

# Значение обеспечения качества измерений свободной $\beta$ -субъединицы хорионического гормона человека ( $\beta$ -ХГЧ) и связанного с беременностью плазменного протеина А (РАРР-А) в точности биохимического скрининга I триместра беременности

Габриела Грюноу, Германия

Пренатальный скрининг по выявлению риска развития врожденных пороков плода должен соответствовать самым высоким требованиям медицинской этики и проводиться в соответствии со стандартами, принятыми ведущими медицинскими ассоциациями мира. В настоящее время в большинстве стран наблюдается отчетливая тенденция перехода от скрининга II триместра к скринингу I триместра, а в ряде стран этот переход уже практически завершен (Великобритания, Дания, Германия, Греция).

Расчет риска хромосомных аномалий мода проводится с учетом возраста, некоторых анамнестических данных беременной женщины, результатов ультразвукового обследования (толщина воротникового пространства (ТВП), копчико-теменной размер (КТР) и некоторые другие параметры), и уровня  $\beta$ -хгч и РАРР-А в крови женщины.

Расчет индивидуального риска врожденных аномалий мода должен быть максимально достоверным и точным и требует, наряду с отличными клиническими знаниями и огромным опытом точного измерения ультразвуковых параметров, использования высококачественной лабораторной аналитики. Ранее этот аспект часто недооценивали. Необходимость наличия ультразвуковых аппаратов с высоким качеством разрешения для обеспечения верного измерения ТВП и КТР при сроке беременности от 11 нед до 13 нед 6 дней, исследования органов и систем мода на 22 нед, уже не обсуждается. В то же время значение качества определения биохимических маркеров в точности результирующего расчета индивидуального риска пока не является общеизвестным.

Это объясняется несколькими причинами. Во-первых, взаимосвязь между качеством определения биохимических маркеров и точностью рассчитанного риска при комбинированном пренатальном скрининге на первый взгляд не очевидна и требует представления при помощи математических модельных расчетов.

Во-вторых, большинство производителей, предлагающих в настоящее время коммерческие наборы реагентов для определения РАРР-А и  $\beta$ -хгч, не заинтересованы (по определенным причинам) в обсуждении аспектов достаточности аналитического уровня для данных маркеров.

Каковы же релевантные критерии качества для измерения РАРР-А и  $\beta$ -хгч для объективной оценки методов, наборов реагентов и приборов для определения биохимических маркеров I триместра беременности используют ряд аналитических требований.

Одной из наиболее важных характеристик является воспроизводимость.

Воспроизводимость лабораторных исследований характеризуется мерой влияния случайных ошибок в процессе анализа, т.е. степенью близости друг к другу количественных результатов измерений, выполненных в различных условиях (в разное время, или после новой калибровки прибора или с новой серией реагентов). Вариант воспроизводимости - близость результатов измерений, выполненных в одинаковых условиях, т.е. в серии исследований, может называться сходимостью.

Оценка воспроизводимости или сходимости отражает, насколько точно единичное измерение пробы пациентки будет воспроизведено при последующих измерениях. Как при оценке сходимости, так и при оценке воспроизводимости, чем меньше значения коэффициентов вариации для всех измеренных биохимических показателей, тем выше воспроизводимость результатов, получаемых в данном тесте, и тем точнее может быть рассчитан индивидуальный риск хромосомных аномалий.

Эта точность особенно важна для оценки риска в пограничной зоне, когда полученные результаты являются отрицательными, но риск синдрома Дауна выше, чем средний для данного возраста. Ведущий специалист по биохимическому скринингу британского фонда Fetal Medicine Foundation (FMF) профессор К. Спенсер считает, что «для расчета риска с целью сохранения порога отсечки 1:250 с коэффициентом вариации 10% аналитическая точность определения каждого биохимического маркера должна быть такова, чтобы коэффициент вариации был 3,5% или менее» [1]. Это те минимальные требования, которым должны соответствовать изготовители наборов реагентов и оборудования, а также лаборатория, выполняющая измерения, чтобы получить сертификацию FMF качества биохимической аналитики. Чем точнее будет определен соответствующий биохимический параметр. Тем более прецизионно будет рассчитан коэффициент МоМ и соответственно индивидуальный риск, коэффициент вариации которого в любом случае не должен превышать 8%. Кевин Спенсер считает, что даже если рассматривать умеренное повышение коэффициента вариации МоМ на 4-5%, то коэффициент вариации индивидуального риска повысится на 15%» [1, 2].

Налицо явный парадокс: в то время как в клинической лабораторной диагностике практически нельзя найти методики с допустимым коэффициентом вариации 15%, в пренатальном биохимическом скрининге еще используются оборудование и наборы реагентов, которые при расчете индивидуального риска могут давать результирующую ошибку в диапазоне 15-25%.

Об актуальности данной проблемы свидетельствует и то, что в последнее время появились публикации ведущих биохимиков, работающих в области пренатального скрининга, в которых они обсуждают аспекты качества определения маркеров I триместра беременности [3, 4].

Справедливости ради следует отметить, что соблюдение высоких критериев воспроизводимости и правильности измерения РАРР-А и  $\beta$ -хгч все же выполнимо при сегодняшнем уровне развития лабораторной технологии. При межлабораторном контроле качества, по данным Национальной системы внешней оценки качества исследований Великобритании (UK NE(1AS)), в течение многих лет наиболее высокой точностью и воспроизводимостью определения биохимических маркеров пренатального скрининга отмечаются измерения, проводимые на автоматическом анализаторе KRYPTOR с наборами реагентов для данной системы, которые производятся немецкой компанией BRAHMS AG.

Автоматический биохимический анализатор BRAHMS KRYPTOR представляет собой полностью автоматизированную систему диагностики *in vitro* для определения в режиме рутинного измерения различных биохимических маркеров (маркеров для пренатального скрининга I и II триместров, прокальцитонина, С-реактивного белка, опухолевых маркеров, остеокальцина, ферритина, тиреоидных гормонов и т.д.). Определение данных маркеров производится с высокой точностью благодаря уникальной технологии измерения. В биохимическом анализаторе BRAHMS KRYPTOR используется технология TRACE (Time-Resolved Amplified Cryptate Emission), в которой измеряется сигнал, испускаемый с временной задержкой иммунным комплексом. Этот метод основан на фундаментальной работе лауреата Нобелевской премии Жан-Мари Лен (1987 г.), совместно с Д. Крамом и Ч. Педерсеном «за разработку и применение молекул со структурно специфическими взаимодействиями с высокой селективностью».

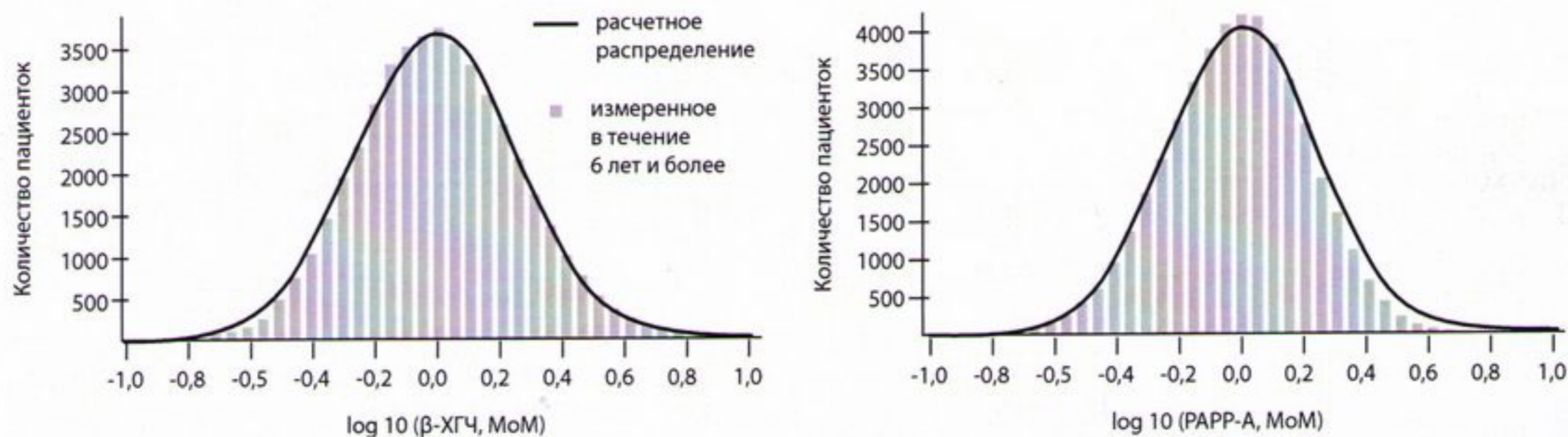


Рисунок. Стабильность определения свободной  $\beta$ -субъединицы ХГЧ ( $\beta$ -ХГЧ) и плазменного протеина А (PAPP -A) наборами реагентов компании BRAHMS с помощью системы KRYPTOR (данные К. Спенсера).

Основу технологии TRACE составляет безызлучательная передача энергии от донора (решетчатая структура с ионом европия в центре [криптит]) к акцептору, который является частью химически модифицированного светособирающего водородослевого белка (XL 665). Близость донора (криптата) и акцептора (XL 665), когда они являются частью иммунного комплекса и перекрывание спектра эмиссии донора и спектра абсорбции акцептора, усиливают флуоресцентный сигнал криптата и увеличивают продолжительность сигнала акцептора, позволяя тем самым измерить флуоресценцию с временной задержкой.

Преимущество данной технологии заключается в возможности очень точного измерения определяемого маркера. При возбуждении пробы азотным лазером с длиной волны 337 нм донор (криптит) излучает сигнал большей длительности в миллисекундном диапазоне с длиной волны 620 нм, тогда как акцептор (XL 665) испускает сигнал малой длительности в наносекундном диапазоне с длиной волны 665 нм. При связывании двух компонентов в иммунный комплекс происходит как усиление сигнала, так и увеличение продолжительности сигнала акцептора при 665 нм, и, таким образом, сигнал может быть измерен в миллисекундах. Этот сигнал большей длительности пропорционален концентрации измеряемого маркера.

Измерение биохимических маркеров данным методом позволяет надежно предотвратить интерференцию. Неспецифические сигналы, например, сигналы малой продолжительности несвязанного акцептора XL 665 и сигналы интерференции со средней специфичностью, обусловленные естественной флуоресценцией пробы, исключаются за счет временной задержки измерения флуоресценции. Сигнал, испускаемый криптитом при 620 нм, служит внутренним референсным значением и измеряется одновременно с сигналом акцептора большей продолжительности. Факторы, которые мешают измерению, например, при анализе мутных сывороток, автоматически корректируются посредством внутреннего расчета соотношения значений интенсивности для этих длин волн. Аналитическая надежность метода обеспечивается тем, что проводимый анализ является гомогенным, исключая какие-либо стадии промывки и сепарации. За счет этого достигаются точные значения среднестатистической погрешности и воспроизводимости результатов между разными постановками анализа. Помимо воспроизводимости в биохимическом скрининге очень важной характеристикой качества метода, оборудования и набора реагентов является стабильность медианы значений биохимического маркера для срока беременности. Это очень важный показатель, потому что на их основе рассчитывают коэффициенты МоМ, которые далее будут служить для вычисления индивидуального риска хромосомных аномалий плода. У большинства производителей реагентов и оборудования для биохимического пренатального скрининга первоначально установленные медианы изменяются, их приходится ежегодно адаптировать. Это приводит к колебаниям точности расчета риска в зависимости от того, производится расчет до ежегодной адаптации или после.

По данным К. Спенсера, до сих пор только на системе KRYPTOR удалось получить медианы, абсолютно стабильные в течение 6 лет и более (рисунок).

Полученные результаты стабильности медиан наряду с высочайшей аналитической точностью привели к тому, что на протяжении последних 9 лет РМР для рутинных измерений  $\beta$ -ХГЧ и PAPP-A использует только анализатор KRYPTOR. Большинство центров, сертифицированных РМР и многие другие известные в мире центры пренатальной диагностики также используют анализаторы KRYPTOR с целью обеспечения качества своих исследований.

Помимо этого, использование анализатора KRYPTOR экономически выгодно и эффективно с точки зрения организации работы лаборатории:

- короткое время работы оператора с минимальным обслуживанием;
- небольшой расход реагентов с продолжительными интервалами между калибровками (преимущественно с интервалом 14 дней, калибровка по одной точке);
- различные варианты режима доступа к тестам: свободный доступ random access, система «тест за тестом» - Batch доступ, экстренное определение любого параметра (Stat-исследования);
- возможность определений нескольких сотен тестов без смены реагентов, так как на борту доступны до 12 охлаждаемых наборов;
- экономное использование расходных материалов;
- малое количество жидких отходов;
- экономия времени и минимизация ошибок в результате автоматической передачи данных в LIS и программу расчета риска при пренатальном скрининге; время исследования составляет только 19 мин;
- автоматическое «интеллектуальное» разведение: быстрое распознавание проб, значения которых выходят за границы линейности.

Максимум через 5 мин следует автоматическое разведение, которое гарантирует быстроту и надежность результатов, особенно в случае необходимости получения срочного результата анализа.

В 2007 г. последняя модель автоматического анализатора системы KRYPTOR - KRYPTOR Compact - была зарегистрирована в Российской Федерации и в настоящее время доступна для российских специалистов по пренатальной диагностике.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Spencer K. Risk, a QC parameter // DSNEWS. 2003. V. 10. N.1. P. 30.
2. Spencer K. First trimester maternal serum screening for Down's syndrome: an evaluation of the DPC Immulite 2000 free  $\beta$ -hCG and pregnancy-associated plasma protein-A assays // Ann. Clin. Biochem. 2005. V. 42. P. 30-40.
3. Cuckle H. Coefficient of variance // DSNEWS. 2007. V. 14. N. 2. P. 25.
4. Mirpuri I. Quality of biochemistry // DSNEWS. 2007. V. 14. N2. P. 19.