна, как происходит регулярное обслуживание анализатора? Возникают ли у Вас какие-либо вопросы по замене расходных материалов?

– Быстро и просто! Для работы анализатора **cobas b 221** не требуются баллоны с газом, так как применяется жидкостная калибровка. В анализаторе **cobas b 221** используются необслуживаемые долгоживущие электроды, не требующие замены мембран. Поскольку анализатор не требует выполнения каких-либо сложных процедур при обслуживании, значимых трудностей с эксплуатацией не возникает. В случае необходимости сервисного обслуживания мы пользуемся услугами профессионального инженера или обращаемся к квалифицированным сотрудникам регионального Центра поддержки пользователей группы компаний Рош.

Существуют различные способы организации работы лабораторной службы при неотложных состояниях пациентов, при этом очень важно оценить режим работы анализатора газового состава крови: будет ли он располагаться в лаборатории или же непосредственно в ОРИТ, кто будет проводить измерение – сотрудник



Рисунок 4. Широкий функционал настроек меню анализатора позволяет конфигурировать каждый анализатор в соответствии с потребностями пользователя

лаборатории или врач-клиницист. Когда в отделении появляется потребность в портативном и мобильном анализаторе для измерения параметров кислотно-основного равновесия, незаменимым для учреждения становится современный анализатор **cobas b 123**, все обслуживание которого заключается лишь в замене нескольких расходных материалов, рассчитанных на определенное количество измерений.

Многие пользователи анализаторов критических состояний группы компаний Рош научились эффективно комбинировать разные типы приборов на базе одной лабораторной службы. Одним из ярких примеров высококвалифицированной организации рабочего процесса измерения показателей кислотно-основного равновесия является ФГБУ «Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии» Министерства здравоохранения РФ, г. Астрахань (рисунок 5), в котором руководителем клинической лаборатории является Петрова Ольга Владимировна. Сотрудники Ольги Владимировны имеют многолетний опыт эксплуатации анализаторов критических состояний: вот уже более пяти лет они используют многофункциональный анализатор **cobas b 221**, а не так давно ввели в повседневную работу картриджную систему **cobas b 123** для измерения газов, электролитов и метаболитов крови. Ольга Владимировна любезно согласилась поделиться с нами впечатлениями от работы на анализаторах критических состояний **cobas b 221** и **cobas b 123**.



cobas b 123



cobas b 221

Петрова Ольга Владимировна: «При выборе анализаторов газового состава крови мы руководствовались следующими критериями: во-первых, время выполнения исследования должно быть минимальным; во-вторых, содержание гемоглобина в крови должно быть измеряемым показателем, а не расчетным и, конечно же, исследование содержания гемоглобина в крови должно проводиться одновременно с другими показателями (рН, рСО₂, рО₂, натрий, калий, кальций, глюкоза и лактат). Этим критериям полностью отвечает как анализатор **cobas b 221**, на котором мы активно выполняем исследования уже более пяти лет, так и новая для нашей лаборатории современная картриджная система для измерения основных параметров КЩС – **cobas b 123**. Ежедневно анализаторы выдерживают достаточно высокую нагрузку по количеству исследований: в среднем 70-100 образцов в день на анализаторе **cobas b 221** и около 150 измерений на анализаторе **cobas b 123**. Сотрудники нашей лаборатории имеют большой опыт эксплуатации анализаторов, так как многие из них участвовали в специализированных обучающих семинарах, но в случае если при повседневной работе возникают какие-либо вопросы, то всегда можно воспользоваться услугами горячей линии. Сотрудники регионального Центра поддержки пользователей вежливы, корректны и всегда помогают решить вопрос. Через какое-то время после обращения сотрудники горячей линии перезванивают для уточнения, есть ли дополнительная необходимость в консультации по работе на анализаторах и бесперебойно ли организован процесс измерения.

И, резюмируя все вышесказанное, хотелось бы сделать следующее заключение:

1. На обеих моделях анализаторов критических состояний исследование проводится быстро; параметр «гемоглобин» измеряется, а не рассчитывается анализатором, и измерение происходит одновременно с другими показателями.



Рисунок 5. Дружный коллектив лаборатории ФГБУ «Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии» МЗ РФ, г. Астрахань

2. Большая часть характеристик и свойств анализаторов **cobas b 221** и **cobas b 123** являются общими для систем, но при этом существуют принципиальные различия в анализаторах: система **cobas b 221**, несомненно, требует периодического обслуживания, как пользовательского, так и профессионального. При профилактических работах, раз в три года, существует возможность замены некоторых деталей прибора при необходимости, в результате можно получить практически новый анализатор. В свою очередь, эксплуатация системы **cobas b 123** не подразумевает какого-либо обслуживания: нет необходимости тратить время на установку и калибровку гемоглобиновой кюветы, глюкозо-лактатного сенсора и других сенсоров. Гемоглобиновая кювета и порт ввода пробы являются частью контейнера с реагентами. Следовательно, когда заканчиваются реагенты в контейнере, необходимо просто удалить контейнер и поставить новый, в результате мы регулярно меняем и гемоглобиновую кювету, и порт ввода пробы. Эксплуатация проста как раз, два, три...»

Удобные и интуитивно понятные анализаторы критических состояний группы компаний Рош, следуя современным тенденциям, могут адаптироваться под потребности как лабораторий, так и отделений реанимации. Они являются эффективным инструментом в слаженной работе врачей КДЛ и клиницистов при лечении тяжелых больных. Вовремя полученный качественный результат анализа КЩС играет ключевую роль при назначении правильной терапии и оказывает непосредственное влияние на длительность пребывания пациента в отделении реанимации и интенсивной терапии.

Так, согласно утверждению Национального комитета по клиническим лабораторным стандартам США, «анализ газов крови и рН оказывает наиболее прямое и важное воздействие на лечение больного, чем любое другое лабораторное исследование»⁴.

Авторы статьи:

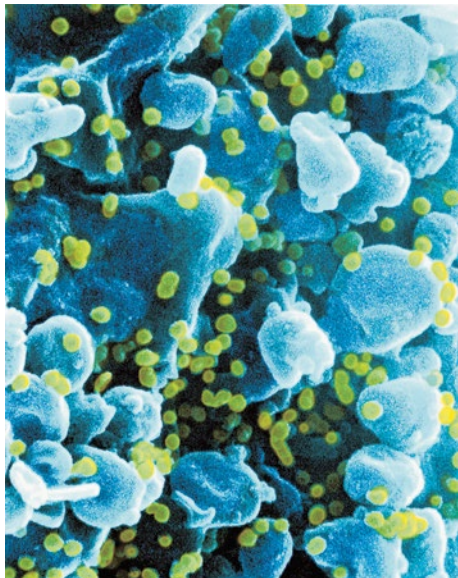
Д.И. Тартаковская
Специалист по обучению клиентов
Т.П. Попова
Специалист по продукции,
ООО «Рош Диагностика Рус»

Литература

1. Gadgeteering for health care. Anesthesiology. Severinghaus JW. 2009; 110: 721-728.
2. History of blood gas analysis. IV. Leland Clark's oxygen electrode John W. Severinghaus, MD, and Poul B. Astrup, Dr med.
3. Торшин В.А. Современное состояние проблемы лабораторной экспресс-диагностики в неотложной медицине. Москва: РМАПО.
4. National Committee for Clinical Laboratory Standards (Национальный комитет по клиническим и лабораторным стандартам, США), Document C 27-A, Approved Guideline, April, 1993.

1981–2016:

эволюция подходов к лечению ВИЧ-инфекции



Синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД) относится к так называемым медленным вирусным инфекциям. Общие признаки медленных инфекций: длительный скрытый период, медленное развитие неуклонно прогрессирующих симптомов, преимущественное поражение одной тканевой системы и, как правило, летальный исход. В 1983 году был выделен и идентифицирован (практически одновременно двумя группами исследователей – во Франции и США) возбудитель СПИДа – вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), представитель немногочисленной группы ретровирусов человека.

ВИЧ-инфекция развивается следующим образом. В период от 3-х до 16 недель (иногда позже) после ВИЧ-инфицирования развивается острая стадия инфекции, которая нередко остается нераспознанной из-за сходства ее проявлений с симптомами других инфекций, а порой протекает и вовсе бессимптомно. Затем следует длительная субклиническая стадия: в среднем от 1-го до 8 лет, иногда и дольше. Далее заболевание прогрессирует до стадии собственно СПИДа, которая характеризуется нарастающей иммуносупрессией и проявляется в развитии угрожающих жизни инфекционных заболеваний, чаще всего вызванных условно-патогенными микроорганизмами. Эти заболевания, названные оппортунистическими, имеют протозойную, грибковую, бак-

териальную или вирусную природу. Среди простейших первое место занимает токсоплазма (церебральный токсоплазмоз); среди грибов – пневмоцисты (пневмоцистная пневмония), грибы рода *Candida*, криптококки и аспергиллы; среди бактериальных инфекций – туберкулез (это самая частая причина смерти лиц с ВИЧ-инфекцией); среди вирусов лидирует цитомегаловирус.

Ныне считается, что первые массовые случаи заражения ВИЧ-инфекцией произошли в конце 1970-х годов; соответственно случаи массового выявления СПИДа пришлись на 80-е годы (первый случай был зарегистрирован в 1981 году в США). В первой половине 80-х годов специализированной терапии, которая была бы направлена непосредственно на причину заболевания, т.е. на борьбу с вирусом, естественно, не было, и лечение СПИДа состояло в борьбе с оппортунистическими заболеваниями. Кроме того, открывались хосписы, появлялись группы поддержки и ухода за тяжелобольными. В эти годы средняя продолжительность жизни ВИЧ-инфицированных составляла 10-11 лет¹, а пациенты с диагнозом «СПИД» умирали от оппортунистических заболеваний в среднем в течение одного года после постановки диагноза.

Начиная с 1983 года ВИЧ было посвящено больше исследований, чем какому бы то ни было другому вирусу. Пришло понимание того, что терапия должна быть направлена непосредственно на подавление воспроизведения вируса в организме. Искомую схему назвали антиретровирусной терапией (АРВТ). Ее цель – максимально снизить присутствие вируса в клетках человека. В 1987 году появился первый препарат, ингибирующий обратную транскриптазу ВИЧ, – зидовудин. В 90-х годах начали активно применяться другие ингибиторы этого фермента, а также был разработан иной препарат, подавляющий протеазу вируса. 1996 год – начало эры комбинированной терапии, когда препараты, направленные против различных ферментов ВИЧ, стали применять совместно.

Слово «эра» вполне применимо в данном контексте, так как результаты оказались весьма оптимистическими. Появлялись все новые и новые препараты. В 2008 году были опубликованы данные большого исследова-

Первооткрыватели ВИЧ:



Люк Монтанье (Luc Montagnier), французский вирусолог, родился в 1932 г. Нобелевская премия по медицине в 2008 г.



Франсуаза Барре-Синусси (Françoise Barré-Sinoussi), французский вирусолог, родилась в 1947 г. Нобелевская премия по медицине в 2008 г.



Роберт Галло (Robert Gallo), американский вирусолог, родился в 1937 г.

Ожидаемая продолжительность жизни (лет) после выявления ВИЧ

Период, когда была начата АРВТ	1996-1999	2000-2002	2003-2005
Лица, которым при начале АРВТ было 20 лет	36,1±0,6	41,2±0,5	49,4±0,5
Лица, которым при начале АРВТ было 35 лет	25,0±0,4	30,1±0,3	37,3±0,4

ния, выполненного в 12-ти европейских странах, а также в США и Канаде, в которое были включены лица с ВИЧ-инфекцией, получавшие комбинированную АРВТ в 1996-1999 годах (более 18 тысяч пациентов), в 2000-2002 (14 тысяч) и в 2003-2005 (11 тысяч)². В таблице показаны результаты этой работы, говорящие о том, что продолжительность жизни ВИЧ-инфицированных уже через 10 лет после введения комбинированной АРВТ приблизилась к средней продолжительности жизни в здоровой популяции, – при условии, что больные получают оптимальное лечение.

Успехи АРВТ были неразрывно связаны с развитием лабораторных методик, которые необходимы не только для насколько возможно ранней диагностики ВИЧ-инфекции, но и для мониторинга результатов терапии. Напомним, что цель АРВТ – подавление воспроизведения вируса. Как наиболее прямым образом измерить, в какой степени терапия достигла этой цели? Как испытать эффективность создаваемого препарата?

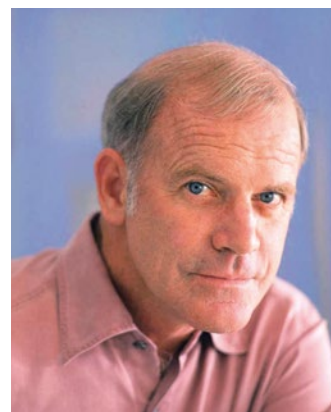
16 декабря 1983 года Кэри Муллис (Kary Mullis) – химик, сотрудник корпорации Cetus – после нескольких месяцев напряженной работы ума и духа, прошедших с момента теоретического озарения, осуществил в лаборатории первую успешную реакцию ПЦР. Полимеразная цепная реакция, позволяющая обнаруживать в биологических образцах следовые количества искомого генетического материала (ДНК или РНК), произвела революцию в молекулярной биологии и вскоре нашла применение и в областях, далеких от академической науки, в том числе – в лабораторной диагностике ВИЧ-инфекции.

Нобелевская премия была присуждена Кэри Муллису в 1993 году, но группа компаний Рош оценила значение его открытия раньше и уже в 1991 году приобрела у Cetus права на ПЦР. С тех пор и поныне Рош постоянно инвестирует значительную долю своих активов в развитие этой технологии для диагностических целей.

Хронология вклада группы компаний Рош в диагностику и мониторинг лечения ВИЧ вкратце такова:

- В середине 90-х годов, параллельно с испытаниями таких антиретровирусных препаратов, как норвир, комбиви, вирасепт и др., появилась первая в мире тест-система для определения концентрации ВИЧ в плазме крови – AMPLICOR HIV-1 Monitor.
- В конце 90-х годов появился первый автомат для ПЦР-тестирования ВИЧ – COBAS® AMPLICOR. Этот прибор, до сегодняшнего дня еще работающий в некоторых лабораториях, участвовал в клинических испытаниях таких препаратов, как сузива, зиаген, калетра, фузеон и др.
- И в 90-х и в 2000-х годах выходили новые поколения тест-систем AMPLICOR HIV-1 Monitor, характеризующиеся все более высокой чувствительностью.
- В начале 2000-х годов появилась инструментальная платформа COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®, реализующая новый (для того времени) формат ПЦР с детекцией результатов в реальном времени. Ряд новых препаратов (тиранавир, презиста, исентресс и др.) проходили клинические испытания с помощью этой платформы.
- В 2009 году группа компаний Рош вывела на рынок принципиально новую тест-систему для молекулярного анализа ВИЧ на платформе COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®. Это была первая в мире тест-система, которая использовала не одну мишень для ПЦР-амплификации, а две, причем обе мишени были выбраны вне тех участков генома ВИЧ, которые являются таргетными для АРВТ. Дело в том, что АРВТ приводит к появлению множественных мутаций лекарственной устойчивости в геноме ВИЧ. Эти мутации не только снижают вирусологический ответ на терапию, но также, изменяя мишень, снижают вероятность ее распознавания в ПЦР. В тест-системах всех других производителей использовалась единственная мишень для амплификации – в одном из участков

Первооткрыватель ПЦР:



Кэри Муллис (Kary Mullis), американский биохимик, родился в 1944 г. Нобелевская премия по химии в 1993 г.

региона *pol*, который кодирует протеазу, обратную транскриптазу и интегразу, т.е. как раз те ферменты, против которых направлены антиретровирусные препараты. Выбор двух мишеней в «нетерапевтических» регионах генома улучшает выявление полиморфных и рекомбинантных вариантов ВИЧ, позволяет избежать занижения количественной оценки вирусной нагрузки и способствует раннему выявлению лекарственной резистентности.

- В 2014 году почти одновременно появились две новые инструментальные платформы: **cobas® 4800** и **cobas® 6800/8800***. Тест-системы для этих платформ также были разработаны новые**.

Успехи, которых достигла АРВТ за 20 лет ее активного применения, несомненны. Благодаря ей ВИЧ-инфекция радикально изменила свой статус: от летального заболевания к заболеванию контролируемому (как диабет или гипертония). В настоящее время ВОЗ характеризует ВИЧ-инфекцию как хроническую управляемую инфекцию³. Однако этот контроль требует пожизненного приема дорогостоящих и нередко вызывающих неприятные побочные эффекты препаратов. Прекращение терапии сопровождается новым подъемом вирусной нагрузки в среднем уже через две недели.

Правда, в марте 2013 года было объявлено (учеными из Университета Джонса Хопкинса) о случае полного излечения от ВИЧ-инфекции. Девочке, родившейся с ВИЧ в штате Миссисипи в 2010 году, был проведен интенсивный курс АРВТ начиная с первых 30 часов жизни. После этого ребенок полтора года получал стандартное для но-

* Данная платформа находится на регистрации в Росздравнадзоре.

** Эти тест-системы в настоящее время проходят процедуру регистрации в Росздравнадзоре.

сителей ВИЧ лечение. Затем терапия была прервана по решению матери. Спустя девять месяцев после прекращения терапии врачи обследовали девочку, и все тесты на ВИЧ дали отрицательный результат! Но в июле 2014 года американские ученые вновь обнаружили вирус в крови ребенка...

Пул латентно инфицированных клеток («резервуар», см. глоссарий) формируется уже на ранних стадиях ВИЧ-инфекции, при этом их доля не превышает 0,05% от продуктивно инфицированных клеток. АРВТ приводит к быстрой гибели продуктивно инфицированных Т-лимфоцитов, но вирусные частицы продолжают образовываться за счет реактивации латентно инфицированных клеток, которые действию лекарств не поддаются. С учетом частоты реактивации полное уничтожение резервуаров ВИЧ потребовало бы самое меньшее 73 года⁴.

К настоящему времени известен только один случай стерилизующего (см. глоссарий) излечения, но и этот случай до сих пор является предметом дискуссий. Он связан с так называемым «берлинским пациентом», у которого в 1995 году был выявлен ВИЧ, а в 2006 году – лейкомия. В связи с лейкомией в 2007 году ему дважды делали пересадку костного мозга, причем доноры были выбраны среди тех, у кого присутствовала мутация гена рецептора CCR5. Эта мутация (*d32*), которая встречается примерно у 0,3% населения мира, не позволяет большей части генетических субтипов ВИЧ проникать в лимфоциты человека. После пересадок костного мозга присутствие вируса в крови «берлинского пациента» перестало выявляться⁵.

Механизмы уничтожения резервуара ВИЧ у «берлинского пациента» до сих пор обсуждаются; однако этот уникальный случай открыл первую из стратегий (*стратегия CCR5*), направленных на абсолютное удаление вируса из организма, – найти генную терапию, которая позволила бы получить аутологичные Т-лимфоциты, несущие мутацию *d32*.

Другая стратегия уничтожения латентного резервуара ВИЧ может быть названа *иммунной*. Она связана с попытками повлиять на ключевые цитокины, управляющие активацией Т-лимфоцитов. В настоящее время проводятся три клинических испытания, в которых изучается влияние экзогенного интерферона альфа на резервуар латентной инфекции (их описание можно найти на сайте US National Institutes of Health⁶). Результаты испытаний пока не опубликованы.

Наконец, последняя из появившихся в научных публикациях стратегий стерилизующего излечения носит название *shock and kill*, что в данном контексте можно перевести как *вытряхнуть и уничтожить*⁷. Это фармакологический подход, предлагающий дополнить АРВТ кратковременным приемом препаратов с условным названием «переключатель латентности» (*latency-reversing agent*). Эти препараты избирательно «пробуждают» спящие вирусы резервуара, индуцируя транскрипцию вирусной ДНК, и делают инфицированные клетки чувствительными либо к вызванному вирусом апоптозу, либо к гибели, опосредованной иммунными механизмами хозяина. В настоящее время исследуется несколько классов препаратов, которые могут сыграть роль переключателей латентности. Часть из них достигли стадии пилотных клинических испытаний.

В 2014 году Организация Объединенных Наций по ВИЧ/СПИДу (ЮНЭЙДС) опубликовала документ⁸, в котором сформулирована цель «90-90-90»:

К 2020 году

- 90% процентов людей, живущих с ВИЧ, будут знать о своем ВИЧ-статусе;
- 90% из всех пациентов с диагнозом ВИЧ-инфекции будет предоставлена антиретровирусная терапия;
- у 90% всех пациентов, получающих антиретровирусную терапию, вирусная нагрузка будет снижена до неопределяемого уровня.

Глоссарий:

Резервуар – популяция инфицированных клеток, обеспечивающая сохранение способного к репликации вируса у пациентов, принимающих оптимальную АРВТ в течение многих лет.

Функциональное излечение – перманентное подавление вирусной нагрузки в отсутствие терапии до уровней, при которых не развивается иммунодефицит и исключена трансмиссия (передача вируса другому человеку).

Стерилизующее излечение – полное удаление из организма всех способных к репликации форм вируса.

Латентная инфекция (латентность) – обратимое состояние инфекции, при котором вирус присутствует в индивидуальных клетках, но не реплицируется.

Переключатель латентности – вещество, вызывающее *de novo* транскрипцию вируса в латентно инфицированных клетках.

Сама постановка этих грандиозных задач, так же как и эволюция терапевтических подходов от малоуспешной борьбы с симптомами до разработки стратегий стерилизующего излечения, – свидетельство огромных успехов, достигнутых здравоохранением в борьбе с ВИЧ/СПИДом. И эти успехи были бы невозможны без развития и постоянного совершенствования диагностических средств, объединяющих тест-системы, инструментальные платформы и аналитические решения.

Автор статьи:

Т.В. Кондрашова
Старший менеджер по продукции
ООО «Рош Диагностика Рус»

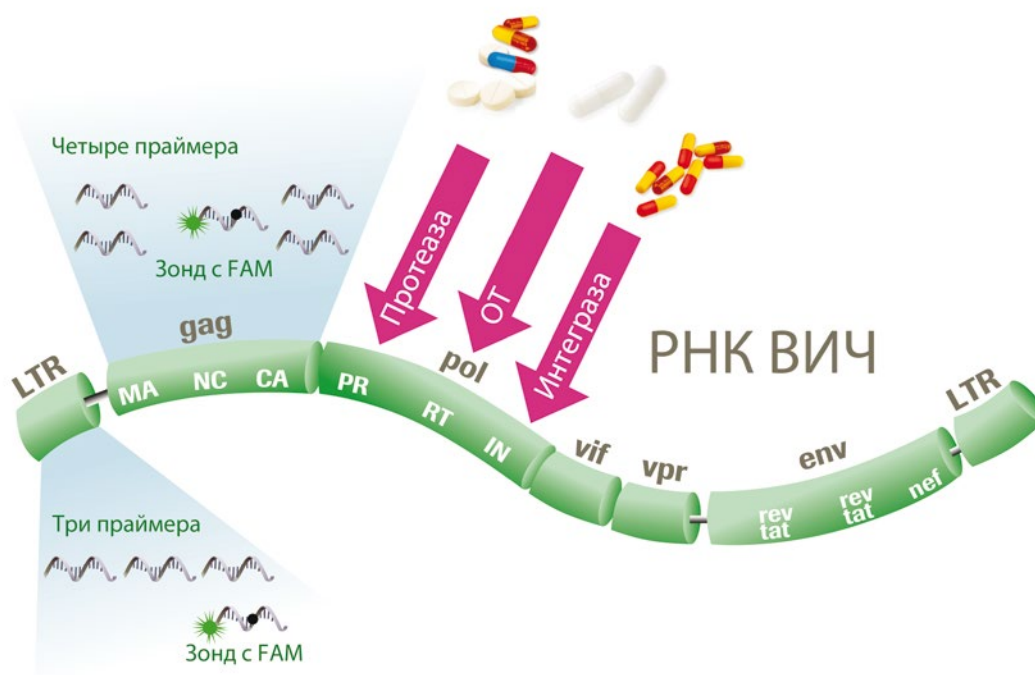
Литература

1. UNAIDS, WHO. 2007 AIDS epidemic update.
2. R. Hogg et al. Life expectancy of individuals on combination antiretroviral therapy in high-income countries: a collaborative analysis of 14 cohort studies. *Lancet*. 2008; 372: 293-299.
3. http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/AIDS_by_the_numbers_2015_en.pdf
4. Бобкова М.Р. Патопизиология ВИЧ-инфекции. В кн.: Вирус иммунодефицита человека – медицина. Санкт-Петербург, 2011.
5. <http://www.amfar.org/articles/around-the-world/treatasia/2013/>
6. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show>
7. Spivak A.M., Planelles V. HIV-1 eradication: early trials (and tribulations). *Trends in Molecular Medicine*. 2016; 22(1): 10-27.
8. http://www.ecuo.org/media/filer_public/2015/02/05/unaids_treatment_targets_170914_ru.pdf

Будем на шаг впереди

С тест-системами COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0, и COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0

Тест-системы с двумя мишенями для определения вирусной нагрузки ВИЧ методом ПЦР в реальном времени



На правах рекламы

Выбор мишеней в двух высококонсервативных регионах генома – gag и LTR позволяет избежать занижения количественной оценки и обеспечить высочайшую чувствительность теста: от 20 копий/мл.



COBAS® TaqMan® 48



COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®



Информация предназначена для медицинских работников.

COBAS, AMPLIPREP, TAQMAN и LIFE NEEDS ANSWERS являются товарными знаками группы компаний Рош.

© ООО «Рош Диагностика Рус», 2016

cobas®

Life needs answers

Таргетное секвенирование – новый путь к диагностике наследственных заболеваний



Определение причины того или иного заболевания – это ключ к успеху в лечении пациента. Но в большинстве случаев постановка правильного диагноза – очень непростая задача. И часто случается так, что врач, чтобы докопаться до истины, тратит слишком много времени, которого у пациента просто нет.

Как быстро поставить правильный диагноз больному? Над этим вопросом ученые и врачи всего мира бьются не один десяток лет. Понимание первопричины возникновения болезни позволит далее подобрать эффективное лечение для пациента. Но что же является первопричиной, так сказать, источником заболеваний и может ли быть источник универсальным для всех болезней?

Фрэнсис Коллинз, один из руководителей проекта по расшифровке генома человека, сказал: «Нет болезней, за исключением некоторых случаев травм, которые не имели бы наследственного вклада. Я не знаю ни одного примера»¹. И действительно, разгадка причин большинства наследственных болезней, известных на сегодняшний день, кроется в нашей ДНК.

Как известно, молекула ДНК в живых организмах содержит определенные функциональные участки последовательности, которые являются основой для синтеза определенных белков. Такие участки называются генами. Ошибки, возникающие в последовательности генов, приводят к нарушению синтеза белка, что может повлечь за собой возникновение заболевания.

Такие ошибки в последовательности ДНК называются мутациями. Случайно возникшие мутации могут сделать человека инвалидом или даже не позволят ему родиться.

Изменения в последовательности ДНК разнообразны. Это могут быть простейшие замены одного основания на другое, а могут

быть более сложные перестройки, например вставки (инсерции) или потери (делеции) нескольких нуклеотидов. Но мутация мутации рознь: чаще всего они никак не влияют на фенотип, но некоторые из них оказывают сильное влияние на человека, особенно те, которые возникают в генах и непосредственно рядом с ними.

Например, известно, что делеция гена *CCR5* обеспечивает невосприимчивость людей к вирусу иммунодефицита человека (см. с. 24. *Прим. ред.*). В результате этого чума XX века – СПИД – таким людям не страшна. В Европе такая мутация относительно широко распространена и достигает в некоторых регионах 14%. В то же время в Африке она обнаружена менее чем у 0,1% жителей².

Белки задействованы в большинстве жизненно важных процессов в организме человека. Они участвуют в метаболизме, энергетических процессах, являются строительным материалом, а также выполняют регуляторную, сигнальную, транспортную и защитную функцию. Нарушение синтеза определенного белка влечет за собой сбой в работе одного или нескольких процессов, в которых участвует этот белок. В результате этого и возникает болезнь.

Как уже говорилось, наличие мутаций в генах может влиять на процесс образования молекул белка, а соответственно, может стать причиной наследственных заболеваний. Каким образом происходит поиск мутаций и как понять, есть ли в гене мутация?

Большой скачок в развитии генетики произошел в 2001 году, когда была расшифрована полная последовательность генома человека³. Геном – это совокупность всего генетического материала, который содержится в живой клетке.

Анализ человеческого генома позволил обнаружить около 30 000–40 000 генов, кодирующих белки³. Эти гены сильно отличаются

друг от друга по протяженности. Они распределены между разными хромосомами неравномерно: на одних хромосомах плотность генов можно сравнить с плотностью населения в нашей Сибири, а другие по плотности больше напоминают Европу. Средняя длина гена составляет около 27 000 пар нуклеотидов.

Также еще задолго до расшифровки генома человека было сделано удивительное открытие: последовательность генов (эукариотических организмов, в клетках которых есть ядро) прерывиста и состоит из двух типов участков, чередующихся между собой. Первые из них очень короткие (экзоны) и содержат информацию, которая впоследствии обеспечивает образование белка, а вторые – очень протяженные и не несут никаких данных о будущей белковой последовательности (интроны). Причем экзоны составляют не более 1,5% от всего генома человека⁴. Ген в среднем может состоять из 9 экзонов (размер каждого – примерно 150 пар нуклеотидов)³. На этапе синтеза белка с помощью специальных ферментов сначала формируется молекула РНК, из которой «вырезаются» интроны, а затем на основе полученной молекулы РНК синтезируется белок. Получается, что мутации, которые могут быть причинами нарушения синтеза белка, нужно искать именно в областях, кодирующих белок, т.е. в экзонах.

В большинстве случаев так оно и есть, но также известны заболевания, вызванные мутациями в некодирующей области, например в участках инициации синтеза РНК (промоторов). Так, в 2013 году у больных меланомой была обнаружена мутация в промоторной области гена обратной транскриптазы теломеразы (*TRET*)⁵. Ген *TRET* кодирует фермент, который не дает концам хромосом укорачиваться в процессе деления клетки. Обнаруженная мутация приводила к неограниченному делению клеток и, соответственно, была причиной образования опухолей. Далее дан-

ный вид мутации был обнаружен у больных не только меланомой, но и гепатоцеллюлярной карциномой (ГЦК)⁸⁻⁹.

Нарушения в некодирующей области не затрагивают структуру гена и белка, но влияют на регуляцию экспрессии данного гена и, соответственно, на количество вырабатываемого белка. Не только так называемый «неправильный» белок может повлечь за собой развитие заболевания, но также и избыток или недостаток «правильного» белка вызывает сбой в организме человека⁹.

Поэтому при исследовании развития наследственного заболевания важен анализ не только экзонных областей, но и некодирующих регионов, также принимающих участие в синтезе белка.

С момента расшифровки генома человека прошло около 15 лет. За это время была проделана грандиозная работа всем мировым научным и медицинским сообществом по анализу как целого генома, так и отдельных взятых генов. Было сформировано большое количество общедоступных баз данных (ClinVar, RefSeq, OMIM, Ensemble, GeneBank, GENCODE и др.), которые содержат информацию о последовательностях различных генов и встречающихся в них мутациях с описанием заболеваний, вызванных этими мутациями. Также стоит сказать, что еще в 1999 году был создан специальный международный консорциум для идентификации и картирования только единичных нуклеотидных замен (Single Nucleotide Polymorphisms – SNPs-сипов).

На сегодняшний день найдено около 2,2 млн сипов, большинство из которых лежат в некодирующих областях и не оказывают существенного биологического эффекта на организм. Однако примерно 33 000 сипов были обнаружены в экзонах, и многие из них влияют на наш фенотип: цвет глаз, цвет волос, этническую принадлежность и т.д. А некоторые из них ответственны за возникновение различных наследственных заболеваний¹¹.

Было показано, что у каждого человека свой уникальный набор сипов, как в кодирующей, так и в некодирующей области. Поэтому создание карты сипов может стать весьма полезным для проведения различных генетических исследований в медицине, фармакологии¹², понимании уникальности личности, роли наследственности в интеллектуальных способностях, чертах характера и т.д.

На сегодняшний день некоторые подходы с помощью детекции сипов уже используются в медицинской диагностике, а также в судебно-медицинской экспертизе¹⁰. Один из основных подходов основан на ПЦР в режиме реального времени, где ПЦР происхо-

дит в том случае, если праймер (небольшой фрагмент одноцепочечной ДНК) полностью гибридизовался с исходной молекулой ДНК. Если же хотя бы одно из оснований в праймере не соответствует исходной ДНК, то ПЦР не начнется. Также применяется так называемое генотипирование на основе ДНК-чипов¹⁰. К сожалению, с помощью этих подходов возможно определять наличие в генах только уже известных сипов.

А что делать, если пациент болен, а данные методы ничего не показывают или дело не в снипе, а, например, в инсерции или делеции? Как поступить в таком случае?

На помощь приходит полногеномное секвенирование с использованием высокопроизводительных секвенаторов второго поколения. Данный метод позволяет прочесть полный геном человека, включая как кодирующие, так и некодирующие области, и выявить все возможные типы мутаций. Но, как показала практика, даже несмотря на удешевление полногеномного секвенирования, такой метод применим только для фундаментальных научных исследований и является слишком дорогостоящим, чтобы стать рутинным методом анализа генетических заболеваний. Да и сам анализ полного генома занимает очень много времени (до нескольких месяцев) и больше напоминает поиски иголки в стоге сена.

Как уже отмечалось, большинство «важных» мутаций, вызывающих заболевания, возникает в кодирующих областях генома (в экзонах) или в некодирующих областях, находящихся рядом с экзонами, например в промоторных участках. Следовательно, было бы гораздо целесообразнее анализировать только экзоны или экзоны и близкорасположенные к ним регионы.

Именно поэтому был разработан новый подход для анализа мутаций – таргетное секвенирование, которое позволяет секвенировать только определенные участки ДНК. Каким образом можно секвенировать не весь геном, а только нужные гены или даже экзоны?

Так как геном человека известен и мы точно знаем всю его последовательность, то мы можем воспроизвести отдельные небольшие участки генома, т.е. искусственно синтезировать фрагменты ДНК, как и любые другие органические вещества. Эти небольшие молекулы ДНК длиной 50-100 нуклеотидов называются зондами.

Для того чтобы секвенировать интересные регионы (экзоны), необходимо исходную молекулу ДНК «порезать» на более короткие фрагменты (от 100 до 1000 п.н.). После этого мы смешиваем синтезированные зон-



*Мышь, вяжущая нить ДНК, – памятник перед зданием ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск (Академгородок)
© Пресс-служба Президиума СО РАН
(<http://www.sbras.ru/>)*

ды, комплементарные интересующим участкам генома, и набор фрагментов исходной ДНК человека. При определенных условиях зонды связываются с идентичными участками в исходной ДНК по принципу комплементарности, другими словами, гибридизуются с комплементарными регионами.

Теперь остается только отобрать зонды вместе со связавшимися фрагментами ДНК. Для этого на конец молекулы зонда прикрепляют биотин. В чем уникальность этого вещества? Биотин образует очень прочную связь с белком стрептавидином, причем один стрептавидин может связать четыре молекулы биотина.

Стрептавидин обычно прикрепляют к магнитным частицам. Добавив водную суспензию таких стрептавидиновых шариков к смеси зондов, меченных биотином, и фрагментов ДНК, можно быстро и просто отсортировать зонды со связанными фрагментами ДНК от неспецифических фрагментов. Вся конструкция, состоящая из фрагмента ДНК, зонда и биотина на конце, связывается с магнитными частицами. Далее пробирку с этой смесью помещают на магнитный штатив таким образом, что магнитные частицы вместе с зондами и специфичными фрагментами ДНК притягиваются к одной из стенок пробирки, а оставшиеся «ненужные» фрагменты ДНК остаются в растворе. Так как относительно всего генома процент отобранных фрагментов ДНК мал и их количества обычно недостаточно для последующего секвенирования, то после отбора количество фрагментов ДНК увеличивают с помощью ПЦР.

Эта универсальная технология может быть использована с любым высокопроизводительным секвенатором. При этом при

применении подхода таргетного секвенирования существенно снижается стоимость анализа одного образца за счет того, что за один запуск прибора можно вместо генома одного пациента «прочитать», например, онкогены десятков пациентов. Более того, анализ таргетных областей гораздо проще, чем анализ целого генома. Нет необходимости искать и извлекать из большого массива полученных данных специфические участки ДНК; все интересующие регионы и мутации в них видны как на ладони.

Изначально таргетное секвенирование, представленное в России компанией «Рош Диагностика Рус» в 2010 году, было направлено на фундаментальные научные исследования, но со временем портфолио расширилось и появилась возможность применять данную технологию как для медицинских исследований, так и для рутинной диагностики.

В каких же медицинских и научных областях можно использовать таргетное секвенирование? Одной из самых популярных областей, где нашло свое применение таргетное секвенирование, – это онкология. До 5% всех онкологических заболеваний составляют наследственные формы рака. На сегодняшний день известны сотни генов, мутации в которых могут вызвать развитие онкологического заболевания. Для каждого конкретного вида рака характерен свой набор мутаций в определенных генах. При этом есть случаи, когда возникновение опухоли вызвано нарушением работы не одного, а нескольких генов. В России многие научные центры используют технологию таргетного секвенирования для анализа онкологических наследственных заболеваний. Так, сотрудники лаборатории клинической онкогенетики Научного центра имени Н.Н. Блохина РАМН осуществляют

широкомасштабный скрининг пациентов, страдающих раком молочной железы, колоректальным раком и раком желудка.

Помимо этого, сотрудники отдела и кабинета лабораторной генетики ФГБУ «ГНЦ колопроктологии» Минздрава России занимаются диагностикой и исследованием одного из часто встречающихся видов рака толстой кишки – синдрома Линча. Частота возникновения синдрома Линча составляет один на 500–1000 новорожденных среди европейцев¹³. Сегодня известно не менее семи генов, мутации в которых могут привести к развитию этого заболевания.

Используя технологию таргетного секвенирования, сотрудники института создали панель, включающую около десятка генов, анализ последовательности которых позволил найти мутации у нескольких пациентов. Стоит отметить, что дальнейшая работа позволила выявить аналогичные мутации у части кровных родственников этих пациентов.

Также таргетное секвенирование нашло свое применение и в кардиологии. Сотрудники лаборатории медицинской генетики Российского кардиологического научно-производственного комплекса с помощью данного подхода занимаются выявлением мутаций, вызывающих гиперлипидемию. Гиперлипидемия – заболевание, связанное с аномально повышенным уровнем липидов и липопротеинов в крови человека, является одним из симптомов развития сердечно-сосудистых заболеваний. Мутации примерно в десятке генов могут вызвать различные типы гиперлипидемии: первичную гиперлипидотемию, семейную гиперхолестеринемию или комбинированную гиперлипидемию.

Помимо холестерина-ассоциированных болезней с помощью таргетного секвениро-

вания в этой лаборатории исследуют легочную артериальную гипертензию, обусловленную мутациями в гене *BMPR2*.

В Научном центре здоровья детей, в лаборатории молекулярной генетики и клеточной биологии, работают с таргетными панелями, куда включены зонды, комплементарные широкому спектру генов, мутации в которых вызывают детские наследственные заболевания соединительной ткани, лизосомные болезни накопления, аминокислотопатии, органические ацидурии, муковисцидоз, такие нефрологические болезни, как стероид-резистентный нефротический синдром, атипичный гемолитико-уремический синдром и синдром Альпора. Также успешно разрабатываются и внедряются в практику методы диагностики редких моногенных заболеваний. Это только небольшая часть примеров успешного использования технологии таргетного секвенирования в исследовании и диагностике наследственных заболеваний. На сегодняшний день данный подход нашел применение в крупных научных центрах Москвы, Санкт-Петербурга и Казани.

В ближайшем будущем таргетное секвенирование позволит не только обнаруживать мутации у пациентов с известным диагнозом, но и выявлять предрасположенность к тому или иному заболеванию до того, как появились симптомы. Это позволит человеку быть «во всеоружии» и начинать борьбу с заболеванием на начальной стадии его развития или вообще предотвратить его возникновение!

Автор статьи:

И.Ю. Карпова

Специалист по обучению клиентов
ООО «Рош Диагностика Рус»

Литература

1. Тарантул В.З. Геном человека: Энциклопедия, написанная четырьмя буквами. М., 2003.
2. Pardi S. Sabeti, Emily Walsh, Steve F. Schaffner, Patrick Varilly, et. al. The case for selection at CCR5-Delta32 // *PLoS Biology*. 2005. Vol. 3, № 11. P. e378.
3. Venter J.C., et al. The Sequence of Human Genome // *Science*. 2001. Vol. 291. № 5507. P. 1304–1351.
4. Газарян К. Г., Тарантул В.З. Геном эукариот. М.: МГУ, 1983.
5. Horn S., et al. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma // *Science*. 2013; 339: 959–961.
6. Totoki Y., et al. Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes // *Nat Genet*. 2014; 46: 1267–1273.
7. Melton C., et al. Recurrent somatic mutations in regulatory regions of human cancer genomes // *Nat Genet*. 2015; 47: 710–716.
8. Weinhold N., et al. Genome-wide analysis of noncoding regulatory mutations in cancer // *Nat Genet*. 2014; 46: 1160–1165.
9. Mansour M.R., et al. Oncogene regulation. An oncogenic super-enhancer formed through somatic mutation of a noncoding intergenic element // *Science*. 2014; 346: 1373–1377.
10. Sobrino B., et al. SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies // *Forensic Sci Int*, 2005; 154(2–3): 181–194.
11. Singh, et al. SNP-SNP interactions within APOE gene influence plasma lipids in postmenopausal osteoporosis // *Rheumatology International*. 2010; 31 (3): 421–423.
12. Faree M., et al. Single nucleotide polymorphism in genome-wide association of human population: A tool for broad spectrum service // *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 2013; 14: 123–134.
13. Rahner N., Steinke V., Schlegelberger B., Olschwang S., Eisinger F, Hutter P. Clinical utility gene card for: Lynch syndrome (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) // *Eur. J. Hum. Genet*. 2010. Vol. 18. P. 232.

Ответ иммунной системы пациента на злокачественное новообразование: диагностика и перспективы специализированной терапии



Почему иммунитет человека не может предотвратить появление злокачественной опухоли в организме или «перебороть» злокачественные клетки уже после их появления, остается одной из загадок онкологии наряду с такими вопросами, как: «Как в организме появляется злокачественная клетка (клетки)?», «Что нужно делать, чтобы не заболеть раком?» и т.п. По статистическим наблюдениям известно, что некоторые виды онкологических болезней сопутствуют иммунодефициту человека (в том числе ассоциированному с ВИЧ-заболеванием), например саркома Капоши. Однако каковы механизмы взаимодействия опухолевой ткани и клеток иммунитета человека, почему иммунитет не может справиться с чужеродной тканью (опухолевая клетка хоть и является «потомком» клеток организма больного, но имеет измененную, чужую ДНК), что нужно сделать, чтобы заставить иммунитет активно атаковать опухоль и помочь выздоровлению пациента? Все эти вопросы до недавних пор оставались без определенного ответа, но активно изучались учеными-биологами ведущих научно-исследовательских институтов.

К первым опубликованным исследованиям на эту тему можно отнести статью 2003 года¹ о связи присутствия инфильтрирующих опухоль Т-лимфоцитов (клетки, непосредственно предназначенные для распознавания и уничтожения чужеродных антигенов) и прогноза течения онкологической болезни. По результатам исследования оказалось, что наличие инфильтрации опухолевой ткани Т-лимфоцитами является фактором благо-

приятного прогноза при распространенном раке яичников. То есть присутствие клеток местного иммунитета влияет на течение заболевания и, более того, каким-то образом помогает организму (и врачам-онкологам, конечно) справиться с тяжелой болезнью.

Статья, опубликованная в 2006 году², демонстрировала связь типа, плотности и локализации инфильтрирующих опухоль клеток адаптивного иммунитета и прогноза течения заболевания рака прямой кишки. По результатам исследования оказалось, что эта связь не только очевидна, но и позволяет в некоторых случаях прогнозировать развитие заболевания лучше, чем традиционная классификация стадий онкологической болезни, основанная на принятых в то время морфологических критериях. Таким образом, получалось, что факторы адаптивного иммунитета не только играют какую-то роль при онкологическом заболевании, но и способны преодолеть действие факторов, при прочих равных негативно влияющих на течение болезни, ухудшающих состояние больного.

Однако указанные и другие относящиеся к этому вопросу публикации не раскрывали причин и механизмов воздействия иммунных клеток на опухолевые, а также способов задействовать эти механизмы для терапии онкологических пациентов.

В ходе дальнейших научных исследований один из механизмов взаимодействия адаптивного иммунитета и опухолевых клеток был раскрыт! Более того, ученые смогли достигнуть понимания, как опухолевая клетка блокирует находящийся рядом Т-лимфоцит, специально отправленный иммунной системой для поиска и уничтожения этой самой опухолевой клетки. Оказалось, что на поверхности Т-лимфоцитов есть специальный рецептор PD1, воздействуя на который можно «отозвать» клетку-убийцу (в случае наличия опухоли – клетку-спасителя) с «выполнения своего задания». Этот механизм в здоровом организме служит для регулирования иммунной толерантности, то есть для начального «обучения» иммунных клеток тому, как нужно распознавать свои и чужие клетки, а также для регулирования периферических проявлений иммунного ответа с тем, чтобы не допустить повреждения здоровых клеток «разбушевавшимися» Т-лимфоцитами³.

Белок, который воздействует на рецептор PD1 на поверхности Т-лимфоцитов с целью их деактивации, называется PD-L1. Он вырабатывается клетками врожденного иммунитета и другими нормальными клетками организма именно для «обучения» клеток-убийц и защиты от них тогда, когда их активность может угрожать нормальным клеткам (как это происходит при аутоиммунных заболеваниях). Присоединяясь к рецептору PD1, белок PD-L1 «выключает» Т-лимфоцит. Клетки опухоли успешно используют тот же механизм, вырабатывая белок PD-L1, чтобы защититься от Т-лимфоцитов. Деактивация Т-лимфоцитов лишает иммунную систему возможности препятствовать жизнедеятельности и росту опухоли в организме пациента. Поэтому в данном случае для того, чтобы «включить» иммунитет в борьбу с опухолью, нужно разрушить связь PD1 и PD-L1, не допустив их присоединения. И такой способ был найден!

Препарат группы компаний Рош под рабочим названием MPDL3280A (анти-PD-L1) взаимодействует с белком PD-L1, не допуская (предотвращая) его связывание с рецептором PD-L1 и рецептором B7.1 (еще один белок, участвующий в активации и коингибировании иммунных реакций). В настоящее время проводятся клинические исследования данного препарата для выявления побочных эффектов, подтверждения эффекта терапевтического, выяснения оптимальной дозировки и так далее. В связи с важностью и неотложной потребностью в такого рода терапии регуляторный орган американской системы здравоохранения FDA (Food and Drug Administration – Управление по контролю за продуктами и лекарствами) придал двум исследованиям с использованием препарата MPDL3280A приоритетный для рассмотрения статус (Priority Review):

- исследование терапии пациентов с местнораспространенным или метастатическим немелкоклеточным раком легкого,
- исследование терапии пациентов с местнораспространенным или метастатическим уротелиальным раком мочевого пузыря.

В исследованиях препарат продемонстрировал, что его применение позволяет пациентам с раком легкого прожить на 7,7 ме-

сяца дольше по сравнению с пациентами, принимающими только стандартные химиотерапевтические препараты⁴. В исследованиях у пациентов, заболевание которых начало прогрессировать на фоне применения стандартных химиопрепаратов, использование MPDL3280A позволяло остановить рост опухоли и даже уменьшить ее размер (!) в 27% случаев. Данные исследования были опубликованы 27 сентября 2015 года. На момент публикации результатов медиана выживаемости пациентов последнего исследования не была достигнута, что позволяет надеяться на непривычно большой выигрыш в длительности жизни таких пациентов. В исследовании применения препарата для терапии рака мочевого пузыря были также достигнуты впечатляющие показатели статистики общей выживаемости (при том, что до этого указанная группа пациентов уже прошла через неоднократные, очень интенсивные курсы травмирующей химиотерапии), а медиана длительности ответа на терапию также не была достигнута.

Необходимо вспомнить, что согласно статьям 2003 и 2006 годов, указанным выше, проникновение Т-клеток в опухоль происходит не во всех случаях онкологической болезни. А если Т-лимфоциты не проникают в ткань опухоли, то опухолевыми клеткам не нужно использовать механизм их блокирования PD-L1; для защиты от иммунной системы в этих случаях опухоль использует какие-то другие механизмы. Следуя этой логике, можно сделать вывод, что механизм подавления активности Т-лимфоцитов также используется опухолевыми

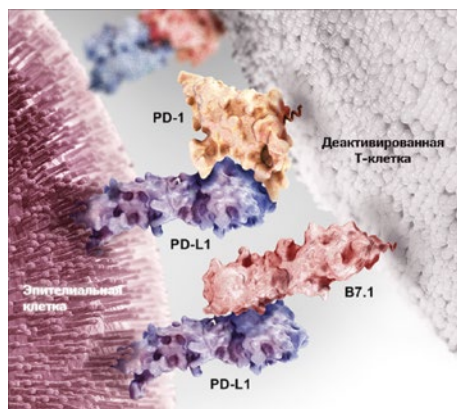


Рисунок 1. Нормальный механизм взаимодействия эпителиальной клетки и Т-лимфоцита. Т-клетка получает сигнал через белок PD-L1 от нормальной клетки и деактивируется

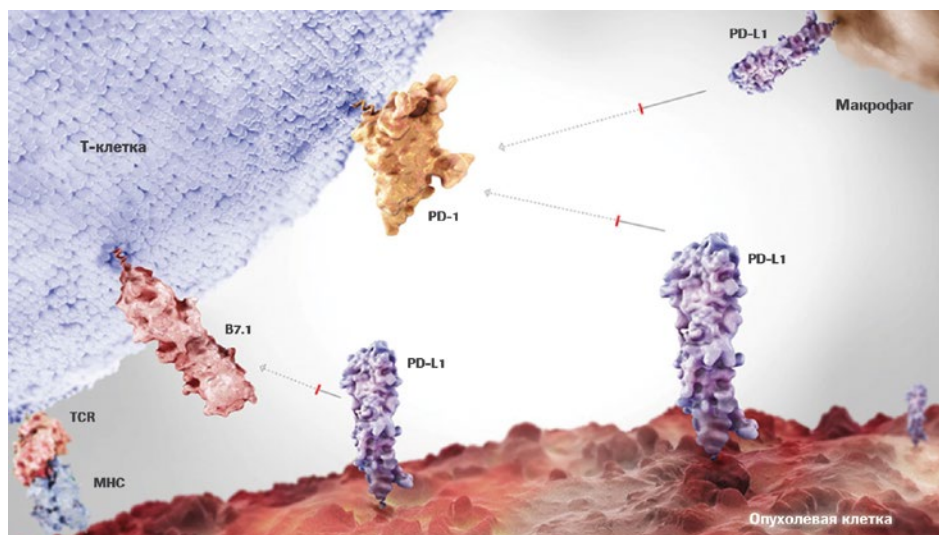


Рисунок 2. Механизм взаимодействия опухолевой клетки и Т-лимфоцита. Раковая клетка производит белок PD-L1 для того, чтобы деактивировать Т-клетку. Сигнал белка PD-L1 можно блокировать, и Т-клетка уничтожит клетку опухоли

ми клетками не во всех случаях, а это значит, что препарат, блокирующий этот механизм, будет полезен не каждому онкологическому больному. Как же узнать, кому поможет таргетный (нацеленный на специфическую «мишень» патологического процесса) препарат, а кому нет? На помощь приходит концепция персонализированной медицины, являющаяся официальной стратегией группы компаний Рош, и ее неотъемлемый инструмент – диагностический тест. В подразделении «Диагностика» группы компаний Рош идет разработка тестов, способных определять наличие белка PD-L1, экспрессируемого (вырабатываемого) тканями злокачественных опухолей. Компания Ventana, входящая в группу компаний Рош, разрабатывает сразу два теста: тест PD-L1 (SP 263) уже выпущен в Европейском союзе под маркировкой «Для *in vitro*-диагностики», тест PD-L1 (SP142) готовится к выпуску и доступен в настоящее время под маркировкой «Только для научных исследований» (доступен в том числе и в России!).

Таким образом, препарат и тесты группы компаний Рош, проходящие в настоящий момент клинические исследования, в том числе и совместные, в ближайшее время станут доступны национальным системам здравоохранения и онкологическим пациентам во всем мире. И данные первых исследований позволяют надеяться, что серьезный выигрыш в продолжительности жизни больных (измеря-

ющийся годами) будет достигнут вследствие применения иммунотерапевтических средств в онкологической практике, по результатам необходимой для обеспечения такого эффекта современной диагностики.

А что касается дальнейшего изучения свойств иммунитета, то эта работа продолжается и обязательно будет продолжаться, потому что изученный механизм PD-L1 – это только один из элементов работы могучих защитных сил человеческого организма. Самые смелые исследователи и популяризаторы медицинской науки предсказывают, что стандартная сейчас цитотоксическая химиотерапия, травмирующая организм в результате своего лечебного действия, через 10–15 лет вообще не будет применяться для лечения большинства онкологических болезней, а рак перестанет быть смертельно опасной болезнью. Что ж, очень хочется верить, что так и будет!

Автор статьи:

А.Е. Горьков

Менеджер направления

«Иммуногистохимия и морфология»

ООО «Рош Диагностика Рус»

Автор выражает особую благодарность врачу-патологоанатому МГОБ № 62 (Москва)

Никите Александровичу Савелову за помощь в подготовке статьи.

Литература

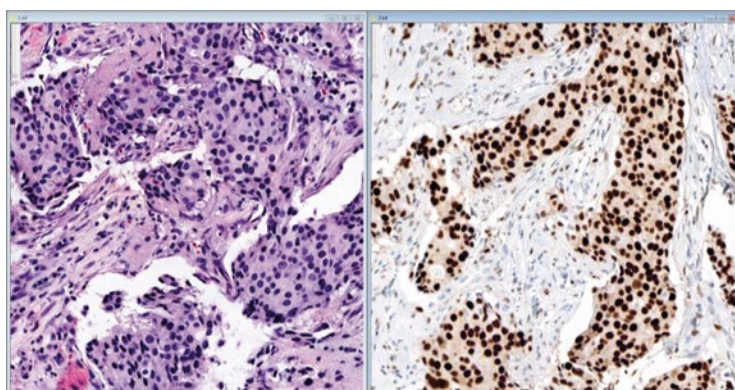
1. Zhang L et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med*. 16 Jan, 2003; 348(3): 203–213.
2. Galon J et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 29 Sep, 2006; 313(5795): 1960–1964.
3. Roy S. Herbst et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature*. 27 November, 2014; 515: 563–567.
4. <http://www.roche.com/media/store/releases/med-cor-2015-09-27.htm>
5. <http://www.roche.com/investors/updates/inv-update-2016-01-08.htm>

Сканер стекол гистологический VENTANA iScan HT



На правах рекламы

- Высокопроизводительный (до 360 стекол в одновременной загрузке)
- Простой в работе и обслуживании
- Высокая скорость сканирования препаратов
- Встроенные алгоритмы анализа ИГХ окрасок для Ki67, Er, Pr, Her2



VENTANA, VENTANA ISCAN HT и логотип VENTANA являются товарными знаками группы компаний Рош.

© ООО «Рош Диагностика Рус», 2016

Информация предназначена для медицинских работников.

cobas b 123

Потому что это работает, как ничто другое

Современный картриджный анализатор критических состояний для измерения:

- газов крови (pH, pCO₂, pO₂) и Hct
- электролитов (Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Cl⁻)
- оксиметрических параметров: tHb, SO₂, O₂Hb, HHb, COHb, MetHb, nBili
- глюкозы
- лактата



На правах рекламы

Основные преимущества:

- Минимальное количество расходных материалов: все реагенты и калибровочные растворы в едином контейнере
- Простой и удобный в управлении: видеоподсказки на экране, интуитивно понятное меню
- Быстрый, практичный и комфортный в работе: цветной сенсорный экран обеспечивает полный обзор состояния анализатора с одного взгляда, результаты анализа выводятся на экран менее чем через две минуты после введения образца
- Трехуровневая система защиты от сгустков, образующихся в образце крови
- Легко адаптируется к Вашим потребностям за счет гибкой конфигурации: модуль оксиметрии и модуль автоматического контроля качества
- Мобильность: мобильная тележка (опция), UPS (опция) и Wi-Fi (опция)
- Полный удаленный контроль и управление: подключение к внешней информационной системе управления ИМЛ-данными*

* ИМЛ равнозначно POC (Point-of-Care).

ПРЕДНАЗНАЧЕНО ТОЛЬКО ДЛЯ МЕДИЦИНСКИХ РАБОТНИКОВ



COBAS, COBAS B и LIFE NEEDS ANSWERS являются
товарными знаками группы компаний Рош.
© ООО «Рош Диагностика Рус», 2016

cobas[®]

Life needs answers

DIA1350