

Diagnostica в диалоге

**Пять вопросов об интерференции
биотина в иммунном анализе**

**Тесты Рош - высокое качество
и стандартизация**

**Внешний контроль качества
иммуногистохимических
исследований в России**

Уважаемые читатели!

В этом выпуске журнала мы решили раскрыть вам одну из безусловных ценностей компании Рош и поговорить о различных аспектах качества. А что для вас качество лабораторной услуги?

Само понятие лабораторная услуга очень широко и включает в себя все этапы от информирования пациента и правильной его подготовки к сдаче биоматериала до получения результата анализа пациентом и врачом. А между этими событиями лежат преаналитический, аналитический и информационные этапы обработки и передачи полученных данных. Но есть еще широкий спектр процессов взаимодействия поставщика медицинских изделий и лаборатории, которые так же непосредственно влияют на качество полученного результата анализа. Именно эти аспекты, в которых мы выступаем вашим партнером освещены в выпуске. С самого первого этапа совместной работы поставщика и лаборатории, мы поговорим о безопасности обращения медицинских изделий и нашем взгляде на обеспечение качества данного процесса. Обратимся к основам обеспечения качества и стандартизации аналитического этапа за счет инновационного подхода, использованного в иммунохимиче-

ских анализаторах Рош – электрохемилюменисценции. Но не только технологический инновации позволяют обеспечивать качество ведения пациента, в этом выпуске мы расскажем о клинически значимых тестах на Тропонин Т и Кальцитонин, применение результатов которых клиницистом несет высокую диагностическую ценность. В этом выпуске мы коснулись важной в контексте качества темы – интерференции и рассмотрели ее как с биологической стороны, осветив интерференцию атипичных форм гемоглобина в диагностике сахарного диабета, так и различные типы интерференции, связанные с преаналитическими этапами подготовки пациента к сдаче анализа и с аналитическими этапами проведения исследования. И, конечно, остановились на вопросе внешнего контроля качества – в этот раз иммуногистохимических исследований. Еще один аспект, который мы считаем важным в рамках партнерства с лабораторией – своевременное и полное информирование о наших продуктах, обновлениях и подходах в работе, с целью обеспечения которого мы проводим регулярные вебинары для наших пользователей. Программу вебинаров на 2019 год вы найдете в этом номере.

На сегодняшний день всего 2% расходов здравоохранения расходуется на диагностику *in vitro*. В то время, как результаты анализов *in vitro* влияют на 70% клинических решений. Таким образом, качество ведения пациента напрямую связано с качеством лабораторной услуги. Именно по этой причине компания Рош видит своей целью обеспечение качества продуктов и процессов в рамках нашего партнерства.



С уважением,
Надежда Коробан,
Руководитель по маркетингу
централизованной диагностики
ООО «Рош Диагностика Рус»

Содержание

Организация лаборатории

Внешний контроль качества иммуногистохимических исследований в России. Первые результаты	6
Обеспечение безопасности обращения медицинских изделий на уровне взаимодействия между поставщиком и пользователем/клиентом	9

Актуальные вопросы диагностики

Пять вопросов об интерференции биотина в иммунном анализе.	12
Спасти от послеоперационного инфаркта	15

Медицина и наука

Проблема интерференции атипичных форм гемоглобина в диагностике и мониторинге сахарного диабета	18
Кальцитонин в диагностике медулярного С-клеточного рака щитовидной железы	22
Тесты Рош - высокое качество и стандартизация.	27

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

Учредитель: ООО «Рош Диагностика Рус»

Редакционная коллегия: Тихонова О.Ю., Ершов П.В., Дыхал Ю.И., Берестовская В.С., Путляев Е.В.

Выпуск № 9, 25.03.2019

Тираж: 700 экз.

Объем: 32 полосы

Периодичность: 2 раза в год

Бесплатно

Адрес редакции и издателя: ООО «Рош Диагностика Рус»

115114, г. 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

Внешний контроль качества иммуногистохимических исследований в России. Первые результаты

Метод иммуногистохимической (ИГХ) диагностики тканей широко распространен в клинической практике и многие лаборатории уже считают его рутинным. Применение этого метода помогает специалисту-патоморфологу провести дифференциальную диагностику опухоли, определить чувствительность/резистентность опухоли к таргетной и химиотерапии, а также прогнозировать течение заболевания [1].

ИГХ метод представляет собой тест с высокой степенью сложности, состоящий из множества шагов в преаналитическом, аналитическом и постаналитическом этапах (таблица 1). Ошибки на любом из этих этапов могут привести к невоспроизводимым, ненадежным, а так же ложноположительным или ложноотрицательным результатам, что впоследствии может привести к неверному выбору тактики ведения пациента [2].

Таблица №1

Этапы иммуногистохимического анализа

Преаналитический этап	
Фиксация	
Декальцинация	
Проводка	
Монтирование образца на стекло	
Аналитический этап	
Выбор антитела	
Подбор и оптимизация протокола	
Окрашивание в приборе или вручную	
Постаналитический этап	
Положительный и отрицательный контроль	
Интерпретация	
Телепатология	
Заклучение	

Существуют рекомендации и публикации по стандартизации гистологических и иммуногистохимических исследований. Но в то же время остаются открытые вопросы, представляющие сложности для индивидуальных лабораторий, например, в выборе подходящего антитела и протокола его применения в ИГХ. Для каждого антитела существует целый ряд параметров, влияющих на чувствительность и специфичность его реакции с антигеном. Даже несмотря на тщательно про-

веденную калибровку метода и систему внутреннего контроля качества остаются вопросы: соответствуют ли результаты должному уровню качества и сопоставимы ли с результатами, полученными в других лабораториях [3]?

Внешний контроль качества ИГХ в первую очередь направлен на получение аналитического результата за счет комплексного анализа результатов окрашивания контрольных тканей в разных лабораториях группой квалифицированных патологоанатомов.

Основным преимуществом наличия Внешнего контроля качества (ВКК) является возможность обнаружить различия в качестве окрашивания между разными лабораториями и отнести их к качеству антител, параметрам протокола и платформам окрашивания, чтобы определить, какие элементы могут положительно или негативно сказываться на результатах окрашивания. Таким образом, по результатам ВКК можно дать рекомендации о том, как достичь лучшего качества ИГХ.

На сегодняшний день система внешнего контроля качества успешно применяется во многих странах:

- в Великобритании – UKNeqas ICC & ISH, United Kingdom National External Quality Assessment Service (www.ukneqas.org.uk),
- во Франции – AFAQAP, Association Francaise d'Assurance Qualite en Anatomie et Cytologie Pathologiques (<http://www.afaqap.org>),
- в Испании – CEAP-GCP, «Sociedad Española de Anatomia Patologica - Garantía de Calidad en Patología» (<http://www.seap.es>),
- в США – CAP, College of American Pathologists (www.cap.org),
- в Канаде – CIQC, Canadian Immunohistochemistry Quality Control (www.ciqc.ca),
- в Германии – Ringversuch, Deutsche Gesellschaft für Pathologie Ringversuch (www.ringversuch.de),
- в Северной Европе – NordiQC, Nordic Immunohistochemical Quality Control (www.nordiqc.org).

Благодаря результатам деятельности этих систем было выявлено, что около 29% процентов лабораторий получают результаты реакции неудовлетворительного качества [4], что с высокой вероятностью

может повлиять на постановку диагноза для большого количества пациентов.

При попытках прохождения процедуры внешнего контроля качества в любой из представленных выше организаций для отечественной лаборатории представляет ряд трудностей, связанных с законодательно прописанными правилами пересылки биоматериалов через границу России [5]. В 2010 году в целях контроля качества ИГХ исследований маркера Her-2 в препаратах опухолей молочной железы, собранных на территории России, была создана система референсных лабораторий под патронажем Российского общества патологоанатомов. Центральная референсная лаборатория и организационно-методический центр располагались на базе кафедры патологической анатомии РМАНПО. Особенностью системы референсных лабораторий является отсутствие национальной централизации, так как контроль качества проходит независимо в нескольких референсных лабораториях, сформированных по территориальному признаку [6]. По этой причине было принято решение организовать Национальный внешний контроль качества на базе кафедры патологической анатомии РМАНПО при поддержке Министерства здравоохранения России. В 2017 году было проведено 2 пилотных раунда для адаптации модели организации, заимствованной у NordiQC. В апреле 2018 года был проведен официальный старт программы Внешнего Контроля Качества иммуногистохимических исследований. Министерство здравоохранения РФ поддержало данную инициативу и 19 апреля 2018 года было выпущено письмо №17-2/2809 с рекомендациями к участию для учреждений, занимающихся ИГХ-исследованиями. Также 26 июня 2018 на ученом Совете РМАНПО по рекомендации МЗ РФ было принято решение о создании Центра контроля качества иммуногистохимических исследований в структуре РМАНПО.

Участие в программе являлось добровольным и конфиденциальным, а порядок участия выглядел следующим образом:

1. Лаборатория подает заявку на участие вместе с информацией о протоколе,

по которому будет проведено окрашивание образца.

2. Все зарегистрированные участники получают по 2 стекла с контрольным материалом, подготовленным по стандартным процедурам

3. Лаборатория производит окрашивание согласно протоколу, указанному в заявке.

4. После анализа результатов окрашивания одно стекло на выбор лаборатории необходимо отправить обратно в организацию контроля качества.

5. Совет экспертов оценивает обезличенные результаты окрашивания каждого стекла.

6. Лаборатория получает конфиденциальные результаты оценки экспертов и рекомендации по повышению качества окрашивания, если таковые имеются.

7. На сайте системы внешнего контроля качества (<http://sisvkk.ru/>) объявляются общие статистические результаты раунда оценки качества и рекомендации по адаптации протоколов к антителам, участвующим в раунде.

При подготовке материала для участников используются мультиблоки (тканевые матрицы) с набором различных тканей для каждого антитела. Из каждого блока, созданного под соответствующий маркер, подготавливается по 15 срезов на стекла Super Frost Plus и предварительно тестируют на автоматических и полуавтоматических иммуногистостейнерах.

Система оценки качества окрашивания препарата так же была позаимствована у NordiQC (таблица 2). Согласно протоколу, консилиум экспертов очно оценивает и присуждает каждому препарату одну из четырех оценок на основе общего решения. Оцениваются следующие параметры: интенсивность окрашивания в клетках, в которых ожидается окрашивание, отношение сигнал-фон, фоновое окрашивание,

отклонения в окрашивании от стандарта, контрокрашивание и сохранность морфологической структуры.

Первый раунд работы системы Внешнего Контроля Качества, начавшийся 18 апреля 2018 г., был посвящен антителам к маркерам Her2 и Eг, являющимся обязательными в панели для рака молочной железы[7]. В качестве экспертов были приглашены как сотрудники кафедры РМАНПО, так и ведущие сотрудники патологоанатомических отделений крупных российских онкологических лечебных организаций. Полный список экспертов опубликован на сайте системы внешнего контроля качества: <http://sisvkk.ru/>.

Из 29 лабораторий, отправивших заявку на участие, 27 лабораторий вернули окрашенные препараты. По результатам заседания экспертов в данном раунде по контролю маркера Eг лаборатории-участники получили следующие результаты:

Маркер Eг	
Оптимально n (%)	10 (37%)
Хорошо n (%)	10 (37%)
Погранично n (%)	5 (19%)
Плохо n (%)	2 (7%)

Комментарии и рекомендации по изменению протоколов получили лаборатории, получившие оценку «погранично» или «плохо» (26% от общего числа участников исследования). В качестве основного источника неудовлетворительного окрашивания эксперты указали процедуру демаскировки, избыточную либо по времени, либо по температуре.

У лабораторий, использующих в своей работе иммуногистостейнер Leica Bond Max, было отмечено использование буфера с низким pH в 15% случаев, что приводило к снижению качества окрашивания. Лаборатории, использующие Ventana Benchmark XT, столкнулись с проблемой

избыточного окрашивания гематоксилином в 11%, что затрудняло оценку участков, имеющих слабое специфическое окрашивание.

На рисунках 1 и 2 приведены примеры оптимального и неудовлетворительного окрашивания контрольных материалов по маркеру Eг.

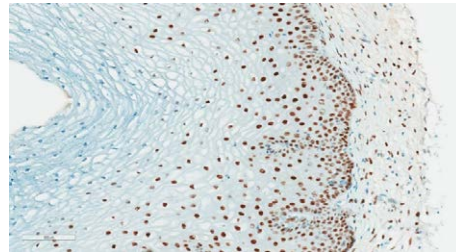


Рис 1а. Оптимальное окрашивание препарата ткани шейки матки.

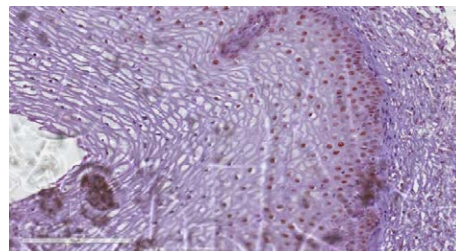


Рис 1б. Неудовлетворительное окрашивание препарата ткани шейки матки: ядра эпителиальных клеток имеют степень окрашивания от слабого до умеренного, клетки стромы имеют слабое окрашивание. Избыточное окрашивание гематоксилином. Заключение полистиролом затрудняет диагностику.

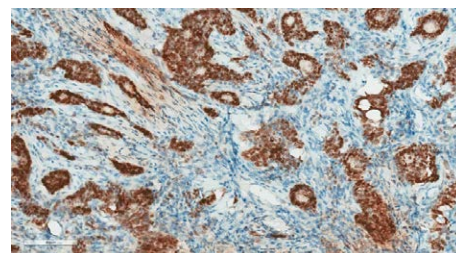


Рис 2а. Оптимальное окрашивание образца №1. Более 90% опухолевых клеток имеют степень окрашивания от умеренной до сильной. (7-8 баллов по шкале Allred Score)

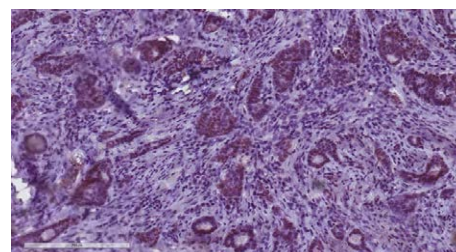


Рис 2б. Неудовлетворительное окрашивание. Тот же образец ткани. Наблюдается слабое окрашивание не более 30% опухолевых клеток. Избыточное окрашивание гематоксилином.

Таблица №2. Оценка препарата

Оценка	Критерий
Оптимально	Полностью соответствует заданным в мире стандартам «идеального» окрашивания.
Хорошо	Результат считается полностью приемлемым. Существуют незначительные погрешности, не влекущие за собой ошибочной трактовки реакции. Протокол может быть оптимизирован с достижением лучшей интенсивности окрашивания и отношения сигнал-фон.
Погранично	Результат считается неудовлетворительным. Слишком слабое окрашивание или ложноотрицательное окрашивание одной из присутствующих на стекле тканей, или слабая ложноположительная реакция.
Плохо	Результат считается неприемлемым. Ложноотрицательное окрашивание нескольких тканей из присутствующих на стекле или большинство ложноположительных реакций.

При оценке препаратов, окрашенных антителом к Her2, были получены следующие результаты:

Маркер Her2	
Оптимально п (%)	10 (40%)
Хорошо п (%)	10 (40%)
Погранично п (%)	3 (12%)
Плохо п (%)	2 (8%)

Комментарии и рекомендации по внесению изменений в протоколы получили 5 лабораторий (20% от всех участвовавших в исследовании). При этом анализ итогов исследования показал, что самыми распространенными причинами неудовлетворительных результатов оказались неоптимальные условия демаскировки и инкубации первичных антител.

На рисунках 3 и 4 приведены примеры оптимального и неудовлетворительного окрашивания контрольных материалов по маркеру Her2.

По завершении раунда все участники получили индивидуальные конфиденциальные заключения для каждой лаборатории с комментариями и рекомендациями по повышению качества и общий отчет по раунду, доступный всем желающим на сайте контроля качества.

Следующий раунд пройдет в III-IV квартале 2018 и будет посвящен марке-

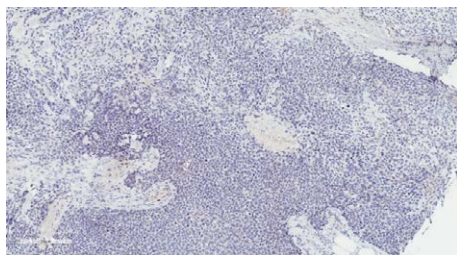


Рис. 3а. Оптимальное окрашивание образца №1. Полное отсутствие окрашивания опухолевых клеток.

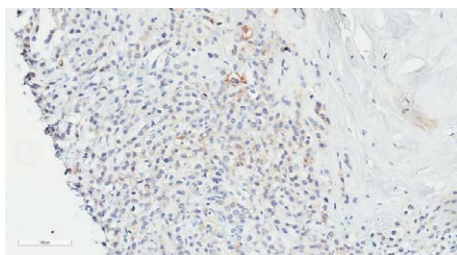


Рис. 4 а. Оптимальное окрашивание образца №4. Слабое окрашивание мембран чуть больше, чем у 10% опухолевых клеток (1+).

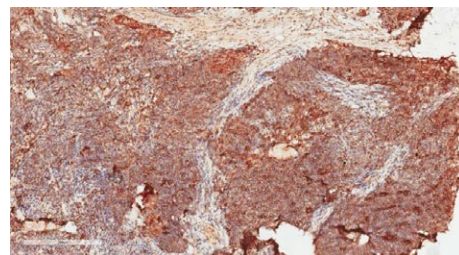


Рис. 3б. Неудовлетворительное окрашивание образца №1. Фоновое окрашивание цитоплазмы имитирует положительный HER2-статус опухоли.

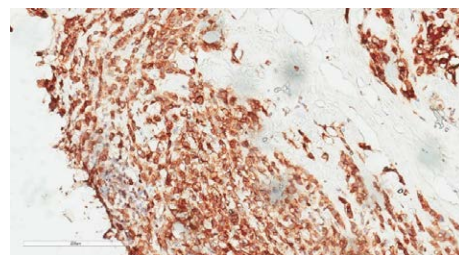


Рис. 4 б. Неудовлетворительное окрашивание образца №4. Высокая концентрация первичных антител привела к полному окрашиванию мембран более чем у 10% опухолевых клеток (3+).

рам, используемым в диагностике рака легкого: CK7, CK5/6, TTF1.

Кроме оценки качества окрашивания организаторы предлагают также второй тип раунда – по интерпретации оцифрованных изображений. Первый такой раунд по интерпретации результатов окрашивания PD-L1 пройдет в III квартале 2018 года.

Автор статьи:

Екатерина Щепелина

Специалист по работе с ключевыми клиентами

Лариса Эдуардовна Завалишина

Доктор биологических наук, профессор кафедры патологической анатомии РМАНПО

Система внешнего контроля качества организована при финансовой поддержке «Roche», «ОПТЭК», «БиоЛайн», «BIOCAD», «Био-Витрум», «АМТЕО» и организационной и методической помощи со стороны NordiQC и Российского общества патологов

Литература

1. Мацко Д.Е., Шелехова К.В. Современные методы практической онкоморфологии // Практическая онкология. (2007) Т. 8. № 4:182–187.
2. Fan Lin, Zongming Chen Standardization of Diagnostic Immunohistochemistry, Literature Review and Geisinger Experience // Arch Pathol Lab Med. (2014) 138:1564–1577.
3. Mogens Vyberg, Søren Nielsen Proficiency testing in immunohistochemistry—experiences from Nordic Immunohistochemical Quality Control (NordiQC) // Virchows Arch (2016) 468:19–29.
4. Søren Nielsen External quality assessment for immunohistochemistry: experiences from NordiQC // Biotech Histochem. (2015) 90(5):331–40.
5. Завалишина Л.Э. Внешний контроль качества иммуногистохимических исследований в Российской Федерации. Отчет о проведении пилотных раундов // Архив патологии. (2018) 80(2): 66–68
6. Жарков Н.В., Хайдукова И.Л., Малахов В.Н. Проблемы внешней оценки качества гистологических и иммуногистохимических исследований // Справочник заведующего КДЛ (2015) 8:4–12
7. АОР, Клинические рекомендации по диагностике и лечению больных раком молочной железы. 2014

Обеспечение безопасности обращения медицинских изделий на уровне взаимодействия между поставщиком и пользователем/клиентом

Введение

Предметом государственного контроля за обращением медицинских изделий на территории Российской Федерации является соблюдение организациями обязательных требований при осуществлении деятельности в сфере обращения медицинских изделий.

Постановлением Правительства Российской Федерации от 02.05.2012 №413 государственная функция по проведению мониторинга безопасности медицинских изделий, находящихся в обращении в Российской Федерации, возложена на Федеральную службу по надзору в сфере здравоохранения (далее «РОСЗДРАВНАДЗОР», «Регулятор»).

«Положение о государственном контроле за обращением медицинских изделий в Российской Федерации» было утверждено постановлением Правительства от 25.09.2012 № 970.

Порядок исполнения государственной функции по контролю в отношении юридических лиц и индивидуальных предпринимателей, осуществляющих деятельность в сфере обращения медицинских изделий определен Административным регламентом Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения по исполнению государственной функции по контролю за обращением медицинских изделий, утвержденным приказом Минздрава России 5 апреля 2013 г. № 196н (ред. от 01.11.2013).

Порядок информирования РОСЗДРАВНАДЗОРа об инцидентах субъектами обращения медицинских изделий определен Приказом Минздрава России от 20.06.2012 N 12н «Об утверждении Порядка сообщения субъектами обращения медицинских изделий обо всех случаях выявления побочных действий, не указанных в инструкции по применению или руководстве по эксплуатации медицинского изделия, о нежелательных реакциях при его применении, об особенностях взаимодействия медицинских изделий между собой, о фактах и об обстоятельствах, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении и эксплуатации медицинских изделий».

В рамках исполнения функции по контролю за обращением медицинских изделий на территории Российской Федерации, РОСЗДРАВНАДЗОР утвердил «Порядок проведения мониторинга безопасности медицинских изделий для производителей (держателей регистрационных удостоверений) медицинских изделий» (Утвержден 28.12.1012 руководителем РОСЗДРАВНАДЗОРа, информационное письмо № 04И-131112 от 28.12.2012). Это основной документ, регламентирующий порядок взаимодействия ООО «Рош Диагностика Рус» с РОСЗДРАВНАДЗОром в части, касающейся безопасности применения продукции Roche, на территории Российской Федерации.

С другой стороны, порядок взаимодействия ООО «Рош Диагностика Рус» с Регулятором и пользователями определяется корпоративными стандартами Roche. К ним в первую очередь относятся «DS01 RD Post Market Surveillance», определяющий (в том числе) порядок обработки информации об инцидентах, и «DS55 Affiliate Notification», определяющий (в том числе) порядок информирования филиалов о проблемах безопасности при использовании продукции и проблемах с качеством продукции Roche.

На основании вышеуказанных документов в ООО «Рош Диагностика Рус» разработан порядок подготовки Уведомлений по безопасности и качеству и порядок уведомления пользователей/клиентов.

Уведомление пользователей по безопасности и качеству

Определения

Рекламация - любое письменное, электронное или устное утверждение или обращение от Клиентов Компании и других источников, касающееся продукции Компании, размещенной на рынке или проданной через официальных Дистрибьюторов, отражающее:

- неисправности в работе оборудования Рош;
- несоответствие результатов и характеристик заявленным стандартам;
- несоответствие точности и воспроизводимости заявленным стандартам;
- недостатки комплектности и маркировки.

Инцидент - любая неисправность/сбой, либо ухудшение характеристик и/или работы продукта, реактива, инструмента, устройства и т.д., а также любое несоответствие в маркировке или инструкциях по использованию, которое, прямо или косвенно, могло бы привести или, возможно, привело к смерти пациента, пользователя или других людей или к серьезному ухудшению состояния их здоровья.

PRI (Potentially Reportable Incident, потенциально репортируемый инцидент) - инцидент или утверждение об инциденте, который должен быть рассмотрен, чтобы определить необходимость уведомления соответствующих регулирующих органов.

PSI (Potential Safety Issue, потенциальная проблема безопасности) - инцидент или утверждение об инциденте, который должен быть рассмотрен Советом по безопасности Roche, чтобы определить необходимость корректирующих и предотвращающих мероприятий для обеспечения безопасности применения продукции.

Safety Board Notification (SBN) - сообщение от Совета по безопасности Roche о необходимости выполнения корректирующих или предотвращающих действий в связи с выявленной проблемой безопасности применения медицинского изделия, которая может привести к смерти Клиента или к серьезному ухудшению состояния здоровья.

Quality Notification (QN) - сообщение о необходимости проведения корректирующих или предотвращающих действий в связи с выявленной проблемой с качеством медицинского изделия, ограничениями использования, либо регуляторными проблемами. QN выпускаются в случаях, когда отсутствует риск смерти Клиента или серьезного ухудшения состояния здоровья.

Извещение по безопасности - сообщение в орган государственного контроля для информирования о неблагоприятном событии в стране или за рубежом, связанном с изделием медицинского назначения, находящемся в обращении на территории Российской Федерации.

Уведомление по безопасности - официальное сообщение субъектам обра-

щения медицинских изделий, касающее-ся проблемы безопасности медицинского изделия.

Уведомление по качеству - официальное сообщение субъектам обращения медицинских изделий, касающееся проблем качества медицинского изделия.

Источники Уведомлений

Источниками для Уведомлений по безопасности и качеству являются Рекламации, заявления об Инцидентах, результаты внутреннего контроля на производстве и пр.

Как показывает практика, до 2% от общего количества сообщений представляют из себя потенциально репортируемые инциденты (PRI), которые рассматриваются специальным подразделением Roche с целью определения необходимости информирования Регулятора. До 50% от общего количества PRI составляют потенциальные проблемы безопасности (PSI).

В случае если по результатам расследования, проведенного Roche, подтверждена проблема с качеством продукции, выпускается Quality Notification (QN). В случае, если подтверждена проблема безопасности применения медицинского изделия, Советом по безопасности Roche выпускается Safety Board Notification (SBN), которое направляется (в том числе) во все филиалы компании, осуществляющие поставки продукции на рынок.

Подготовка и рассылка Уведомлений по безопасности

Поступление SBN в ООО «Рош Диагностика Рус» инициирует процедуру его обработки, которая включает несколько этапов, связанных с подготовкой и рассылкой Уведомлений по безопасности*.

На первом этапе подтверждается применимость SBN для России. Если продукция зарегистрирована и/или поставляется на рынок в Российской Федерации, то в соответствии с «Порядком проведения мониторинга безопасности медицинских изделий для производителей (держателей регистрационных удостоверений) медицинских изделий» возникает необходимость подготовки и отправки Регулятору Извещения по безопасности, а также уведомления пользователей/клиентов по проблеме безопасности использования медицинского изделия.

На втором этапе проводится подготовка Уведомления по безопасности и формы Подтверждения об уведомлении. Эти документы готовятся Менеджером по продукции / Техническим менеджером по продукции на основании информации из SBN. В соответствии с п.4.5 «Порядка проведения мониторинга безопасности Медицинских изделий для производителей (держателей регистрационных удостоверений) медицинских изделий» в Уведомление включается следующая информация:

- ✓ Четко различимый заголовок «Уведомление по безопасности»;
- ✓ Категория адресатов, которым предназначено Уведомление;
- ✓ Наименование продукции, каталожные и/или серийные номера, номера партий, на которые распространяется Уведомление;
- ✓ Изложение мероприятий, направленных на обеспечение безопасности изделий, включая описание проблемы безопасности и ее причин;
- ✓ Описание возможных проблем безопасности, связанных с неправильным

функционированием изделия или его несоответствием установленным требованиям;

- ✓ Рекомендуемые действия, которые должны быть предприняты получателем Уведомления, включая рекомендации для лиц, которые ранее применяли изделие или использовали результаты;
- ✓ Временные рамки (в случае необходимости), в течение которых необходимо предпринять действия;
- ✓ Контакты лиц для получения дополнительной информации.

В соответствии с рекомендациями Рош в Уведомлении указывается номер SBN. В текст Уведомления включается просьба о подписании Подтверждения об уведомлении и отправке его в Группу качества. Уведомление подписывается двумя сотрудниками ООО «Рош Диагностика Рус», уполномоченными на подписание такого рода документов и имеющих соответствующую квалификацию.

На третьем этапе производится рассылка Уведомлений конечным пользователям курьерской почтой с подтверждением вручения в комплекте с формой Подтверждения об уведомлении.

В случае, когда конечный клиент/пользователь продукции, указанной в Уведомлении по безопасности, неизвестен (например, конечные пользователи реагентов), а продукция отправлялась Дилерам, то Дилерам направляется Запрос (Информационное письмо) с требованием об уведомлении Клиентов и предоставлении Подтверждения об уведомлении клиентов.

На четвертом этапе проводится сбор и сохранение Подтверждений об уведомлении от пользователей/клиентов, так как, в соответствии с требованиями Регулятора, пользователь считается уведомленным только при наличии документального подтверждения об ознакомлении с Уведомлением (например, подписанная форма Подтверждения об уведомлении, письмо**, e-mail, копия квитанции с подтверждением вручения).

Подготовка и рассылка Уведомлений по качеству

Указанные в начале статьи нормативные акты Российской Федерации (в частности, «Порядок проведения мониторинга безопасности медицинских изделий для производителей (держателей регистра-



* Другие этапы обработки SBN, не связанные с подготовкой и рассылкой Уведомлений по безопасности в данной статье не рассматриваются.

** Обязательной отправки оригинала не требуется. Достаточно, например, отправить отсканированную копию документа по электронной почте на указанный в форме адрес.

ционных удостоверений) медицинских изделий») не требуют обязательного уведомления пользователей по проблемам качества продукции. Однако такое требование может содержаться в Quality Notification (QN).

К QN, которые требуют информирования пользователей/клиентов, относятся те, которые содержат:

- Информацию о продукции, характеристики которой не соответствуют спецификациям, включая проблемы с маркировкой продукции;
- Информацию о проблемах с продукцией, которые потенциально затрагивают результаты или интерпретацию результатов пациентов;
- Информацию о проблемах с качеством продукции или регуляторных проблемах, которые требуют информирования Клиентов, либо выполнения ими каких-либо мероприятий;
- Информацию об ограничениях (недостатках) в инструкциях по эксплуатации и методиках;
- Информацию о мероприятиях или работах по модернизации программного обеспечения, необходимых для устранения проблем, связанных с качеством программного обеспечения;

В этом случае, если продукция зарегистрирована и/или поставляется на рынок в Российской Федерации, в соответствии со стандартами Roche также проводится уведомление пользователей/клиентов.

Подготовка Уведомления по качеству проводится Менеджером по продукции / Техническим менеджером по продукции на основании информации из QN.

В Уведомление по качеству включается следующая информация:

✓ Четко различимый заголовок «Уведомление по качеству»;

✓ Категория адресатов, которым предназначено Уведомление;

✓ Наименование продукции, каталожные и/или серийные номера, номера партий, на которые распространяется Уведомление;

✓ Описание проблемы и ее причин;

✓ Оценка риска;

✓ Рекомендуемые действия (в случае необходимости), которые должны быть предприняты получателем Уведомления, включая рекомендации для лиц, которые ранее применяли изделие или использовали результаты;

✓ Временные рамки (в случае необходимости), в течение которых необходимо предпринять действия;

✓ Контакты лиц для получения дополнительной информации.

В соответствии с рекомендациями Рош, в Уведомлении указывается номер QN. Уведомление подписывается двумя сотрудниками ООО «Рош Диагностика Рус», уполномоченными на подписание такого рода документов и имеющих соответствующую квалификацию.

Порядок информирования пользователей/клиентов определяется Менеджером по продукции / Техническим менеджером по продукции. В случае, когда конечный клиент/пользователь продукции, указанной в Уведомлении по качеству, неизвестен (например, конечные пользователи реагентов), а продукция отправлялась Дилерам, то Уведомление по качеству направляется Дилерам. Дальнейшее распространение Уведомления по качеству возлагается на Дилеров.

Обязательного подтверждения об ознакомлении пользователей с Уведомлением по качеству не требуется.

Заключение

Обеспечение безопасности пользователей и пациентов при использовании продукции Roche, а также выполнение требований законодательства являются основными приоритетами ООО «Рош Диагностика Рус». Компания предпринимает все возможное для обеспечения своевременного информирования пользователей/клиентов по проблемам безопасности применения продукции Roche и проблемам с качеством продукции.

Однако в значительной степени выполнение требований Российского законодательства зависит от пользователей/клиентов Компании. Своевременное подтверждение об ознакомлении с Уведомлением по безопасности (заполнение и отправка в наш адрес формы Подтверждения об ознакомлении) позволяет нам не только быть уверенными, что информация по проблеме безопасности доведена до сведения заинтересованных лиц, но и подтвердить выполнение требований Российского законодательства в случае проверок со стороны Регулятора. Поэтому мы чрезвычайно благодарны всем, кто помогает нам в реализации этих целей и отправляет в наш адрес Подтверждения об уведомлении.

Автор статьи:

С.В. Глинчиков

*Руководитель группы качества
ООО «Рош Диагностика Рус»*

Пять вопросов об интерференции биотина в иммунном анализе

Несмотря на успехи в понимании механизмов иммунного взаимодействия, сегодня не существует аналитической технологии, которая была бы устойчива ко всем видам интерференции. Интерференция является одним из факторов, который способствует искажению результатов лабораторного исследования. В связи с тем, что получение достоверного результата может привести к неверной оценке состояния пациента, а затем и к неправильному лечению, лабораториям необходимо оценить потенциал различных видов интерференции и разработать процедуры управления этими рисками.

1. Насколько актуальна проблема интерференции в иммуноанализе?

Интерференция определяется как влияние вещества, способного изменять истинное значение аналита в биологическом материале пациента. Инновационный подход к оценке индивидуальных эффектов и помех у отдельных пациентов, представили Vogeser M. и Seger Ch. [1]. Авторы предлагают использовать понятие «нетипичная (irregular) аналитическая ошибка» в случаях, когда результат теста, полученный в образце пациента рутинным методом, отличается от результата, полученного референсным методом более чем на погрешность измерения рутинного метода.

Интерференция может приводить к ложно-повышенному или ложно-пониженному содержанию анализируемого вещества в зависимости от характера вмешивающегося вещества и методики исследования. Выраженность эффекта зависит от концентрации вещества, искажающего результат, но не обязательно прямо пропорциональна его содержанию в биологическом материале. Интерференция не выявляется при стандартных процедурах контроля аналитического качества, более того, нередко результаты пациента клинически правдоподобны и часто воспроизводятся аналитической системой. В то же время данные, полученные на разных аналитических системах при наличии искажающего фактора, не согласуются друг с другом [2].

Иммунологический анализ (иммуноанализ) – важная составляющая диагностического процесса, использующаяся для быстрого и надежного обследования

пациентов при многих заболеваниях. С помощью иммунных тестов проводится определение широкого спектра аналитов: индивидуальных белков, гормонов и биологически активных соединений, лекарственных веществ, витаминов, ряда инфекционных агентов и антител к ним. Тесты, основанные на реакции антиген-антитело, имеют неоспоримые аналитические преимущества, но при этом могут быть восприимчивы к интерференции. Это связано с тем, что на результат пациента влияют не только формат иммунологического анализа и специфичность тест-системы, но и свойства матрицы биологического материала, т.е. особенности неспецифического взаимодействия между образцом и реагентами. Образец биологического материала каждого человека представляет собой уникальное сочетание индивидуального спектра различных аналитов, изменённых концентраций обычных компонентов, перекрестно реагирующих веществ, макромолекулярных комплексов, антител, лекарственных веществ, их метаболитов и пищевых добавок. Проявление эффекта матрицы обусловлено тем, что современные иммунологические исследования выполняются из первичной пробирки без предварительной экстракции аналита [3].

Частота клинически значимых ошибок в эпоху автоматизированного анализа оценивается на уровне 0,012–0,06%, что позволяет прогнозировать вклад интерференции в недостоверный результат на уровне менее 0,078% от всех результатов [3]. Несмотря на низкую вероятность получения недостоверного результата, его появление связано с угрозой избыточных диагностических процедур или ошибочного лечения пациента. Знание возможных причин интерференции и разработка процедур по их выявлению и предотвращению, таких, как точное следование инструкциям к тестам, обучение врачей и информирование пациентов, могут минимизировать риск [4].

2. Какие причины приводят к интерференции в иммуноанализе?

По классификации, предложенной Ward G. и соавторами [5], причины интерференции в иммунном анализе можно разделить на аналит-независимые и аналит-зависимые.

Аналит-независимые причины

- Преаналитические
 - Неадекватное центрифугирование с образованием микросгустков;
 - Присутствие в образце свободного гемоглобина (гемолиза), мутности/липемии и билирубина (иктеричности);
 - Эффект переноса при использовании моющихся дозирующих устройств;
- Аналитические
 - Зависимость аналита от связывающего белка, например, появление артефактов при патологических состояниях. В частности, свободные жирные кислоты могут усиливать высвобождение тироксина (Т4) из связывающих белков;
 - Антитела, направленные против меток, например, антитела к рутиневой метке;
 - Вмешательство в формирование сигнала лекарственных веществ, например, биотина.

Аналит-зависимые причины

- Эндогенные антитела
 - Гетерофильные антитела: обычно природные полиспецифические низкоаффинные антитела. В большинстве случаев гетерофильные антитела возникают в процессе естественного синтеза разнообразных антител, при котором продуцируются слабые ранние мультиспецифические антитела против различных антигенов. Эти полиреактивные антитела могут проявлять свойства аутоантител и быть идиотипическими антителами, нередко встречаются среди новорожденных и чаще представлены ревматоидным фактором IgM. Гетерофильные антитела после воздействия антигена заменяются высокоаффинными антителами. Из-за их относительно низкого сродства, они проявляют интерференцию в меньшей степени, чем человеческие антитела против антигенов животного происхождения.
 - Человеческие антитела против антигенов животного происхождения: высокоаффинные поликлональные антитела, направленные против специфических иммуноглобулинов IgG или IgM определенного животного. Эти антитела чаще всего являются человеческими антителами против иммуноглобулинов мыши, кролика и овцы, т.е. животных, которые используются для производства коммерческих антител. Ситуация с этим видом интерференции может усугубляться из-за широкого распространения моноклональ-

ных антител в качестве диагностических и терапевтических инструментов.

- Аутоиммунные антитела - эндогенные антитела, направленные против компонентов собственного организма. Известными примерами являются антитела при аутоиммунном тиреоидите и ревматоидные факторы.

- Парапротеины - патологические иммуноглобулины, продукция которых связана с развитием злокачественного новообразования. К парапротеинам, в частности, относится белок Бенс-Джонса.

▪ Перекрестно реагирующие вещества, например, кросс-реактивность преднизолона при определении кортизола.

3. С чем связано повышенное внимание к биотину как фактору интерференции?

Биотин представляет собой маленькую и стабильную молекулу, которая может конъюгировать с множеством белков без серьезного изменения их биологической активности. Такое взаимодействие является наиболее сильным из всех известных нековалентных связываний между белком и лигандом и используется в иммунном анализе с целью усиления сигнала.

При этом, биотин (витамин В7, витамин Н) является частью нормальной диеты и участвует в ферментативных реакциях карбоксилирования. Высокие значения экзогенного биотина обладают потенциалом в отношении искажения результатов на системах, использующих комплекс стрептавидин-биотин. Интерференция может заключаться в появлении ложно завышенных результатов при использовании конкурентной схемы анализа, когда избыток биотина в образце конкурирует с биотинилированным аналогом за места связывания на молекуле стрептавида. В другом случае, при использовании метода в формате «сэндвич», избыток биотина в образце может замещать биотинилированные антитела и приводить к ложно заниженным результатам.

Согласно нормам физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации, рекомендованное потребление биотина составляет 50 мкг/сут (МР 2.3.1.2432-08), а дефицит биотина встречается крайне редко, поскольку практически при любом типе питания человек получает достаточное количество

Варианты потребления биотина



Рисунок 1. Варианты потребления биотина.

витамина Н. Однако, несмотря на отсутствие научных доказательств, биотин всё чаще включают в пищевые добавки, заявляя о его способности укреплять волосы и ногти. Дозы присутствующих на рынке безрецептурных препаратов, варьируют от 50 мкг до 10 мг в день, что значительно превышает суточную потребность в биотине.

Литературные сообщения о случаях искажения биотином результатов анализов, приводивших к неправильной трактовке, носят спорадический характер. Следует отметить, что эти описания касаются применения мегадоз биотина, значительно превышающих 10 мг/сутки при экспериментальном лечении метаболических заболеваний (тиамин-зависимом заболевании базальных ганглиев, биотинидазной недостаточности, нарушении митохондриального энергообмена) и рассеянного склероза.

4. Как Roche предлагает оценивать интерференцию со стороны биотина на результаты исследований?

Все иммунохимические реагенты, разрабатываемые Roche, традиционно тестируются с целью установления дискриминационного порога, выше которого возможно вмешательство биотина в результат исследования. Наряду с указанием дискриминационного порога, во всех инструкциях к реагентам приводится уведомление: «У пациентов, получающих лечение высокими дозами биотина (> 5 мг/день), следует получать образцы биологического материала не раньше чем через 8 (восемь) часов после последнего введения биотина».

Тем не менее, учитывая рост дозировок и распространенность безрецептурных препаратов биотина, Grimsey P. и соавт. провели исследование фармакокинетических свойств высоких доз биотина от 5 до

Влияние биотина на результаты иммунохимических тестов

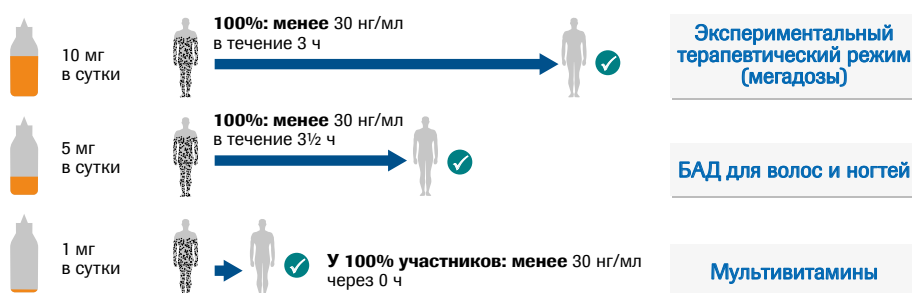


Рисунок 2. Влияние биотина на результаты иммунохимических тестов [6].

20 мг/сутки с использованием технологии электрохемилюминесценции (анализатор cobas e411, Roche Diagnostics) [6]. Исследование направлено на установление временного интервала, необходимого для достижения концентраций биотина, не вызывающих интерференцию (30 нг/мл биотина в сыворотке) при различных дозировках биотина. Значение 30 нг/мл было выбрано в рамках консервативного подхода, поскольку во многих тестах Roche пороговое значение для интерференции биотина составляет >50 нг/мл. Основные результаты работы Grimsey P и соавт. приведены ниже [6]:

- при потреблении биотина в пределах физиологической нормы, его концентрация в сыворотке очень мала: <0,1 - 0,8 нг/мл и не вмешивается в иммунный анализ;
- при приеме биотина <1 мг/сут (дозировка, характерная для безрецептурных мультивитаминных препаратов) уровни биотина в сыворотке падают ниже 10 нг/мл через 2 часа;
- при приеме биотина ≤10 мг/сут (максимальная дозировка, характерная для пищевых добавок) достижение порога для интерференции биотина в сыворотке, т.е. >30 нг/мл, достигается через 8 часов;
- при приеме биотина ≥20 мг в сутки (более чем 400-кратное превышение адекватной суточной потребности в биотине) достижение порога для интерференции биотина в сыворотке, т.е. >30 нг/мл, может наступить через 31 час после последнего приема;
- если порог интерференции для технологии иммунного анализа составляет <30 нг/мл, а пациент принимает биотин в дозе >10 мг, рекомендуется увеличивать период выведения, т.е., время от последнего приема до взятия крови до 73 часов.

В недавнем исследовании, проведенном на анализаторе cobas e 601, экспериментально полученные пороги для интерференции биотина превысили значение, указанное в инструкциях к реагентам Roche. Katzman B.M. и соавт. установили, что интерференция со стороны биотина для теста на тиреотропный гормон на-

чиналась с 30 нг/мл, при ограничении от производителя 20 нг/мл; для свободного тироксина - с 61 нг/мл, а порог, указанный в инструкции, составляет 25 нг/мл; общий тироксин показал устойчивость до 348 нг/мл биотина, при декларируемых 25 нг/мл [7]. Таким образом, иммунохимические тесты производства Roche обладают более высокой степенью устойчивости к биотину, чем принято считать.

5. Насколько сложно предотвратить интерференцию со стороны биотина?

Интерференцию со стороны биотина у пациентов, не получающих экспериментального лечения мегадозами биотина, предотвратить несложно. Соблюдение существующих правил по подготовке к исследованию позволяет избежать даже потенциального вмешательства биотина в результат пациента. ГОСТ Р 53079.4-2008 «Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Правила ведения преаналитического этапа» рекомендует при плановом выполнении лабораторного теста брать кровь натощак (после примерно 12 ч голодания), а «лекарственные средства, способные повлиять на результаты назначенного теста *in vivo* или *in vitro*, должны быть отменены за 2-3 дня до проведения теста, если это возможно по состоянию пациента». За 8-часовой интервал после приема максимальной дозы биотина, содержащейся в безрецептурных пищевых добавках (10 мг), его концентрация в сыворотке снижается до значений, не способных исказить результаты теста. Таким образом, сдача крови в утренние часы натощак и до приема лекарственных препаратов обеспечивает отсутствие интерференции со стороны биотина у пациентов, принимающих его в виде витаминных комплексов и пищевых добавок.

В ситуациях использования экспериментального режима лечения при назначении мегадоз биотина, важная роль отводится взаимодействию лаборатории и клинициста. В инструкциях к тестам, основанных на использовании комплекса

стрептавидин-биотин, включено предупреждение о взаимодействии с биотином, но такие инструкции обычно не попадают к клиницистам. Однако врачам, под контролем которых принимаются мегадозы витамина Н, необходимо получить эти данные, чтобы разработать режим приема, позволяющий избежать интерференции при выполнении лабораторных исследований. Следовательно, клиницисты должны сообщить лаборатории об использовании экспериментальных режимов лечения биотином, а лаборатория проинформировать клинициста о периоде выведения препарата в зависимости от суточной дозы биотина.

Частный случай потенциального влияния со стороны биотина является редким примером интерференции, которой можно успешно управлять, т.к. известны причины искажения результата, механизмы взаимодействия с антителами, фармакокинетика, а профилактика не требует от пациента дополнительных действий по сравнению со стандартной подготовкой к исследованию. В качестве дополнительного шага к получению достоверных результатов можно включить в правила подготовки пациента к сдаче анализа крови отдельный пункт про исключение витаминов и биодобавок перед исследованием, а в анкетах задать конкретные вопросы о приеме лекарств, отпускаемых по рецепту, пищевых добавках и витаминных препаратах.

Проблема интерференции становится более актуальной с возрастанием ценности лабораторной информации. Надежные технологические решения и ответственность производителя за получение достоверного результата являются важной частью обеспечения системы здравоохранения ценной лабораторной информацией.

Автор статьи:

В.С. Берестовская, к.м.н
Эксперт по ключевым проектам
ООО «Рош Диагностика Рус»

Литература

1. Vogeser M., Seger Ch. Irregular analytical errors in diagnostic testing – a novel concept. *Clin Chem Lab Med.* 2018; 56(3):386-396.
2. Plebani M. Analytical quality: an unfinished journey. *Clin Chem Lab Med.* 2018; 56(3):357-359.
3. Sturgeon C.M., Viljoen A. Analytical error and interference in immunoassay: minimizing risk. *Ann Clin Biochem.* 2011; 48 (Pt 5):418-432.
4. Эмануэль В.Л., Берестовская В.С. Нетипичные ошибки в иммунном анализе. Современная лаборатория, 2018.-№1.-С.54-58.
5. Ward G., Simpson A. et al. The investigation of interferences in immunoassay. *Clinical Biochemistry* 2017; 50: 1306-1311.
6. Grimsey P, Frey N., et al. Population pharmacokinetics of exogenous biotin and the relationship between biotin serum levels and *in vitro* immunoassay interference. *Int. J. Pharmacokinet.* 2017; 2(4): 247-256.
7. Katzman B.M., Rosemark C., et al. Investigation of biotin interference in common thyroid function tests using the Roche Elecsys immunoassay system. *Clin. Chem.* 2016; 62 (Suppl. 10), A-260.

Спасти от послеоперационного инфаркта

Роль высокочувствительного кардиотропонина Т



Сложные оперативные вмешательства являются стрессом для организма и могут вызывать осложнения со стороны сердечно-сосудистой системы.

Примерами внесердечных хирургических вмешательств являются ортопедические, абдоминальные и неврологические операции. Свыше 200 миллионов взрослых пациентов по всему миру подвергаются плановым или неотложным внесердечным операциям, и более миллиона ежегодно умирают в течение 30 дней после оперативного вмешательства.¹ В подобных случаях сердце не является предметом оперативного вмешательства, однако сложные инвазивные воздействия провоцируют стрессовое состояние, сопровождающееся разнообразными воспалительными процессами. Эти процессы активируют систему свертывания крови и могут привести к разрыву бляшек и стенозированию сосудов.² Последующие сердечно-сосудистые события являются причиной огромного количества летальных исходов. В качестве специфических маркеров стресса проявили себя сердечные тропонины. В связи с этим, исследователи программы VISION* провели оценку взаимосвязи между значениями периоперационного** вч-ТпТ (высокочувствительный кардиотропонин Т) и его прогностической значимостью в отношении летальных исходов в течение 30 дней после внесердечных хирургических вмешательств.³ Многообещающие результаты, изложенные ниже, будут способствовать совершенствованию послеоперационного кардиологического менеджмента.

Программа исследований VISION являлась глобальным проектом, охватившим более 21 800 пациентов различных медицинских центров. Участие в исследовании

приняли 23 центра из 13 стран и шести континентов.

Дизайн исследования:

- Наблюдались пациенты возрастом ≥ 45 лет (средний возраст: 63,1 год; 49,1% женщины), перенесшие внесердечные операции (плановые, срочные или экстренные) под местной анестезией или общим наркозом, а также, прошедшие после операции в стационаре как минимум одну ночь. В данной группе уровень летального исхода за 30-дневный период составил более 1%, то есть одна из ста внесердечных операций была ассоциирована с летальным исходом. Данные последствия были обусловлены тем, что прооперированные пациенты зачастую уже имели бессимптомные кардиологические поражения (атеросклероз коронарных артерий и др.). Учитывая рост числа пожилых людей, подвергаемых оперативным вмешательствам, возможность проведения достоверного кардиологического мониторинга является важнейшей задачей лабораторной диагностики.⁴

- Все центры, принимавшие участие в исследовании, использовали тест Roche на высокочувствительный кардиотропонин Т (Tropoin T hs Elecsys Roche). Измерения вч-ТпТ проводились через 6-12 часов после операции и далее один раз в три дня. Во второй части исследования дополнительно анализировали предоперационные значения вч-ТпТ (у 40,4% пациентов).

Повышенным (патологическим) уровнем концентрации вч-ТпТ в соответствии

с инструкцией производителя был определен результат >14 нг/л (99-й процентиль для здоровой популяции). Все пациенты с повышенными результатами в течение нескольких дней обследовались независимыми экспертами с целью исключения ишемии миокарда (наблюдение на предмет наличия специфических симптомов, проведение ЭКГ). После этого эксперты проводили анализ и систематизацию случаев с повышением вч-ТпТ как ишемической, так и неишемической этиологии. Кроме того, фиксировали наличие интра- или послеоперационного (т.е. отсутствовавшего до проведения операции) осложнения.

В качестве критерия для прогностической оценки результатов вч-ТпТ были установлены следующие границы клинически значимого повышенного кардиологического риска: летальный исход в течение 30 дней после операции $\geq 3\%$ и коэффициент риска (HR) ≥ 3 .

Опрос пациентов проводился по телефону через 30 дней после оперативного вмешательства. Удалось опросить 96,4% участников (n=21 050).

Задачи исследования

1) Оценить взаимосвязь между периоперационными значениями вч-ТпТ и летальными исходами пациентов в течение 30 дней после операции.

2) Изучить возможность использования вч-ТпТ для диагностики ишемически обусловленного поражения миокарда во время или после внесердечных операций

(MINS, myocardial injury after noncardiac surgery/поражение миокарда после вне-сердечной операции), которое считается независимым фактором риска летального исхода, и чаще всего остается «клинически невидимым».

3) Выявить зависимость между значением вч-ТнТ и функциональным состоянием почек (СКФ, скорость клубочковой фильтрации), а также полом пациента.

4) Выявить показатели, характеризующие пациента с MINS (поражение миокарда после внесердечной операции) и оценить его последствия.

5) Определить долю MINS, которые могут остаться «незамеченными» без измерения вч-ТнТ.

Результаты

1. Результаты оценки летальности пациентов в течение 30 дней после операции

- 266 пациентов (1,2%) умерли в течение 30 дней после операции.
- Послеоперационный подъем уровня вч-ТнТ ≥ 20 нг/л был ассоциирован с уровнем летальности $\geq 3\%$ в период 30 дней после операции. Связанный с этим коэффициент риска (HR) был на уровне >23 .
- Зависимости от СКФ и от пола пациента не установлено.
- Наряду с послеоперационным подъемом уровня вч-ТнТ ≥ 20 нг/л, значительная корреляция с повышенным риском летального исхода в 30-дневный период наблюдалась в том случае, если абсолютная величина вч-ТнТ в динамике (при двух или более измерениях вч-ТнТ) изменялась на ≥ 5 нг/л. Это наблюдалось как в пред- и послеоперационный период в совокупности, так и в качестве исключительно послеоперационных событий. Точное время определения вч-ТнТ в пределах периоперационного периода не играло существенной роли. Коэффициент риска во всех вышеперечисленных вариантах находился на уровне от 4,5 до 5,2.

Таблица 1. Алгоритм³ оценки угрозы риска смертности в 30-дневный период после операции $>30\%$ по вч-ТнТ

Критерии повышенного риска летального исхода в 30-дневный период
В течение трех дней после операции:
Послеоперационный подъем уровня вч-ТнТ от >20 нг/л до <65 нг/л, а также абсолютное периоперационное изменение вч-ТнТ >5 нг/л
или
послеоперационное значение вч-ТнТ >65 нг/л

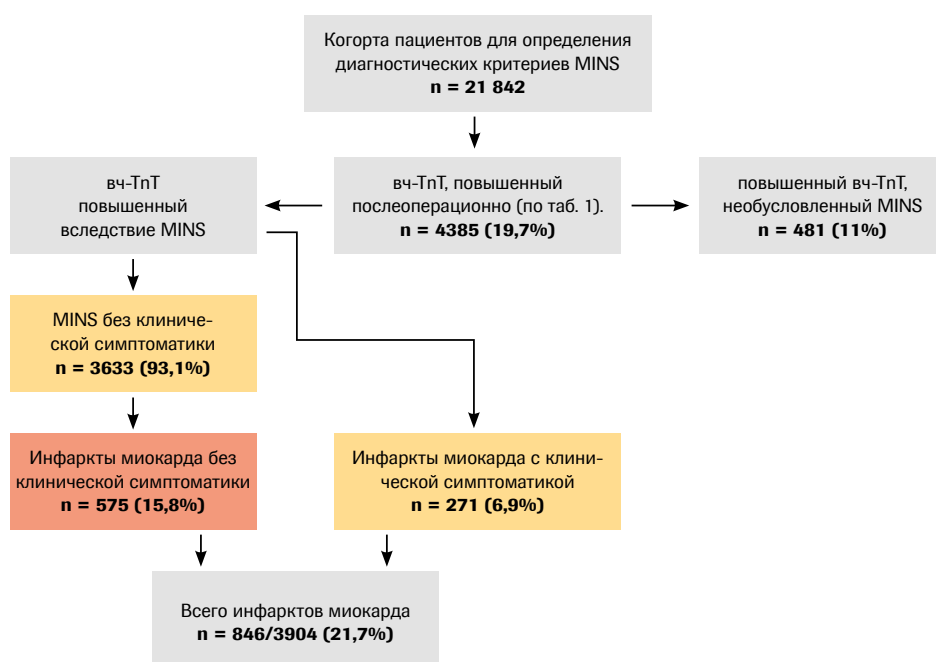


Рисунок 1. Частота и проявление миокардиальных поражений/событий после внесердечных операций (MINS) в исследовании VISION³.

- Прогностическая значимость изменения уровня вч-ТнТ в динамике на ≥ 5 нг/л относилась только к пациентам с уровнем послеоперационного вч-ТнТ ниже 65 нг/л. Превышающие данный уровень значения были ассоциированы с повышенным риском смертности.
- На основании результатов предложен алгоритм использования теста вч-ТнТ для оценки риска летального исхода в 30-дневный период после операции (Таб.1)
- Около 20% всех пациентов после оперативного вмешательства с пре-/послеоперационными измерениями кардиотропонина попали в категорию «повышенное значение вч-ТнТ» (критерии - см. Таб.1). В соответствии с этим, повышение уровня вч-ТнТ является частым феноменом при внесердечных операциях.

2. Выводы по критериям MINS (поражение миокарда после внесердечных операций)

- У 89% общего количества пациентов послеоперационное повышение вч-ТнТ (таб. 1) являлось ишемически обусловленным (MINS), и только в 11% случаев отсутствовала ишемическая этиология (например, вследствие сепсиса, эмболии лёгочной артерии) (Рис. 1). Таким образом, повышенное значение послеоперационного вч-ТнТ преимущественно отражает ишемически обусловленное периоперационное поражение сердечной мышцы.
- В течение 30-дневного периода наблюдалась корреляция между повышенными значениями послеоперационного вч-ТнТ и уровнем смертности, независимо от того, были у пациента обнаружены ише-

мические симптомы, или нет. Таким образом, был выявлен следующий критерий MINS: повышенный послеоперационный уровень вч-ТнТ, обусловленный ишемией миокарда, без обязательного наличия ишемических симптомов (Таб. 2).

- Описанный выше тип поражения миокарда был ассоциирован с повышенным летальным исходом в 30-дневный период

Таблица 2. Определение MINS³

Критерии MINS
Повышенные послеоперационные значения вч-ТнТ (таб. 1), обусловленные ишемией миокарда. Наличие симптомов ишемии необязательно.

после операции (7,3%) и другими сердечно-сосудистыми событиями. Вместе с тем, наличие предоперационного повышенного значения вч-ТнТ ранее не рассматривали в качестве обязательного условия.

- Программа VISION является вторым³ крупным исследованием, продемонстрировавшим, что MINS может присутствовать независимо от наличия ишемических признаков. Его диагностическим критерием является повышенное значение послеоперационного вч-ТнТ.

Ретроспективный анализ показал следующее: в отсутствии периоперационного мониторинга вч-ТнТ, свыше 93% всех поражений MINS (n = 3633 / 3904) и 68% инфарктов миокарда (n = 575 / 846) (Рис. 1) могли остаться неопознанными в связи с отсутствием клинических симптомов.

- Свыше 94% установленных диагнозов MINS были поставлены на 2-й день после операции.



При внесердечных оперативных вмешательствах рост вч-ТнТ отражает уровень периоперационного поражения сердечной мышцы. Данный факт служит критерием для определения характера и объема послеоперационного кардиологического ведения пациента.

Заключение

Послеоперационный мониторинг вч-ТнТ дает возможность оценить риск ле-

тального исхода у пациентов в возрасте > 45 лет в краткосрочном периоде после внесердечных операций, а также является инструментом объективной диагностики MINS. В исследовании VISION данные риски наблюдались примерно у 20% всех прооперированных пациентов, но в большинстве случаев они остались клинически незамеченными.

Самый высокий риск кардиологических осложнений наблюдается в первые 24 - 36 часов после операции. У 94% пациентов MINS возникал в течение двух дней после операции - когда анальгетики могут скрывать кардиологические симптомы. При этом большинству пациентов с MINS не проводилась вторичная профилактика сердечно-сосудистых событий.

Дополнительный анализ показал, что без периоперационного мониторинга вч-ТнТ, свыше 93% всех поражений ишемической этиологии и 68% инфарктов миокарда могли остаться неопознанными в связи с отсутствием клинических симптомов. Исследование VISION продемонстрировало, что в указанной группе пациентов, перенесших внесердечные операции, послеоперационный подъем вч-ТнТ > 20 нг/л, а также абсолютное периоперационное изменение вч-ТнТ на >5 нг/л, были ассоциированы с повышенным риском

летального исхода в 30-дневный период после операции.

Таким образом, ввиду высокой прогностической значимости, определение уровня вч-ТнТ позволит идентифицировать пациентов, нуждающихся в кардиологическом мониторинге в послеоперационном периоде, и снизить уровень летальности по вышеописанным причинам.

Автор статьи:

Данная статья была размещена в журнале «Diagnostik im Dialog» (Германия), издание 54 • 12 / 2017.

При возникновении вопросов, пожалуйста, обратитесь в ООО «Рош Диагностика Рус».

Контактное лицо:

Е.С. Корникова

Младший менеджер по продукции

* VISION: Vascular Events in Noncardiac Surgery Patients Cohort Evaluation

** **Периоперационный:** период, включающий временной интервал до, во время и после оперативного вмешательства.

Литература

1. VISION Study Investigators: JAMA (2012); 307 (21): 2295-2304
2. Leitlinien der DGK (2011): http://leitlinien.dgk.org/files/2011_Pocket-Leitlinien_Risikoeinschaetzung_Management.pdf
3. Devereaux PJ et al: "Association of Postoperative High-Sensitivity Troponin Levels With Myocardial Injury and 30-Day Mortality Among Patients Undergoing Noncardiac Surgery". JAMA (2017); 317 (16):1642-1561
4. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 1 июля 2015 г. №405ан "Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при нестабильной стенокардии, остром и повторном инфаркте миокарда (без подъема сегмента ST электрокардиограммы)"

Проблема интерференции атипичных форм гемоглобина в диагностике и мониторинге сахарного диабета

Высокое качество теста для определения гемоглобина HbA1C Roche

Наряду с другими белками организма, гемоглобин способен неферментативно гликозилироваться при контакте с глюкозой (т.е. присоединять ее). Из таких модификаций в крови человека количественно преобладает форма HbA1c, повышение концентрации которой измеряют для определения степени выраженности сахарного диабета вследствие их прямой корреляции. Также повышение концентрации HbA1c коррелирует с широким спектром диабетических осложнений. Таким образом, данный параметр крайне важен для оценки и мониторинга состояния здоровья людей, страдающих сахарным диабетом (1).

Для лабораторий доступны различные методы исследования HbA1c. Понимание того, какой именно параметр определяется каждым методом, а также факторов, способных оказывать влияние на результаты, – залог их корректной интерпретации.

Показано, что результаты, получаемые методом высокoeffективной жидкостной катионно-обменной хроматографии, могут подвергаться интерференции со стороны вариантных форм гемоглобина. В связи с этим, при постановке диагноза «диабет» целесообразно проводить дополнительные исследования на наличие гемоглинопатий и талассемий. Однако, данные исследования являются для лаборатории дорогостоящими и трудоемкими.

Вместе с тем, при использовании метода иммуноанализа нет необходимости определения конкретного вариантного типа, так как при расчете содержания HbA1c учитываются все типы гемоглобина. Исследования показывают, что наиболее часто встречающиеся вариантные типы гемоглобина, а также подавляющее большинство более редких форм, не оказывают интерферирующего влияния на результаты высокоспецифичных иммунологических тестов Tinaquant® Roche (12).

Темпы роста заболеваемости сахарным диабетом (СД) представляют собой серьезную медико-социальную проблему, оставляя позади себя такие опасные инфекции как туберкулёз и ВИЧ. Заболеванию подвержены самые различные группы людей, независимо от возраста, социального положения и пола. Снижение риска осложнений сахарного диабета (атеросклеротические поражения сосудов, диабетическая нефропатия, слепота, и др.) вследствие эффективной терапии обеспечит снижение смертности и улучшение качества жизни пациентов, страдающих данным заболеванием. В свою очередь, своевременная диагностика и лечение заболевания на ранних стадиях предотвратят значительные осложнения в долгосрочной перспективе.

1. Определение гликированного гемоглобина: история вопроса и основные исследования. Стандартизация различных аналитических методик

Всего известно более 1100 форм человеческого гемоглобина, причем в настоящее время все еще продолжают обнаруживаться новые (6). Большинство из них встречаются достаточно редко, а некоторые преимущественно распространены в специфических популяционных группах (7).

Впервые неоднородность гемоглобина человека была продемонстрирована в 1958 году Allen D. W. и соавт. при использовании метода катионно-обменной хроматографии. Эксперименты показали элюирование небольших пиков гемоглобина (названных «быстрыми гемоглобинами» или HbA1) перед основной фракцией HbA. В зависимости от порядка хроматографической элюции этим пикам были присвоены обозначения от HbA1a до HbA1e. Позднее выяснилось, что «быстрая» элюция данных форм была связана с особенностями их физико-химических свойств, обусловленных присоединенной молекулой глюкозы.

Гликированный гемоглобин (HbA1c, Гли-Hb, Glu-Hb) принадлежит к группе минорных компонентов гемоглобина. В 1968 г. Rahbar S. описал повышенный процент данной фракции у пациентов с СД. Тем не

менее, научно обоснованные доказательства значимости измерения HbA1c были получены только в 1990-х по окончании крупномасштабных эпидемиологических исследований: Исследования по контролю диабета и его осложнений (DCCT — Diabetes Control and Complications Trial) по СД первого типа и проспективного исследования диабета в Соединенном Королевстве (UKPDS — United Kingdom Prospective Diabetes Study) по СД второго типа. Эти исследования ясно продемонстрировали взаимосвязь между значениями HbA1c, как индикатора уровня гликемии, и долгосрочными осложнениями сахарного диабета (8).

В то же время выяснилось, что результаты измерений HbA1c, полученные в лабораториях разнообразными методами, были несопоставимы, а межлабораторный коэффициент вариаций достигал 11,2–20,1 % (4). Впервые стандартизация исследования на основе общей калибровки была предложена в 1984 г.

Регулирующую функцию по соответствию методов и значений DCCT взяла на себя Национальная программа по стандартизации HbA1c (NGSP, США). В качестве референсного метода использовали катион-обменную хроматографию, которая в долгосрочной перспективе была признана недостаточно специфичной (8). Недостатками данного метода являлись, во-первых, «оценочный» (не истинный) характер значений результатов HbA1c, а также отсутствие первичного референсного материала.

В 1993 году Международная федерация клинической химии (IFCC) создала Рабочую группу по стандартизации HbA1c с целью достижения единого стандарта и преодоления проблем, связанных с его выработкой. В качестве первичного референсного материала был предложен материал, состоящий из очищенного β-N-концевого гликированного (HbA1c) и негликированного (HbA0) HbA. Данный материал использовался для создания референсного метода IFCC. N-концевые гексапептиды HbA0 и HbA1c получали их ферментативным расщеплением с помощью эндопептидазы Glu-C. Затем фрагменты определяли методом

высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с обращенной фазой, а также количественно определяли методом масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением (вариант А) или капиллярным электрофорезом (вариант В). По итогам голосования всех национальных организаций-членов IFCC данная процедура измерения была опубликована в 2002 году в качестве референсного метода, утвержденного IFCC (4,8).

Ввиду того, что внедрение новой стандартизации породило многочисленные вопросы, совещание экспертов IFCC, Американской ассоциации диабетологов, Европейской ассоциации по исследованию диабета и Международной федерации диабета в 2007 году утвердило новую референсную систему IFCC в качестве единственной основы для проведения стандартизации измерений. Кроме того, было рекомендовано представлять результаты измерений в ммоль/моль без десятичных знаков (единицах IFCC) и процентах с одним десятичным знаком (производных единицах NGSP) (9).

В сотрудничестве с диабетологическими организациями данные рекомендации уже внедрены во многих странах, однако Российская ассоциация эндокринологов рекомендует опираться на значения HbA1c в соответствии со стандартизацией NGSP (3,10). Значения NGSP отличаются от значений IFCC, в то же время существует взаимоотношение, которое рассчитывается по следующей формуле:

$$\text{NGSP} = (0,915 \cdot \text{IFCC}) + 2,15$$

2. Особенности образования гликированного гемоглобина у больных СД

Повышение концентрации глюкозы в крови при СД значительно увеличивает ее поступление в клетки крови за счет инсулин независимых механизмов. В результате, глюкоза поступает в ткани в избытке, что вызывает неферментативное гликозилирование разнообразных белков: гемоглобина, белков мембран эритроцитов, альбумина, трансферрина, аполипопротеинов, белков эндотелия, хрусталика глаза, некоторых ферментов и пр. В результате присоединения глюкозы может изменяться заряд белковой молекулы, нарушаться ее конфигурация и блокироваться активный центр, что приводит к нарушению ее функций. В тканях здоровых людей обнаруживаются лишь небольшие количества гликозилированных белков, но у больных СД именно высокий уровень гликозили-

рования белков приводит к серьезным осложнениям.

HbA1c образуется в результате присоединения глюкозы к аминогруппе – N-концевого валина одной или обеих β-полипептидных цепей HbA1. Эффект гликозилирования не зависит от суточного ритма колебаний уровня глюкозы в крови, от физиологической активности организма, характера пищи, физических нагрузок, но зависит от степени и длительности гипергликемии.

Скорость гликозилирования гемоглобина (а, следовательно, его концентрация) определяется средним уровнем глюкозы, который существует на протяжении жизни эритроцита. Поэтому для усредненной характеристики связанной с ним глюкозы ориентируются на полупериод жизни эритроцитов – 60 суток. Поскольку количество HbA1c также зависит от общего количества гемоглобина, его концентрацию выражают в процентах от общего содержания гемоглобина. При стойкой гипергликемии концентрация HbA1c возрастает.

3. Мониторинг гемоглобина A1c (HbA1c) позволяет осуществлять долговременный гликемический контроль

С 2011 года Российская ассоциация эндокринологов определила, что значение гликированного гемоглобина является основным лабораторным тестом при выборе индивидуальной стратегии лечения и показателем для достижения терапевтической цели у пациентов с СД второго типа (2). В «Консенсусе совета экспертов Российской ассоциации эндокринологов (РАЭ) по инициации и интенсификации сахароснижающей терапии сахарного диабета второго типа» указывается, что приоритетом при выборе тактики ведения пациентов с сахарным диабетом является обеспечение безопасности пациента. Стоит напомнить, что осложнения при сахарном диабете отражают неадекватный гликемический контроль и могут быть вызваны не только длительной гипергликемией, но и избыточной интенсификацией терапии и агрессивным лечением. В отличие от глюкозы, на содержание которой оказывают значительное влияние преаналитические факторы, значение гликированного гемоглобина является объективным показателем уровня гликемии и позволяет перейти к персонализированному лечению.

Обеспечить эффективное и безопасное лечение пациентов с СД второго типа

призваны следующие положения Консенсуса:

1. Целевое значение контроля гликемии устанавливается по уровню HbA1c с учетом медицинских и социальных факторов;

2. Мониторинг эффективности сахароснижающей терапии по уровню HbA1c рекомендуется осуществлять каждые 3 месяца;

3. Изменение сахароснижающей терапии (при отсутствии достижения индивидуальных целей по уровню HbA1c) должно быть выполнено не позднее, чем через 6 месяцев;

4. При исходном уровне HbA1c 6,5–7,5% критерием достижения индивидуальной цели считается снижение содержания гликированного гемоглобина на $\geq 0,5\%$;

5. При исходном уровне HbA1c 7,6–9,0% критерием достижения индивидуальной цели считается снижение содержания гликированного гемоглобина на $\geq 1,0\%$;

6. При исходном уровне HbA1c более 9,0% критерием достижения индивидуальной цели считается снижение содержания гликированного гемоглобина на $\geq 1,5\%$ (3).

Кроме того, HbA1c предлагается использовать в диагностике СД второго типа при непереносимости глюкозы и невозможности проведения перорального теста толерантности к глюкозе (4). Таким образом, клиническая значимость теста предъявляет высокие требования к методу оценки гликированного гемоглобина, а аналитические особенности системы для определения HbA1c сегодня должны рассматриваться с точки зрения ориентированности на пациента и учитывать прямые или косвенные отрицательные последствия, связанные с исследованием (5).

4. Методы определения гликированного гемоглобина. Ограничения, вызванные интерференцией со стороны вариантов форм.

При исследовании HbA1c необходимо учитывать особенности используемого метода, а также его аналитическую надежность. Наряду с признанием HbA1c «золотым стандартом» диабетологических исследований были выявлены ограничения в его применении, обусловленные особенностями клинических ситуаций у пациентов. Во-первых, при интерпретации результатов важно учитывать вероятность интерференции, способной оказывать клинически значимое влияние на точность

измерения (12). Патологические формы гемоглобина, возникающие, как правило, в результате наследуемых мутаций, могут также оказывать негативное влияние на информативность результатов. Более того, важно понимать, что любое состояние, уменьшающее продолжительность жизни эритроцитов, может ложно занижать результаты теста HbA1c вне зависимости от того, какой метод используется (13). Таким образом, при выборе метода для гликемического контроля, понимание принципа действия каждого поможет избежать ошибочных интерпретаций и некорректной терапии.

Для определения и мониторинга HbA1c доступны разнообразные тест-системы, которые можно разделить на две группы. Часть методов основана на оценке молекулярного заряда аналитов, в том числе метод высокоэффективной жидкостной катионно-обменной хроматографии (ВЭЖХ КО) под высоким давлением (Bio-Rad, Франция-США; Tosoh, Япония) и электрофорез (Sebia, Франция). Другая группа методов основана на оценке молекулярной структуры гемоглобина. К таким методам относятся иммунологические тесты (например, тест Tina-quant® HbA1c Roche, Швейцария), метод борнат-аффинной хроматографии (Abbott, США) и масс-спектрометрия.

Согласно IFCC, наиболее надёжным методом признаётся масс-спектрометрия, которая, как правило, не зависит от присутствия генетической или химической модификации молекул HbA и/или HbA1c. Однако высокая стоимость и технические требования исследования не позволяют широко использовать его в обычных лабораториях (11).

Часто используемым методом определения HbA1c является ВЭЖХ КО. Метод основан на различиях изоэлектрических точек форм гемоглобина, разделение которых происходит благодаря специфическому и зависящему от заряда времени элюирования. Расчет результата производится на основе анализа относительной площади пиков хроматограммы. Анализ внешнего вида хроматограммы позволяет выявлять наличие вариантных форм гемоглобина HbF и HbS, что делает метод удобным для идентификации пациентов с такими патологиями. Однако, если вариантный тип гемоглобина или его гликированная форма коэлюируют с HbA или HbA1c, относительные площади пиков, используемые для расчетов, будут увеличиваться, а результат – получаться с погрешностью (12). Таким образом, в ситуации, когда требуется уста-

новить точное содержание HbA1c, любое изменение (например, карбамелирование) или присутствие вариантной формы гемоглобина приводит к изменению заряда молекулы, и, как следствие, нарушению идентификации аналита.

При исследовании результатов 298 276 образцов, полученных за 16-летний период с использованием систем Bio-Rad Variant Classic и Bio-Rad Variant II, было продемонстрировано следующее. HbE и еще 26 вариантных типов (например, тип Цюрих) коэлюируют с HbA2, а также с HbA2 могут коэлюировать еще 12 вариантных типов Hb (например, HbD тип Иран) (19). Кроме того, литературные источники подтверждают, что HbE1c нередко коэлюирует в большинстве систем ВЭЖХ КО в виде «плеча» пика HbA1c, приводя к получению ложно заниженного результата HbA1c (18, 20). Визуальная оценка хроматограмм не всегда позволяет выявить коэлюирование двух различных форм. В таких случаях для подтверждения достоверности результата необходимо проводить постанализ (например, определение генетической последовательности), что является трудоемкой и дорогостоящей процедурой.

Более распространённой является интерференция со стороны карбамелированного гемоглобина, который образуется у пациентов с почечной недостаточностью. Карбамелированный гемоглобин имеет заряд, схожий с HbA1c, и идентифицируется методами электрофореза или ВЭЖХ как HbA1c, что является главной проблемой для определения гликированного гемоглобина методом ВЭЖХ (21).

Опасность атипичных вариантов гемоглобина связана с тем, что их присутствие может показать как ложно завышенный, так и ложно заниженный результат HbA1c. В большинстве случаев обнаружение парадоксально высокого уровня HbA1c приведет к тому, что лаборатория начнет расследование, в то время как обратная ситуация останется незамеченной до ухудшения состояния пациента (22). Lo V. M. H. и соавт. приводят пример получения ложно заниженного результата HbA1c на системе VARIANT-II (Bio-Rad) у пациента с СД второго типа, поступившего для обследования в кардиологический центр (11). При лабораторном исследовании концентрация глюкозы натощак составила 9,6 ммоль/л; в то же время HbA1c был 4,7 %, что свидетельствовало о хорошем гликемическом контроле. При осмотре у пациента присутствовали изменения на коже нижних конечностей, которые

соответствовали диабетической дерматопатии. Неоднократные результаты HbA1c, характерные для компенсированного СД, нормохромные нормоцитарные эритроциты и отсутствие патологических находок в мазке периферической крови в течение предшествовавшего года наблюдения не создавали условий для сомнений в достоверности результата. Только развившееся осложнение СД потребовало провести дополнительные исследования, а прямое секвенирование гена β-глобина показало, что пациент был гетерозиготным по HbG Taïpei, присутствие которого в образце и привело к неадекватной оценке состояния пациента.

5. Тест для определения HbA1c Roche: отсутствие интерференции со стороны атипичных форм гемоглобина

Тест Tina-quant® HbA1c Roche основан на принципе конкуренции HbA1c с полигаптенном (синтетическим полимером, включающим фрагменты N-концевых последовательностей β-цепи HbA1c) за свободные высокоспецифичные поликлональные антитела к N-концевым последовательностям β-цепи HbA1c. Полигаптены в реагенте взаимодействуют с избытком антител с образованием нерастворимого комплекса, который измеряется турбидиметрически. Измеренная концентрация представляется в процентах от общего гемоглобина, который определяется в той же аликвоте образца в кювете. Подобный, так называемый «парный», тест не только устраняет неопределенность в процентном выражении HbA1c, но и дает значительную точность измерения (14).

Используемые в технологии Tina-quant® HbA1c антитела исключают возможность интерферирующего влияния на результаты вариантных форм гемоглобина, таких как HbS, HbE, HbC и HbD. Мутации, приводящие к появлению наиболее часто встречающихся вариантных типов, не затрагивают первые четыре аминокислоты, которые используются для иммунологического определения Tina-quant® (7, 12, 15, 16). Из 1585 обнаруженных вариантных форм гемоглобина, которыми поражены 7% населения земли (около 500 миллионов человек), только 17 вызывают мутации в первых четырех аминокислотах (6, 17). Таким образом, вне зависимости от наличия вариантных типов, специфическая последовательность HbA1c будет выявлена и определена. Кроме того, по сравнению с прочими методами, в том числе, ВЭЖХ

KO, тест Tina-quant® HbA1c является более экономичным и времясберегающим (18).

Заключение

Рост заболеваемости СД второго типа, длительное бессимптомное течение и инвалидирующие осложнения позволяют отнести это недуг к неинфекционным эпидемиям XXI века. Расширенное использование HbA1c для диагностики и контроля проводимой терапии при СД обеспечивают блестящее будущее для этого параметра. Поскольку обеспечение хорошего контроля гликемии зависит от точности и надежности средства лабораторного контроля, внедрение стандартизированных и минимально подверженных интерференции методов определения HbA1c позволит использовать данный инструмент для улучшения гликемического контроля.

Автор статьи:

Е.С. Корникова, к.б.н.

Младший менеджер по продукции
ООО «Рош Диагностика Рус»

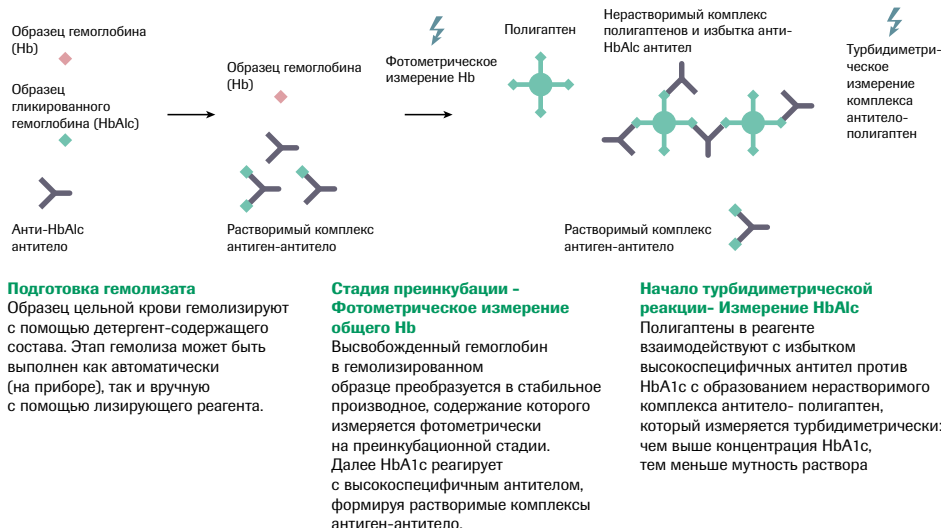


Рис. 1. Принцип теста Tina-quant® HbA1c Roche: метод конкурентного турбидиметрического иммуноанализа (TINIA) для гемолизированных образцов цельной крови

Режим «сдвоенной» реакции позволяет последовательно измерять Hb и HbA1c в одной кювете. Таким образом, пипетирование образца осуществляется всего лишь в один прием. Это позволяет повысить точность анализа, уменьшить вероятность возникновения ошибок и уменьшить время обработки образцов. Конечный результат выражается в ммоль/моль HbA1c, согласно IFCC, или в % HbA1c, согласно DCCT/NGSP и рассчитывается из соотношения HbA1c/Hb по следующим формулам:
IFCC: $\text{HbA1c [ммоль/моль]} = (\text{HbA1c/Hb}) \times 1,000$
NGSP/DCCT: $\text{HbA1c [\%]} = (\text{HbA1c/Hb}) \times 91,5 + 2,15$

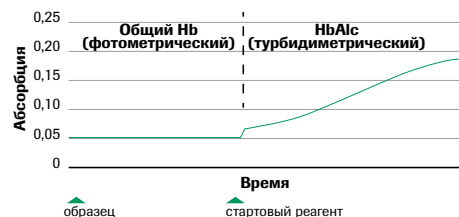


Рис. 2. Технология «парного» теста Tina-quant® HbA1c Roche

Литература

1. NGSP. HbA1c methods: Effects of hemoglobin variants (HbC, HbS, HbE and HbD traits) and elevated fetal hemoglobin (HbF). Updated July 2013. Available at: <http://www.ngsp.org> Липатов Д. В., Александрова В. К. и соавт. 2. Эпидемиология и регистр диабетической ретинопатии в Российской Федерации. Сахарный диабет, 2014, 1: 4–7. 3. Дедов И. И., Шестакова М. В. и др. Консенсус совета экспертов Российской ассоциации эндокринологов (РАЭ) по инициации и интенсификации сахароснижающей терапии сахарного диабета второго типа. Сахарный диабет, 2011, 4: 6–16. 4. John G., English E. IFCC standardised HbA1c: should the world be as one? Clin. Chem. Lab. Med. 2012; 50 (7): 1243–1248. 5. Plebani M. Exploring the iceberg of errors in laboratory medicine. Clinica Chimica Acta, 2009, 404: 16–23. 6. HbVar. A database of human hemoglobin variants and thalassemias. Available at: <http://globin.cse.psu.edu/globin/hbvar/> (accessed October 2013). 7. Weatherall, D.J., Clegg, J.B. (2001). Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. Bull World Health Organ 79, 704–712. 8. Gillery Ph. A history of HbA 1c through Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Clin Chem. Lab. Med., 2013; 51 (1): 65–74. 9. Consensus Committee. The American Diabetes Association, European Association for the Study of Diabetes, International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, and the International Diabetes Federation. Consensus statement on the worldwide standardization of the hemoglobin A1c measurement. Diabetes Care, 2007, 30: 2399–2400. 10. Дедов И. И., Краснополский В. И., Сухих Г. Т. Российский национальный консенсус «Гестационный сахарный диабет: диагностика, лечение, послеродовое наблюдение». Сахарный диабет, 2012, 4: 4–10. 11. Lo V. M.H., Shiu K. M.E. et al. A spuriously «normal» haemoglobin A1c result. Ann. Clin. Biochem. 2012, 49: 408–411 (408). 12. Bry, L., Chen, P.C., Sacks, D.B. (2001). Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin. Clin Chem 47, 153–163. 13. Goldstein, D.E., Little, R.R., Lorenz, R.A., Malone, J.I., Nathan, D., Peterson, C.M., Sacks, D.B. (2004). Tests of glycemia in diabetes. Diabetes Care 27, 1761–1773. 14. Roche Diagnostics Ltd. (2012). Tina-quant® Hemoglobin A1c. Available at: <https://cssportal.roche.com/eld/gb/en/DocumentResult/ResultList> (accessed October 2013). 15. Rees, D.C., Styles, L., Vichinsky, E.P., Clegg, J.B., Weatherall, D.J. (1998). The hemoglobin E syndromes. Ann N Y Acad Sci 850, 334–343. 16. INSERM US14. Orphanet: hemoglobin E disease. Available from: http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=en&Expert=2133 (accessed October 2013). 17. Patrinos, G.P., Giardine, B., Riemer, C., Miller, W., Chui, D.H.K., Anagnou, N.P., Wajcman, H., Hardison, R.C. (2004). Improvements in the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations for population and sequence variation studies. Nucleic Acids Res 32, D537–D541. 18. Weykamp, C.W., Penders, T.J., Muskiet, F.A., van der Slik, W. (1993). Influence of hemoglobin variants and derivatives on glycohemoglobin determinations, as investigated by 102 laboratories using 16 methods. Clin Chem 39, 1717–1723. 19. Szuberski, J., Oliveira, J.L., Hoyer, J.D. (2012). A comprehensive analysis of hemoglobin variants by high-performance liquid chromatography (HPLC). Int J Lab Hematol 34, 594–604. 20. Roberts, W.L., Frank, E.L., Moulton, L., Papadea, C., Noffsinger, J.K., Ou, C.N. (2000). Effects of nine hemoglobin variants on five glycohemoglobin methods. Clin Chem 46, 569–572. 21. Jaisson S., Pietrement C., Gillery P Carbamylation derived products (CDPs): bioactive compounds and potential biomarkers in chronic renal failure and atherosclerosis. Clin. Chem. 2011; 57: 1499–1505. 22. Chen D., Crimmins D. L. et al Hemoglobin Raleigh as the cause of a falsely increased hemoglobin A1C in an automated ionexchange HPLC method. Clinical Chemistry, 1996, 44 (6): 1296–1301.

Кальцитонин в диагностике медуллярного С-клеточного рака щитовидной железы

Введение

Онкологические заболевания щитовидной железы (ЩЖ) вносят существенный вклад в статистику смертности по всему миру. Согласно данным ВОЗ, в мире от рака щитовидной железы ежегодно погибает приблизительно 40000 человек (1). Медуллярный С-клеточный рак щитовидной железы (МРЩЖ) составляет лишь небольшую долю от общего числа случаев неоплазий этого важнейшего органа – всего 0,6%, однако данный вид рака весьма интенсивно изучается, что связано, главным образом, с тремя особенностями этой патологии. Во-первых, несмотря на условно-низкую частоту возникновения, МРЩЖ является достаточно агрессивным в своем течении: он способен быстро прорасти в окружающие ткани, метастазируя в самые различные органы, в том числе кости и печень (2, 3). Во-вторых, вследствие первого обстоятельства, а также по причине близкого расположения очага возникновения к органам головы, данный вид рака в абсолютно подавляющем большинстве случаев рекомендуется к радикальному удалению вместе со всей ЩЖ (2, 3). Наконец, третья особенность: данный тип рака в 25% случаев является следствием герминальной мутации, которая, наряду с возникновением МРЩЖ, может также провоцировать возникновение других новообразований (2, 3). По этим причинам развитие методов ранней диагностики МРЩЖ и эффективного обнаружения возможных метастазов на сегодняшний день представляют особую клиническую значимость

Причины возникновения МРЩЖ и его ассоциация с мутациями протоонкогенов

Все типы клеток, присутствующие в ЩЖ, потенциально могут давать начало доброкачественным и злокачественным новообразованиям. Так, фолликулярные клетки дают начало таким видам рака, как фолликулярная карцинома, а перерождение клеток Гюртле-Ашкинази приводит к формированию онкоцитарной аденомы, способной малигнизироваться

в аденокарциному (4). В свою очередь, парафолликулярные С-клетки способны давать начало МРЩЖ, особенностям диагностики которого посвящена данная статья. Важнейшей особенностью МРЩЖ является сохранение способности С-клеток к секреции кальцитонина даже после их злокачественного перерождения (2, 5). Кроме того, в связи с тем, что С-клетки имеют нейрогенное происхождение, характерным проявлением данного типа опухолей будет также секреция ряда типичных для нейроэндокринных опухолей продуктов, таких как тромбоцитарный серотонин, раковый эмбриональный антиген антиген, катехоламины, хромогранин А и гистамины (6). Интересной особенностью МРЩЖ является также то, что в 25% случаев данный рак является наследственным заболеванием, а не спорадическим (7, 8). Наследственность этой патологии обусловлена наличием одной из нескольких возможных мутаций протоонкогена RET, возникающих точечно или в результате хромосомной реаранжировки (9, 10). Особую клиническую значимость при этом имеет тот факт, что с точки зрения медицинской генетики данная мутация является доминантной, из чего следует, что 50% потомков индивида, имевшего одну мутантную хромосому, будут иметь такую же мутацию с аналогичными последствиями. Действительно, вероятность развития МРЩЖ у таких индивидов повышается многократно, и, на основании данных статистики, людям с подобными мутациями рекомендовано полное удаление щитовидной железы в возможно более раннем возрасте, то есть так называемая радикальная тиреоидэктомия (11). С клинической точки зрения наследственные мутации в протоонкогене RET могут приводить к проявлениям в виде множественных эндокринных неоплазий типа 2А и 2В, сокращенно МЭН2А, МЭН2В, а также синдрома семейного МРЩЖ. Данные наследственные заболевания проявляются не только в виде учащенных случаев развития МРЩЖ у больных, о которых было упомянуто выше, но также и в виде новообразований в других эндокринных железах, например в надпочечниках. Важно отметить, что в рамках клинической картины МЭН2А/В, МРЩЖ

часто проявляется в виде многоочаговой опухоли, в отличие от спорадических случаев МРЩЖ, представленных преимущественно моноочаговыми новообразованиями (2). В то же время причиной спорадических случаев МРЩЖ могут быть мутации как в протоонкогене RET, так и в протоонкогенах BRAF, K-RAS и некоторых других (9,10,12). К счастью, данные мутации возникают случайно с низкой частотой, и не могут быть наследованы.

Связь медуллярного рака щитовидной железы с уровнем кальцитонина

Основной функцией парафолликулярных клеток в организме человека является синтез гормона кальцитонина. Данный гормон имеет белковую природу, и кодируется геном CALC1, расположенным на 11 хромосоме (13). Кальцитонин синтезируется внутри С-клеток в виде длинного белкового предшественника (116 аминокислотных остатков), называемого препрокальцитонином. Препрокальцитонин ферментативно расщепляется внутриклеточными ферментами-протеазами, в результате чего образуется укороченный пептид, получивший название прокальцитонин, и секретируемый клетками в межклеточное пространство щитовидной железы. Уже в межклеточном пространстве эндопептидаза производит разрезание прокальцитонина, что приводит к образованию двух коротких пептидов, одним из которых и является зрелый кальцитонин длиной в 32 аминокислотных остатка (13). Любопытно, что ген CALC1 может быть активирован не только в С-клетках, но также, например, в адипоцитах – клетках жировой ткани. Такая активация происходит в очень специфическом случае, а именно, при бактериальной инфекции, что является надежным диагностическим признаком сепсиса (14, 15). В этом случае прокальцитонин не расщепляется эндопептидазой (специфичной только для ЩЖ), и в интактном виде попадает в тканевую жидкость, лимфу и кровь.

В то же время рост опухоли, происходящей из С-клеток, сопровождается резким увеличением количества секре-

тируемого зрелого кальцитонина, так как данная функция не утрачивается переродившимися клетками. Следовательно, уровень кальцитонина в крови может служить одним из самых надежных диагностических признаков развития этого типа рака. Наряду со зрелым кальцитонином, уровень прокальцитонина также может демонстрировать рост при наличии МРЩЖ, однако в показателе специфичности этот диагностический показатель существенно уступает кальцитонину крови, и его использование для диагностики МРЩЖ не рекомендовано (16).

Симптоматика и диагностика медуллярного рака щитовидной железы

Главной функцией кальцитонина в организме человека является снижение уровня ионов кальция в крови, то есть, функционально он является антагонистом паратиреоидного гормона (17). Синтез и секреция данного гормона осуществляется парафолликулярными клетками в ответ на повышение уровня ионов кальция в плазме крови, а также в ответ на стимуляцию клеток гастрином, либо его синтетическим аналогом – пентагастрином (18). Физиологически, снижение уровня кальция достигается двумя основными путями: кальцитонин подавляет функционирование остеокластов, а также ингибирует обратное всасывание кальция и фосфата эпителиальными клетками почечных канальцев, что приводит к выводу кальция и фосфата с мочой (17). Таким образом, патологическое повышение уровня кальцитонина в крови, связанное с развитием МРЩЖ, можно первично диагностировать по внешним, легко заметным признакам. К таким признакам относятся диарея и эпизоды резкого покраснения кожного покрова вследствие расширения кровеносных сосудов, а также снижение массы тела. Кроме того, формирование уплотнений в щитовидной железе, даже при малых размерах, способны вызывать ощущения, легко обнаруживаемые самим больным. Например, на сравнительно ранних стадиях рака индивидуум способен ощущать затруднение в глотании и дыхании, а также в ряде случаев самостоятельно пальпировать новообразования. Однако такая картина характерна на очень ранних стадиях заболевания. На более поздних стадиях быстро растущая опухоль часто проникает через соединительнотканную капсулу ЩЖ, и зачастую

вторгается в зону голосовых связок, что приводит к их деформации и заметным изменениям в тембре голоса (2).

К сожалению, уже на относительно ранних стадиях МРЩЖ склонен к активному метастазированию (2,7,8). Это связано преимущественно с гистологическими особенностями самой опухоли, а также с наличием развитой сети отводящих лимфатических сосудов, соединяющих щитовидную железу непосредственно с ближайшими шейными лимфатическими узлами. По этой причине, как правило, именно в лимфатических узлах шейного отдела обнаруживаются первые метастазы (2,7,8). Кроме того, довольно часто наблюдается метастазирование опухоли в лимфоузлы среднестенной грудной клетки, печень и кости, что является особенно опасным свойством данной опухоли, существенно ухудшающим прогноз выживаемости. Следствием такой высокой склонности МРЩЖ к метастазированию является то, что при первичном обнаружении данного вида рака у человека будут с вероятностью 70% иметься метастазы в ближайших лимфоузлах. Такие особенности заболевания диктуют достаточно радикальные способы борьбы с ним: при обнаружении МРЩЖ как правило предписывается удаление всей ЩЖ, зачастую параллельно с резекцией или полным удалением окружающих лимфатических узлов шеи. Паращитовидные железы, в случае, если их не затронуло опухолеобразование, отделяются от ЩЖ хирургически, после чего подлежат автоимплантации в район предплечья (2). Естественно, что после такой операции пациент пожизненно подлежит терапии гормонами ЩЖ, что, в свою очередь негативно сказывается на качестве жизни.

Применение теста на кальцитонин в диагностике МРЩЖ

При обнаружении в ЩЖ пальпируемого узелка или множественных узлов, пациент направляется на УЗИ ЩЖ и на взятие биоптата из каждого выявленного узелка аспирационным способом при помощи тонкой иглы (7,8). Исследование биоптата позволяет сделать достаточно точный вывод о природе ткани узла, и в большинстве случаев отделить случаи злокачественных новообразований от доброкачественных, а также определить степень дифференцированности клеток опухоли и их исходный тип (19).

Как уже упоминалось выше, даже после перерождения в раковые клетки, С-медуллярные клетки ЩЖ, как правило, сохраняют способность секретировать кальцитонин. По этой причине при иммуногистохимической окраске антителами к кальцитонину клетки МРЩЖ дают интенсивную и равномерную окраску. Эта отличительная черта, наравне с особенностями внешнего вида клеток, позволяет определить МРЩЖ в биоптате (21). Кроме того, естественным следствием способности малигнизированных С-клеток секретировать кальцитонин является повышение уровня кальцитонина в плазме крови подавляющего большинства людей с МРЩЖ. На этом обстоятельстве основан один из наиболее эффективных (т.е. чувствительных и специфичных) современных способов диагностики и скрининга МРЩЖ – иммунологическое определение базального уровня кальцитонина (БКТ) в сыворотке или плазме крови пациента. Данный способ диагностики основан на предположении, что увеличение массы С-клеток в организме приведет к пропорциональному увеличению концентрации кальцитонина в крови пациента (5). Концентрация БКТ определяется путем специфической реакции с антителами к КТ, и данный принцип лежит в основе всех распространенных на сегодняшний день методов определения уровня этого маркера в крови. На данный момент применяется метод радиоиммунологического анализа (например, Beckman Coulter, Cisbio International) и технологии ИФА (Beckman Coulter, Biomerica и др.). Также в современных автоматизированных анализаторах различных производителей используются технологии иммунохемилюминесценции (Siemens) и иммуноэлектрохемилюминесценции (Roche Diagnostics). Указанные методы обеспечивают высокую чувствительность определения уровня БКТ в образце крови, что достигается использованием высокоафинных антител, и высокую специфичность, достигаемую с помощью сэндвич-принципа.

Однако диагностика МРЩЖ с помощью уровня БКТ осложняется тем, что наряду с МРЩЖ с повышением уровня КТ сопряжены такие заболевания, как многоузловой зоб и С-клеточная гиперплазия (СКГ). Данные патологии не являются злокачественными, хотя и потенциально способны к малигнизации. По этой причине в ряде работ была принята попытка установить референс-

ные границы также для данного типа заболеваний, чтобы облегчить процесс дифференциальной диагностики МРЩЖ (23-26). К сожалению, полученные в этих исследованиях данные достаточно плохо согласуются между собой, что не позволяет выбрать конкретные значения для диагностирования МРЩЖ, СКГ и многоузлового зоба.

Кроме того, слабой стороной метода диагностики МРЩЖ с помощью уровня БКТ является то, что опухолевые клетки данного типа рака продуцируют КТ только при достаточной степени дифференцировки (27). По мере развития заболевания может происходить дедифференцировка опухолевых клеток. В результате этого клетки такой опухоли постепенно начинают терять способность к продукции КТ, однако не теряют способности секретировать другой онкомаркер – раковый эмбриональный антиген (РЭА). Этот маркер менее специфичен и встречается в ряде других типов опухолей, поэтому его использование для диагностики и мониторинга МРЩЖ не рекомендуется проводить без комплексной оценки состояния больного, истории болезни и наследственности. В редчайших случаях, т.е. приблизительно в 1% всех случаев МРЩЖ, по не вполне выясненным причинам опухолевые клетки перестают секретировать детектируемые уровни кальцитонина, хотя гистохимически биоптаты интенсивно окрашиваются по данному пептиду. Вероятно, это связано с дефектами посттрансляционной модификации, что приводит к образованию незрелых пептидов, в основном прокальцитонина (27). В таких случаях повышенный уровень прокальцитонина может служить достаточно надежным маркером развития МРЩЖ. Любопытно, что уровень прокальцитонина с пограничным значением в 1,6 нг/мл может служить удобным и специфичным критерием для определения МРЩЖ – более специфичным и чувствительным, чем СЕА (28). Кроме того, повышенное соотношение прокальцитонина к БКТ может служить диагностическим критерием агрессивности МРЩЖ (29). В отдельных случаях у пациентов, подвергшихся тиреоидэктомии, даже при отсутствии клинических признаков рекуррентного МРЩЖ обнаруживается повышенный уровень БКТ. Согласно последним исследованиям, это явление связано с наличием реакции анти-КТ антител с крупным (>300 кДа) белковым комплексом, получив-

Табл. 1. Связь уровня БКТ с медианным диаметром опухоли и вероятностью наличия метастазов при обнаружении. По данным Cohen et al., 2000 (5).

Уровень БКТ (пкг/мл)	Медианный диаметр опухоли	Вероятность наличия метастазов
>1000	25.0 мм	10,50%
<1000	7.0 мм	3,30%
<100	3.0 мм	Нет данных
>100	20.0 мм	Нет данных

шим название макрокальцитонин (30). Природа этого комплекса не выяснена на сегодняшний день, однако очевидна клиническая значимость данного взаимодействия, наблюдающегося при иммунологическом определении КТ: решение феномена макро-КТ позволит в будущем существенно улучшить специфичность теста на БКТ.

Кроме диагностического применения, уровень КТ может быть использован в прогностических целях. Установлено, что уровень КТ менее 50 пкг/мл соответствует постоперативной нормализации в 97,8% случаев, в то время как уровень БКТ более 50 пкг/мл соответствует нормализации лишь в 40,7% случаев (5). Также была выявлена зависимость между уровнем БКТ, размером опухоли и вероятностью наличия метастазов (см. Табл.1) Таким образом, уровень БКТ равный 50 пкг/мл является пограничным значением для прогнозирования излечения пациента после радикальной тиреоидэктомии. В национальных клинических рекомендациях РФ (31, 33) указывается пороговое преоперативное значение КТ в 300 пг/мл соответствующее 50% вероятности излечения и 3000 пкг/мл, означающее лишь 10% вероятность излечения. Также на основании дооперационного уровня кальцитонина можно приблизительно оценить средние размеры опухоли (табл.1), обнаруживающие прямую корреляцию с вероятностью наличия метастазов и степенью их распространения (11, 32).

Также на основании динамики послеоперационного уровня БКТ можно сделать выводы о выживаемости конкретно-

го пациента (33). Для этого производится измерение уровня БКТ в течение определенного периода после операции в случаях, когда уровень БКТ не упал ниже порога чувствительности теста. В этих случаях предполагается отсутствие полной биохимической ремиссии, и вероятная продолжительность жизни пациента может быть рассчитана на основании среднего времени удвоения уровня БКТ (Табл.2).

Как уже было упомянуто, при обнаружении МРЩЖ вся щитовидная железа подлежит удалению, а также подлежат резекции или удалению лимфатические узлы, расположенные в непосредственной близости от ЩЖ (2,11). При этом после успешного и полного удаления опухоли в течение 2-3 месяцев уровень кальцитонина постепенно снижается вплоть до нулевого уровня, практически не доступного для детекции иммунологическими методами. Подобная клиническая картина описывается как биохимическая ремиссия. Однако, если опухоль успела образовать метастазы до момента ее удаления, то эти метастазы могут быть трудны для обнаружения на ранних этапах их роста. По причине малых размеров, количество продуцируемого такими метастазами кальцитонина не будет достаточным для детекции стандартным иммунологическим методом (23,24,34). Поэтому для увеличения чувствительности анализа в клинической практике принято прибегать к следующему приему: в кровь пациента внутривенно вводятся специфические стимуляторы секреции кальцитонина (т.н. секретагоги). К ним относятся пентагастрин, ионы

Табл.2 Данные о зависимости прогноза 5 и 10-летней выживаемости пациента с МРЩЖ от времени удвоения показателя БКТ (по данным Национальных клинических рекомендаций РФ по лечению и диагностике МРЩЖ (33))

Время удвоения БКТ	Выживаемость	
	5 лет	10 лет
<6 мес	25%	8%
6 мес - 2 года	92%	37%
>2 лет	100%	100%

кальция, омепразол или другие вещества, способные временно резко усиливать выброс кальцитонина С-клетками, причем наиболее часто используемыми секреторагами являются пентагастрин и глюконат кальция. При введении секретораго происходит быстрый (несколько минут с момента инфузии) и высокий по амплитуде (несколько порядков от исходного значения) всплеск секреции КТ, благодаря чему даже кальцитониновый сигнал от небольшого метастаза становится детектируемым. Такой усиленный показатель называют стимулированным кальцитонином (сКТ) в противовес базальному кальцитонину (бКТ), измеряемому без стимуляции.

Измерение сКТ входит в рекомендацию по ведению пациентов, перенесших лечебную или профилактическую тиреоэктомию (7,8), причем уровень сКТ предписывается измерять периодически в целях своевременного предупреждения рецидива рака. Данная рекомендация основывается на статистических данных, согласно которым МРЩЖ имеет тенденцию к рецидивности в 10% случаев. Таким образом, благодаря мониторингу возобновления МРЩЖ с помощью измерения сКТ, становится возможным отслеживать и вовремя начинать лечение метастазов. В дополнение к стандартному протоколу взятия крови из вены, также практикуется локализованное взятие крови вблизи различных органов путем катетеризации крупных местных кровеносных сосудов (7,8). Таким образом, достигается более точная оценка возможного наличия метастаза в той или иной части тела, после чего метастаз по мере роста может быть выявлен такими методами визуализации, как МРТ, ПЭТ, КТ и рентгенографией.

Несмотря на интенсивные исследования кальцитонина, в качестве онкомаркера МРЩЖ, на сегодняшний день в международной медицинской и научной литературе не существует консенсуса по референсным интервалам, позволяющим диагностировать МРЩЖ (34). Связана данная неопределенность, по всей видимости, с целым рядом обстоятельств. Во-первых, МРЩЖ является достаточно редким заболеванием, что негативно сказывается на размерах выборок при исследованиях, что, в свою очередь, приводит к существенному разбросу в данных. Во-вторых, в различных исследованиях используются различающиеся методы определения КТ, что также

Табл.3 Сводная таблица предлагаемых пограничных (cut-off) значений уровней бКТ и сКТ, позволяющих отделить случаи МРЩЖ от нормы и сКТ, а также отделить здоровых индивидов от пациентов, имеющих МРЩЖ или сКТ.

Источник	Пол	норма/не норма		МРЩЖ/не МРЩЖ	
		бКТ (пкг/мл)	сКТ (пкг/мл)	бКТ (пкг/мл)	сКТ (пкг/мл)
Colombo et al., 2012 (23)	жен	>2	>32,6	>18,7	>184
	муж	>4,6	>192	>68	>1620
Allelein et al., 2017 (35)	жен	Нет данных	Нет данных	>35	Нет данных
	муж	Нет данных	Нет данных	>46	Нет данных
Mian et al., 2014 (24)	жен	>10	>26	>55	>79
	муж	>8	>68	>192	>544
Kwon et al., 2015 (37)	муж/ жен*	Нет данных	Нет данных	>65	Нет данных
Costante et al., 2006 (36)	муж/ жен	>10-20	Нет данных	>100	>1000
Giovannella et al., 2012 (25)	жен	>5.2	>78.5	Нет данных	Нет данных
	муж	>7.8	>102	Нет данных	Нет данных

*Доля пациентов мужского пола составляла 29%.

не может не сказываться на результатах расчетов. К этому следует прибавить и существенно различающиеся протоколы стимуляции выработки КТ при исследовании уровня сКТ (34). В том числе, использование различных секреторагов дает данные по референсным границам нормы и патологии для сКТ трудными для сравнения. Для наглядной демонстрации степени разброса в экспериментальных референсных интервалах в таблице 3 собраны данные нескольких исследований, посвященных данному вопросу (23-26,33-37).

Как нетрудно заметить, различия между соответствующими границами референсных интервалов весьма существенно варьируются в зависимости от источника. По этой причине Американская тиреоидологическая ассоциация рекомендует каждой отдельно взятой клинико-диагностической лаборатории рассчитывать данные референсные интервалы самостоятельно, на основании значений, характерных для конкретной популяции (7,8). В национальных клинических рекомендациях РФ по диагностике и лечению МРЩЖ все же отражены некоторые пороговые значения, влияющие на принятие решения о назначении того или иного типа лечения и на прогноз (31,33). Так, для мужчин верхней границей нормы бКТ считается 10-15

пкг/мл, уровень значений 15-100 нкг/мл указывает на необходимость проведения исследования сКТ, уровень >150 пкг/мл указывает на высокую вероятность наличия МРЩЖ, а показатель бКТ >400 пкг/мл дает также основания подозревать наличие региональных метастазов МРЩЖ.

Закключение:

Ведущие мировые экспертные организации, такие как Американская тиреоидологическая ассоциация (ATA) и Европейская тиреоидной ассоциации (ETA) не имеют консенсуса по вопросу о необходимости рутинного использования какого-либо из вариантов исследования уровня кальцитонина в крови (8,38). Действительно, рутинное использование данного исследования представляется сомнительным в своей целесообразности, в силу достаточно низкой встречаемости МРЩЖ и трудностями с установлением четких референсных интервалов значений нормы и патологии. В то же время, ни в одной из клинических рекомендаций, опубликованных данными организациями, не подвергается сомнению целесообразность использования данного теста при оценке рисков у пациентов с наследственными мутациями RET и при исследовании пациентов с обнару-

женными узлами в ЩЖ. Таким образом, тест на уровень кальцитонина в крови все еще является актуальным и востребованным методом диагностики МРЩЖ, прогнозирования его постоперационного течения и оценки выживаемости. Также данный тест в паре с процедурой стиму-

ляции выработки КТ является надежным постоперативным средством выявления наличия малых метастазов, не обнаруживаемых другими доступными методами, и позволяет быстро оценивать степень биохимической ремиссии.

Автор статьи:

Путляев Е.В., к.б.н.

Специалист по обучению клиентов
ООО "Рош Диагностика Рус"

Литература

1. La Vecchia, C., Malvezzi, M., Bosetti, C., Garavello, W., Bertuccio, P., Levi, F. and Negri, E., 2015. Thyroid cancer mortality and incidence: a global overview. *International journal of cancer*, 136(9), pp.2187-2195.
2. Sippel, R.S., Kunnimalaiyaan, M. and Chen, H., 2008. Current management of medullary thyroid cancer. *The oncologist*, 13(5), pp.539-547.
3. Lebouilleux, S., Baudin, E., Travagli, J.P. and Schlumberger, M., 2004. Medullary thyroid carcinoma. *Clinical endocrinology*, 61(3), pp.299-310.
4. Yutan, E. and Clark, O.H., 2001. Hürthle cell carcinoma. *Current treatment options in oncology*, 2(4), pp.331-335.
5. Cohen, R., Campos, J.M., Salaün, C., Massoud Heshmati, H., Kraimps, J.L., Proye, C., Sarfati, E., Henry, J.F., Niccoli-Sire, P., Modigliani, E. and Groupe D'Etude Des Tumeurs À Calcitonine (GETC), 2000. Preoperative calcitonin levels are predictive of tumor size and postoperative calcitonin normalization in medullary thyroid carcinoma. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85(2), pp.919-919.
6. Groot, J.W.B.D., Kema, I.P., Breukelman, H., Veer, E.V.D., Wiggers, T., Plukker, J.T., Wolffenbuttel, B.H. and Links, T.P., 2006. Biochemical markers in the follow-up of medullary thyroid cancer. *Thyroid*, 16(11), pp.1163-1170.
7. Kloos, R.T., Eng, C., Evans, D.B., Francis, G.L., Gagel, R.F., Gharib, H., Moley, J.F., Pacini, F., Ringel, M.D., Schlumberger, M. and Wells Jr, S.A., 2009. Medullary thyroid cancer: management guidelines of the American Thyroid Association. *Thyroid*, 19(6), pp.565-612.
8. Wells Jr, S.A., Asa, S.L., Dralle, H., Elisei, R., Evans, D.B., Gagel, R.F., Lee, N., Machens, A., Moley, J.F., Pacini, F. and Raue, F., 2015. Revised American Thyroid Association guidelines for the management of medullary thyroid carcinoma: the American Thyroid Association Guidelines Task Force on medullary thyroid carcinoma. *Thyroid*, 25(6), pp.567-610.
9. Castellone, M.D. and Melillo, R.M., 2018. RET-mediated modulation of tumor microenvironment and immune response in multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN2). *Endocrine-related cancer*, 25(2), pp.T105-T119.
10. Santoro, M. and Carlomagno, F., 2013. Central role of RET in thyroid cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(12), p.a009233.
11. C. Scollo, E. Baudin, J. P Travagli et al., "Rationale for central and bilateral lymph node dissection in sporadic and hereditary medullary thyroid cancer," *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 88, no. 5, pp. 2070-2075, 2003.
12. Goutas, N., Vlachodimitropoulos, D., Bouka, M., Lazaris, A.C., Nasioulas, G. and Gazouli, M., 2008. BRAF and K-RAS mutation in a Greek papillary and medullary thyroid carcinoma cohort. *Anticancer research*, 28(1A), pp.305-308.
13. Becker, Kenneth L., et al. "Calcitonin gene family of peptides: structure, molecular biology, and effects." *Principles of Bone Biology (Second Edition)*. 2002. 619-639.
14. Vijayan, A.L., Ravindran, S., Saikant, R., Lakshmi, S. and Kartik, R., 2017. Procalcitonin: a promising diagnostic marker for sepsis and antibiotic therapy. *Journal of intensive care*, 5(1), p.51.
15. Assicot, M., Bohuon, C., Gendrel, D., Raymond, J., Carsin, H., & Guilbaud, J. (1993). High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *The Lancet*, 341(8844), 515-518.
16. Woliński, Kosma, Jarosław Kaznowski, Aleksandra Klimowicz, Adam Maciejewski, Dagny Łapińska-Cwojdzńska, Edyta Gurgul, Adrian D. Car et al. "Diagnostic value of selected biochemical markers in the detection of recurrence of medullary thyroid cancer—comparison of calcitonin, procalcitonin, chromogranin A, and carcinoembryonic antigen." *Endokrynologia Polska* 68, no. 4 (2017): 434-437.
17. Boron WF, Boulpaep EL (2004). "Endocrine system chapter". *Medical Physiology: A Cellular And Molecular Approach*. Elsevier/Saunders.
18. L'Volsi, V. A. (1997). C cell hyperplasia/neoplasia. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 82(1), 39-41.
19. Cooper CW, Schwesinger WH, Mahgoub AM, Ontjes DA. Thyrocalcitonin: stimulation of secretion by pentagastrin. *Science*. 1971;172:1238-1240.
20. Schneider, D.F. and Chen, H., 2013. New developments in the diagnosis and treatment of thyroid cancer. *CA: a cancer journal for clinicians*, 63(6), pp.373-394.
21. Pacini, F., Basolo, F., Elisei, R., Fugazzola, L., Cola, A., & Pinchera, A. (1991). Medullary thyroid cancer: an immunohistochemical and humoral study using six separate antigens. *American journal of clinical pathology*, 95(3), 300-308.
22. d'Herbomez, M., Caron, P., Bauters, C. et al. (2007) Referencerange of serum calcitonin levels in humans: influence of calcitonin assays, sex, age, and cigarette smoking. *European Journal of Endocrinology*, 157, 749-755.
23. Colombo, C., Verga, U., Mian, C., Ferrero, S., Perrino, M., Vicentini, L., Dazzi, D., Opocher, G., Pelizzo, M.R., Beck-Peccoz, P. and Fugazzola, L., 2012. Comparison of calcium and pentagastrin tests for the diagnosis and follow-up of medullary thyroid cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 97(3), pp.905-913.
24. Mian, C., Perrino, M., Colombo, C., Cavedon, E., Pennelli, G., Ferrero, S., De Leo, S., Sarais, C., Cacciatore, C., Manfredi, G.I. and Verga, U., 2014. Refining calcium test for the diagnosis of medullary thyroid cancer: cutoffs, procedures, and safety. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 99(5), pp.1656-1664.
25. Giovannelli, L. 2012. Serum procalcitonin and calcitonin normal values before and after calcium gluconate infusion. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, 120(3), p.169.
26. Machens, A., Hoffmann, F., Sekulla, C. and Dralle, H., 2009. Importance of gender-specific calcitonin thresholds in screening for occult sporadic medullary thyroid cancer. *Endocrine-related cancer*, 16(4), pp.1291-1298.
27. Brutsaert, E.F., Gersten, A.J., Tassler, A.B. and Surks, M.I., 2015. Medullary thyroid cancer with undetectable serum calcitonin. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 100(2), pp.337-341.
28. Algaciras-Schimmich, A., Preissner, C.M., Theobald, J.P., Finseth, M.S. and Grebe, S.K., 2009. Procalcitonin: a marker for the diagnosis and follow-up of patients with medullary thyroid carcinoma. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 94(3), pp.861-868.
29. Walter MA, Meier C, Radimerski T, et al. . Procalcitonin levels predict clinical course and progression-free survival in patients with medullary thyroid cancer. *Cancer* . 2010;116:31-40.
30. Alves, Thalita G., Teresa S. Kasamatsu, Ji H. Yang, Maria Cecília Z. Meneghetti, Aline Mendes, Ilda S. Kuni, Susan C. Lindsey et al. "Macrocalcitonin is a novel pitfall in the routine of serum calcitonin immunoassay." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 101, no. 2 (2016): 653-658.
31. Bel'tsevizh, D. G., Vanushko, V. E., Mel'nichenko, G. A. E., Mudunov, A. M., Rumyantsev, P. O., & Sleptsov, I. Y. V. E. (2015). Russian clinical practice guidelines for diagnosis and treatment of differentiated thyroid cancer. *Endocrine Surgery*, 9(3), 7-14.
32. Yip, D.T., Hassan, M., Pazaitou-Panayiotou, K., Ruan, D.T., Gawande, A.A., Gaz, R.D., Moore Jr, F.D., Hodin, R.A., Stephen, A.E., Sadow, P.M. and Daniels, G.H., 2011. Preoperative basal calcitonin and tumor stage correlate with postoperative calcitonin normalization in patients undergoing initial surgical management of medullary thyroid carcinoma. *Surgery*, 150(6), pp.1168-1177.
33. Алиева, С. Б., Алымов, Ю. В., Мудунов, А. М., Подвязников, С. О., & Кропотов, М. А. (2014). Клинические рекомендации по диагностике и лечению рака щитовидной железы.
34. Fugazzola, L., 2013. Stimulated calcitonin cut-offs by different tests. *European thyroid journal*, 2(1), pp.49-56.
35. Allelein, S., Ehlers, M., Morneau, C., Schwartz, K., Goretzki, P.E., Seppel, T., Feldkamp, J., Krieg, A., Knoefel, W.T., Kuebart, A. and Haase, M., 2018. Measurement of basal serum calcitonin for the diagnosis of medullary thyroid cancer. *Hormone and Metabolic Research*, 50(01), pp.23-28.
36. Costante, G., Meringolo, D., Durante, C., Bianchi, D., Nocera, M., Tumino, S., Crocetti, U., Attard, M., Maranghi, M., Torlontano, M. and Filetti, S., 2006. Predictive value of serum calcitonin levels for preoperative diagnosis of medullary thyroid carcinoma in a cohort of 5817 consecutive patients with thyroid nodules. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92(2), pp.450-455.
37. Kwon, H., Kim, W.G., Choi, Y.M., Jang, E.K., Jeon, M.J., Song, D.E., Baek, J.H., Ryu, J.S., Hong, S.J., Kim, T.Y. and Kim, W.B., 2015. A cutoff value of basal serum calcitonin for detecting macroscopic medullary thyroid carcinoma. *Clinical endocrinology*, 82(4), pp.598-603.
38. Pacini F, Schlumberger M, Dralle H, Elisei R, Smit JW, Wiersinga W; European Thyroid Cancer Taskforce: European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium. *Eur J Endocrinol* 2006; 154: 787-803

Тесты Рош - высокое качество и стандартизация

В настоящее время существует множество лабораторных методов, реализованных на различных аналитических платформах, позволяющих измерять количество и оценивать свойства многих сотен диагностически значимых аналитов человеческого организма. Результаты лабораторных измерений играют важную роль в диагностике состояния пациента и определении характера его лечения. Но как обеспечить надежность и достоверность результатов измерений, выполняемых на разных системах с использованием широкого спектра аналитических технологий?

Пациенты и медицинские работники предполагают, что клинические анализы, выполненные в разных лабораториях в разное время для одного и того же образца можно сравнить и однозначно надежно интерпретировать. Однако практика показывает, что данное предположение не всегда реализуется и результаты тестов могут значительно различаться.

Для решения этой проблемы, которую усугубляют разнообразие химических и биологических свойств самих аналитов и особенности аналитических технологий, предлагаемых для их обнаружения и измерения, были предложены решения, основанные на применении метрологической прослеживаемости от практических лабораторных результатов до эталонов или методик измерения наиболее высокого порядка. Для обеспечения достоверности результатов исследований, выполняемых в клинично-диагностических лабораториях, большинство методик измерения были стандартизированы и гармонизированы. Процессы гармонизации и стандартизации направлены на достижение сопоставимости результатов – т.е. при использовании различных методов измерений должны быть получены одни и те же количественные данные. Калибровка всех методов измерения должна быть прослеживаема вплоть до общепринятой эталонной системы, представленной эталонным методом или эталонным материалом. Выполнение этих требований принято называть «установление метрологической прослеживаемости». Метрологическая прослеживаемость определяется Международной организацией по стандартизации

как «свойство результата измерения или значения эталона, заключающееся в возможности установления его связи с соответствующими эталонами, обычно международными или национальными, посредством непрерывной цепи сличений, имеющих установленные неопределенности» [1].

История развития стандартизации методов измерения

Международная организация по стандартизации (International Organization for Standardization, ISO) является крупнейшим фондом по разработке международных стандартов [2]. Так, в далеком 1946 году в Лондоне собралось 65 делегатов из 25 стран, чтобы обсудить будущее международной стандартизации (рис.1). В итоге, в 1947 году была основана ISO, на основе двух организаций: ISA (International Federation of the National Standardizing Associations), учрежденной в Нью-Йорке в 1926 году (расформирована в 1942) и UNSCC (United Nations Standards Coordinating Committee), учрежденной в 1944 году. Затем с 1950 года данная организация стала публиковать разработанные новые стандарты, которые относились к разным сферам индустрии. В 1960 году ISO опубликовала статью, посвященную созданию международной системы единиц измерения (СИ). В 1975 году был создан Комитет Совета ISO по референтным материалам (ISOREMCO) для установления определения и классификации стандартных об-

разцов, подготовки протоколов для изготовления и предоставления информации о стандартных образцах [3]. Таким образом, было установлено само понятие стандартный образец (reference material, RM) и аттестованный стандартный образец (certified reference material, CRM).

Впоследствии американская организация – American Type Culture Collection (ATCC), чьей миссией является сбор, хранение и распространение эталонных штаммов микроорганизмов, клеточных линий и других материалов для исследований и разработок, создала базу CRM, которые являются однородными и стабильными материалами в отношении к одному или нескольким указанным свойствам [4]. Таким образом, аттестованный стандартный образец – это метрологический инструмент для обеспечения надежности и сопоставимости результатов измерений во всем мире. Аттестованный стандартный образец в основном используется для сравнения различных методов измерения, чтобы установить чувствительность, линейность и специфичность во время разработки или валидации метода анализа, а также при проведении аналитических процедур калибровки в аккредитованных лабораториях. Согласно ГОСТ ISO 17511 – 2011, аттестованный стандартный образец – это референсный материал, сопровождаемый сертификатом, одно или несколько значений свойств которого установлены при аттестации по методике, обеспечивающей метрологическую прослеживаемость единицы размера



Рисунок 1. Основатели ISO, 1946 Лондон (источник - <https://www.iso.org/about-us.html>).

свойства, а каждое аттестованное значение сопровождается значением неопределенности с заданной доверительной вероятностью [1].

Важным регулирующим документом для лабораторной медицины является Директива европейского парламента и совета Европы 98/79/ЕС по медицинским средствам диагностики *in vitro* (Директива IVDD) [5]. Настоящая Директива должна применяться к медицинским средствам диагностики *in vitro* и принадлежностям к ним. Другая организация – Национальный институт науки и технологий США (NIST), ввела такое понятие как сертифицированный стандартный образец (standard reference material, SRM) с хорошо охарактеризованным составом и свойствами, который используется для калибровки приборов и является частью программы обеспечения качества [6]. Таким образом, стандартные образцы SRM и CRM являются материалами с указанными метрологическими свойствами и могут использоваться в качестве калибраторов (для количественной оценки результата измерения по сигналу, получаемому с аналитического прибора) и для проверки процедуры (то есть для доказательства того, что результаты измерений являются надежными). В обоих случаях SRM и CRM рассматриваются как эталоны измерения. Еще одна из важных вех развития стандартизации является стандарт ISO/IEC 17025, который является международным эталоном для испытательных и калибровочных лабораторий, желающих продемонстрировать надежность получаемых результатов измерения. Первый такой стандарт был опубликован в 2005 году, но за последние годы технологии и потребности лабораторий сильно изменились, поэтому в конце 2017 года была опубликована новая версия стандарта ISO/IEC 17025 – 2017 Международной организацией по стандартизации (ISO) и Международной электротехнической комиссией (IEC) [7].

В результате, за последние два десятилетия некоторые клинические лабораторные тесты были стандартизированы путем разработки контрольных систем измерения. Всемирно известная организация – Международная федерация клинической химии и лабораторной медицины (IFCC) играет важную роль в этом проекте. В 2005 году организацией IFCC была создана рабочая группа – Комитет референтных интервалов и уровней принятия решений (Committee on Reference

Intervals and Limits decision) по “стандартизации”, т.е. создание референтных материалов, референтных измерительных процедур, референтных измерительных лабораторий, а также референтных интервалов [8].

Стандартизация тестов Рош

Диагностические тесты представляют собой сложные измерительные системы, которые позволяют определить целевую концентрацию аналита при различных условиях измерения, и зависят не только от лота калибратора, лота реагента, системных реагентов, но и таких факторов как оператор и лаборатория, которые безусловно влияют на качество исследования. Для подтверждения эффективности системы, при производстве реагентов проводят стандартизацию, которая достигается за счет установления истинной калибровочной зависимости для всех компонентов системы. И это гарантирует, что изготовленная тест-система дает результаты измерения такие же, как и выбранный эталон: международный референтный материал или референтный метод.

В настоящее время в нашей стране пока еще нет реальной структурированной референтной системы для клинико-диагностических лабораторных исследований: отсутствуют эталоны для подавляющего большинства применяемых исследований клинически важных аналитов и нет признанных референтных методик, не создана сеть референтных лабораторий [9]. В связи с этим у операторов, работающих на биохимических и иммунохимических анализаторов разных производителей, порой возникают вопросы, например, с корректностью измерения или интерпретацией результатов.

В инструкциях к тестам Рош в разделе “Калибровка” описано относительно чего была стандартизирована тест-система, например: IFCC, CRM, SRM или указан референтный метод. Так, в инструкциях к некоторым тестам клинической химии можно найти информацию, например, что материал был стандартизирован относительно CRM 470, который был разработан в 1993 году и является сертифицированным референтным материалом для 14 сывороточных белков [10]. Сывороточная матрица, использованная для приготовления этого референтного материала, содержала белки со схожими физическими свойствами от-

носительно свежей сыворотки крови, которые не деградировали при долгосрочном хранении. CRM 470 включает в себя следующие белки: альбумин, альфа-1 кислый гликопротеин, альфа-1 антихитрипсин, альфа-1-антитрипсин, альфа-2-макроглобулин, церулоплазмин, С3, С4, С-реактивный белок, гаптоглобин, иммуноглобулины А, G, М, трансферрин, транстретин. В статье J.T. Whicher описан процесс создания референтного материала CRM 470, его состав и методика расчета целевых значений и доверительных интервалов [11]. Интересно, что тот же самый процесс используется при создании специфического сывороточного материала, относительно которого проводят испытания при сравнении методов измерения. Давайте рассмотрим два примера стандартизации относительно референтного материала или метода, которые применяются в компании Рош.

В случае сравнения калибратора со стандартным образцом

Если существует стандартный образец, в состав которого входит человеческая сыворотка или матрица (например, как в CRM 470 или другом сравниваемом стандарте), то он может использоваться для сравнения с калибратором производителя. В таком случае проводятся параллельные измерения огромного количества индивидуальных сывороток с концентрацией аналита или активностью, входящих в состав измерительного диапазона, на тестируемых системах. При этом на системах используется один и тот же реагент после калибровки с референтным материалом и после калибровки изучаемого калибратора, например C.f.a.s. Protein. Таким образом, используются два анализатора для измерения аналитов с использованием одних и тех же проб. Далее все результаты представляются в виде модели линейной регрессии: $y = ax + b$, где x – значения, полученные после калибровки референтным материалом, y – значения, полученные после калибровки изучаемого калибратора, a – угол наклона, b – смещение. И предварительные целевые значения для испытуемого калибратора могут быть установлены, когда результаты измерений укладываются в $y = x$, и значение b при этом ничтожно мало и стремится к нулю [12].

В случае сравнения методов

Если существует референтный метод сравнения, т.е. независимый от состава матрикса изучаемого образца, рефе-

рентные значения могут быть рассчитаны в результате исследования человеческой сыворотки. Однако, невозможно анализировать человеческую сыворотку, используя референтный метод, такой, например, как масс-спектрометрия с изотопным разведением, в параллели, например, с Hitachi системой, поскольку не представляется возможным выполнять оба метода одновременно. Кроме того, невозможно собрать у одного донора большое количество проб, которое требуется для проведения испытания. В связи с рядом ограничений, в качестве тестируемого образца собирается пул сывороток с различной концентрацией и активностью аналита. От 5 до 10 объединенных сывороток фильтруют и смешивают, чтобы получить однородный материал. Далее этот материал аликвотируется по 1 мл и хранится при температуре -70°C . (Рис.2) Затем каждая аликвота используется для последующих испытаний: для определения значений референтным методом, который представлен DGKC (German Society for Clinical Chemistry) и для сравнения с установленными целевыми значениями, полученными в результате процедуры назначения целевого значения – Target Value Assignment. Далее полученные результаты используются для уравнения $y=ax+b$, и должны соответствовать $y=x$ как и в случае сравнения калибратора [12].

Понятие “стандартизация” активно используется, когда говорят о гликемическом контроле. В 1968 году впервые описываются свойства гликолизированного

гемоглобина, который с 1976 года используется для определения содержания гликогемоглобина, чтобы контролировать уровень глюкозы у больных сахарным диабетом [13, 14]. А в 1985 Всемирная организация здравоохранения сделала доклад, в котором рекомендовала использовать HbA1c для практической оценки долгосрочного гликемического контроля в крови за последние 2-3 месяца у пациентов с сахарным диабетом, и в дальнейшем было разработано множество лабораторных методов, позволяющих определять HbA1c. Разнообразие методов предполагает возникновение дискуссий по поводу преимуществ или недостатков того или иного метода. Поскольку не было согласованного на международном уровне эталонного метода, рабочая группа IFCC по стандартизации HbA1c разработала и утвердила референтный метод определения HbA1c. Таковыми стали высокоэффективная жидкостная хроматография и капиллярный электрофорез. Далее команда IFCC разработала первичный референтный материал высокоочищенного гликогемоглобина, относительно которого были проведены сравнительные исследования других методов и стандартов, в том числе NGSP (Национальная программа по стандартизации гликогемоглобина). Установленная между двумя системами измерений взаимосвязь была проверена многочисленными исследованиями и утверждена документально [15, 16].

Так как абсолютные значения NGSP больше значений IFCC всего на 1,5–2 единицы, то одновременное существо-

вание двух близких систем оценки вызывает трудности и может явиться предпосылкой к ошибочному истолкованию результатов клиницистами и пациентами. Поэтому следующим этапом работы по стандартизации исследования гликированного гемоглобина стала выработка в октябре 2007 года совместного решения IFCC, с одной стороны, и EASD (Европейская ассоциация по изучению диабета – European Association for the Study of Diabetes), с другой, о единицах измерения и соотношении между ними. Было принято решение, что при использовании оборудования, стандартизованного в соответствии с требованиями IFCC или диагностических систем, аттестованных с использованием соответствующего стандартного образца, содержание гликогемоглобина должно выражаться в единицах IFCC (ммоль HbA1c/моль Hb), и в производных единицах NGSP (%). Биохимические анализаторы компании Рош позволяют измерять уровень гликированного гемоглобина как в IFCC, так и NGSP единицах.

Однако все еще существует ряд тестов, которые не имеют ни референтного метода сравнения, ни доступного аттестованного стандартного образца. Для таких тестов необходимо проводить гармонизацию доступных лабораторных методов исследования и диагностических систем. В широком смысле, гармонизация позволяет добиться получения относительно эквивалентных результатов исследования, которые были получены при использовании разных методов измерения для одной и той же измеряемой величины. В лабораторной медицине гармонизация результатов для определенной измеряемой величины достигается в основном стандартизацией, о которой мы уже упоминали выше. А если эталонные процедуры измерения недоступны, такие как аттестованный стандартный образец или референтный метод измерения, то применяется другой порядок взаимного предоставления сведений в области обеспечения единства измерений, полученных в результате различных нестандартизованных методов измерения [8, 17]. На многих форумах лабораторной медицины именно проблема гармонизации, то есть обеспечение согласованности клинических лабораторных исследований, находится в центре внимания. Гармонизация охватывает все аспекты лабораторного процесса, включающего в себя преана-

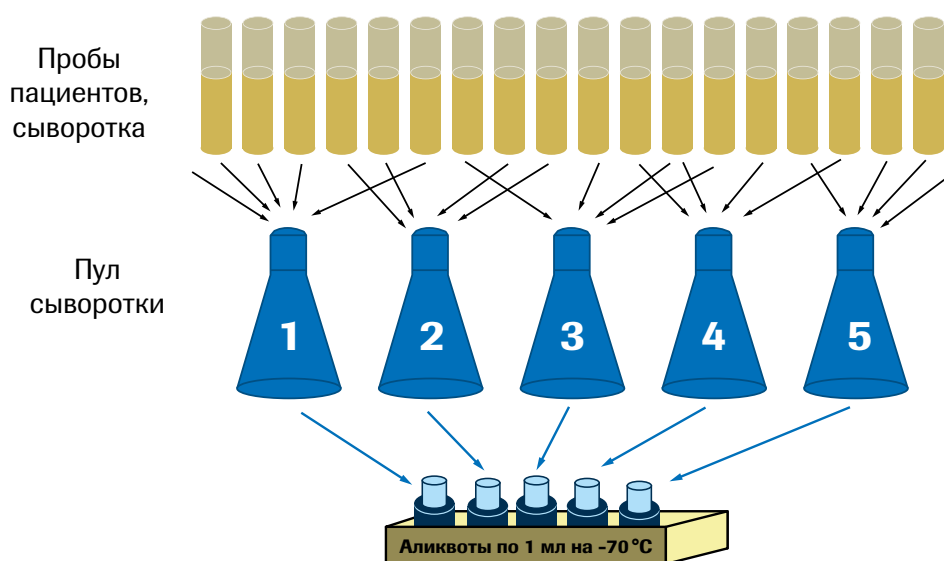


Рисунок 2. Схематичное изображение процесса получения стандартного образца.

литический, аналитический и постановочный этапы [18].

В инструкциях Рош к биохимическим и иммунохимическим тестам находится информация относительно какого референтного материала стандартизирован тест, а если не существует международного общепринятого стандарта, то относительно какого метода. Например, тест Elecsys HIV COMBI, предназначенный для количественного определения антигена p24 вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1 p24), антител к ВИЧ-1 и ВИЧ-2 в сыворотке и плазме крови человека, не имеет международного общепринятого стандарта. Однако, согласно инструкции к тесту, данный тест стандартизован относительно 1-го Международного референтного реагента вируса иммунодефицита человека типа 1 (антиген ВИЧ-1

p24), 1992 код 90/636 NIBSC (Национального Института Биологических Стандартов и Контроля). Кроме того, поскольку компания Рош постоянно работает над улучшением характеристик производимых тестов, то периодически происходит перестандартизация тестов, что приводит к изменению каталожного номера продукта и своевременному оповещению пользователей о любых изменениях. Стандартизации тестов является важным этапом при разработке любого диагностического теста и данная информация дает дополнительную уверенность в качестве исследований как врачам, так и пациентам.

Компания Рош предлагает современные высокотехнологичные решения для лабораторий, тем самым помогая пользователям обеспечить высокое качество

медицинского обслуживания, отвечающее международным и отечественным стандартам. Компания Рош постоянно работает над созданием безопасных, эффективных и высококачественных продуктов и услуг, которые соответствуют действующим нормам. Поэтому разработка и применение унифицированных требований и методов исследования является неотъемлемой частью высокого стандарта предлагаемых на рынке тест-систем компании Рош.

Автор статьи:

Д.Ю. Давыдова, к.б.н.

Старший менеджер по обучению
ООО «Рош Диагностика Рус»

Литература

1. ГОСТ ISO 17511-2011 Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Измерение величин в биологических пробах. Метрологическая прослеживаемость значений, приписанных калибраторам и контрольным материалам.
2. Stanley D. Rasberry REMCO - The ISO council committee on reference materials *Fresenius J Anal Chem* (1990) 338:368- 369.
3. <https://www.iso.org/members.html>
4. <https://www.atcc.org/>
5. Директива 98/79/EC Медицинские средства и оборудование для лабораторной диагностики *in vitro* - *In vitro diagnostic medical devices directive (IVDD)*.
6. <https://www.nist.gov/>
7. ISO/IEC 17025:2017 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий»
8. Neil Greenberg. Standardization, traceability and harmonization. *Clinica Chimica Acta*, 2014. 432: 49-54.
9. В. В. Меньшиков. Зачем клинической лаборатории нужна стандартизация и как ее применить на практике? Москва. Лабора, 2012; 3-72с.
10. Baudner S, Bienvenu J, Blirup-Jensen S, et al. The certification of a matrix reference material for immunochemical measurement of 14 human serum proteins. CRM 470. Community Bureau of Reference, Commission of the European Communities, Brussels, 1993; 1-172.
11. JOHN T. WHICHER BCR/IFCC reference material for plasma proteins (CRM 470). *Clinical Biochemistry*, Vol. 31, No. 6, 459-465, 1998.
12. A. Benozzi, H. Baier. Controls and calibrators in Clinical Chemistry. Boehringer Mannheim GmbH Roche Laboratory Systems D-68298, Mannheim, Germany.
13. Rahbar S. An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics. *Clin Chim Acta* 1968;22:296-298.
14. Koenig RJ, Peterson CM, Jones RL. Correlation of glucose regulation and hemoglobin A1c in diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1976 Aug 19; 295(8):417-20.
15. Hoelzel W, Weykamp C. IFCC reference system for measurement of hemoglobin A1c in human blood and the national standardization schemes in the United States, Japan, and Sweden: a method-comparison study. *Clin Chem*. 2004 Jan; 50(1):166-74.
16. Erna Lenters-Westra. Evaluating new HbA1c methods for adoption by the IFCC and NGSP reference networks using international quality targets. *Clin Chem Lab Med* 2017; 55(9): 1426-1434.
17. Mario Plebani Harmonization of clinical laboratory information - current and future strategies. *eJIFCC*; 2016, Vol27, No1:015-022.
18. S.K. Van Houcke, S. Van Aelst. Harmonization of immunoassays to the all-procedure trimmed mean - proof of concept by use of data from the insulin standardization project. *Clin Chem Lab Med*, 2013 May; 51(5):103-105.

[illegible]

Расписание вебинаров

Дата	Название вебинара
02.04.2019	Диагностика инфекционных заболеваний с Roche.
04.04.2019	Высокочувствительный тест Roche на кардиотропонин Т. Ранняя диагностика. Правильное лечение. Спасение жизни.
17.04.2019	Онкомаркеры – рациональное использование в мониторинге, прогнозе и выявлении рецидивов злокачественных опухолей.
19.04.2019	Частые ошибки и пути их решения при работе с реагентами на биохимическом автоматическом анализаторе cobas с 311 и биохимическом модуле с 501.
17.05.2019	Решения Roche в диагностике железодефицитного состояния и мегалобластной анемии.
21.05.2019	Новый полностью автоматизированный анализ на антимюллеров гормон.
24.05.2019	Наиболее часто встречающиеся ошибки и пути их устранения при работе на иммунохимическом анализаторе cobas e 411.
04.09.2019	Консалтинговая поддержка Roche для пользователей модульного оборудования.
06.09.2019	Контроль аналитического качества клинических исследований: задачи и возможности современных лабораторий.
13.09.2019	ТТГ в вопросах и ответах.
17.09.2019	Решения Roche для заботы о женском здоровье.
27.09.2019	Наиболее часто встречающиеся ошибки и пути их устранения при работе с модульной платформой cobas 6000.
08.10.2019	Наиболее часто встречающиеся ошибки и пути их устранения при работе на биохимическом анализаторе cobas INTEGRA 400 plus.
18.10.2019	Обзор новых возможностей программного обеспечения модульной платформы cobas 8000.
22.10.2019	Костные маркеры – эффективный инструмент мониторинга при лечении остеопороза.
29.10.2019	Частые ошибки и пути их решения при работе с модульной платформой cobas 8000.
22.11.2019	Частые ошибки и пути их решения при работе с модульной платформой cobas 8000.
27.11.2019	Современные возможности стандартизации общего анализа мочи. Интерпретация результатов.
13.12.2019	Тесты Roche в диагностике и мониторинге сахарного диабета.

■ Технические вебинары ■ Образовательные вебинары

Медицинские изделия, используемые в данном материале, разрешены к применению на территории РФ и имеют регистрационные удостоверения Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения. Государственный реестр медицинских изделий: <http://www.roszdravnadzor.ru/services/misearch>.

*Даты проведения вебинаров могут корректироваться.



Диагностика в вебинарах

Практические советы по работе с анализаторами и тест-системами, подходы к диагностике и мониторингу различных состояний, обзоры новинок и многое другое – в новом цикле вебинаров от компании «Рош Диагностика Рус».

Цикл будет интересен сотрудникам лечебно-профилактических учреждений и лабораторий, работающих на иммунохимических и биохимических автоматических анализаторах серии **cobas**, а так же специалистам, которые в повседневной клинической практике получают диагностическую информацию с использованием диагностических тестов группы компаний Рош.

Актуальная информация о датах проведения на сайте:

<http://rochediagnostics.ru>

Автоматический анализатор мочи cobas u 601



- До 240 образцов/час
- Уникальная технология тест-полосок Combur-Test: защита от интерференции со стороны аскорбиновой кислоты и клееподобных компонентов (бесклеевая основа)
- **cobas u** rack: 400 тест-полосок в кассете с RFID
- Стабильность тест-полосок на борту в течение 14 дней
- Усовершенствованный фотометр: измерение на каждой реакционной зоне тест-полоски
- Автоматический запуск после загрузки образцов

Автоматический анализатор мочи cobas u 701

- До 116 образцов/час
- Автоматизация золотого стандарта микроскопии осадка мочи
- Сохранение изображений: объективный документированный результат
- Безреагентная система: минимум расходных материалов и процедур обслуживания
- **cobas u** cuvette: 400 кювет в кассете с RFID-метками
- Возможность определения оператором правил перекрестной проверки и валидации



Анализаторы cobas u 601 + cobas u 701 – единая система
для автоматизации всех этапов исследования мочи

COBAS является товарным знаком компании Рош.



ООО «Рош Диагностика Рус»
115114, Россия, Москва, ул. Летниковская д. 2 стр. 2
Тел: + 7 495 229 69 99
www.rochediagnostics.ru
© ООО «Рош Диагностика Рус», 2019
РУ № РЗН 2017/5887 от 26 июня 2017
РУ № РЗН 2017/6492 от 23 ноября 2017

Информация предназначена для медицинских работников

cobas®

DIA1765