

М.В. КУВШИНОВ, А.П. ОБРЯДИНА

ООО «НПО «Диагностические системы», Нижний Новгород

АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ СРАВНЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ ТЕСТОВ

Перед каждым специалистом лабораторной службы рано или поздно возникает необходимость сравнения результатов двух различных тестов. Эта задача усложняется, если речь идет о тест-системах с количественным учетом результатов, какими являются, например, все наборы для определения гормонов и онкомаркеров. Полноценное сравнение адекватности двух методов (тест-систем) – достаточно сложный и объемный проект, требующий коллекции образцов, репрезентативной по всему диапазону измерения, специального дизайна эксперимента и применения определенных статистических методов. Как правило, все эти исследования проводятся производителями диагностических тестов на этапе их разработки и на рынок допускаются тесты, адекватность которых показана в сравнении с одной или несколькими существующими методиками.

Однако в рутинной практике клинической лаборатории, как правило, в качестве референсных используются тест-системы, на которых лаборатория работала ранее. В ходе сравнения формируется выборка из образцов сывороток от пациентов с различным гормональным статусом, после чего каждый образец параллельно тестируется обоими методами (наборами), и в итоге делается вывод о совпадении или несовпадении результатов (сходимости). Когда речь идет о тест-системах с количественным учетом результатов, можно говорить о «количественном» и «качественном» совпадении результатов.

Качественное совпадение – это попадание или непопадание результатов обоих тестов в один диапазон, обусловленный клиническим статусом пациента. Для определения «количественного совпадения» или оценка зависимости для рядов данных используется коэффициент линейной корреляции Пирсона, характер выражается чаще всего через формулу линейной регрессии, а близость точных значений результатов тестирования каждого индивидуального образца оценивается с учетом неопределенности измерений. Все эти методы оценки доступны средней лаборатории, однако камнем преткновения являются, как правило, гораздо более простые ошибки, такие как сравнение величин, выраженных в разных единицах, использование референсных интервалов только одного производителями, невозможность оценить неопределенность измерения.

Результаты ИФА могут быть выражены как в традиционных единицах (моль или МЕ), так и в единицах СИ (нг, пг и т.п.), соотнесенных к единицам объема (л, мл). В таблице 1 представлены коэффициенты для пересчета результатов, полученных в традиционных единицах, в единицы СИ.

Таблица 1

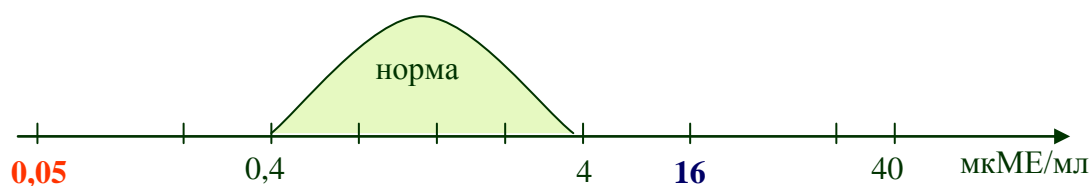
Правила пересчета результатов в различные единицы измерений

Параметр	К для пересчета в традиционные единицы	К для пересчета в единицы СИ
ТТГ, ФСГ, ЛГ, β-ХГЧ	(мМЕ/мл) × 1 = МЕ/л	(МЕ/л) × 1 = мМЕ/мл
Т3 общий	(нмоль/л) × 0,651 = нг/мл	(нг/мл) × 1,536 = нмоль/л
Т3 свободный	(пмоль/л) × 0,651 = пг/мл	(пг/мл) × 1,536 = пмоль/л
Т4 общий	(нмоль/л) × 0,777 = нг/мл	(нг/мл) × 1,287 = пмоль/л
Т4 свободный	(пмоль/л) × 0,777 = пг/мл	(пг/мл) × 1,287 = пмоль/л
Пролактин	(мМЕ/мл) × 0,048 = нг/мл	(нг/мл) × 21 = мМЕ/мл
Эстрадиол	(пмоль/л) × 0,272 = пг/мл	(пг/мл) × 3,67 = пмоль/л

Тестостерон	(нмоль/л) x 0,288 = нг/мл	(нг/мл) x 3,47 = нмоль/л
Прогестерон	(нмоль/л) x 0,314 = нг/мл	(нг/мл) x 3,18 = нмоль/л
Кортизол	(нмоль/л) x 0,0362 = нг/мл	(нг/мл) x 2,76 = нмоль/л
ДГЭА-сульфат	(мкмоль/л) x 0,369 = мкг/мл	(мкг/мл) x 2,71 = мкмоль/л
17-ОН прогестерон	(нмоль/л) x 0,33 = нг/мл	(нг/мл) x 3,03 = нмоль/л
АФП	(МЕ/мл) x 1,205 = нг/мл	(нг/мл) x 0,83 = МЕ/мл
Свободный эстриол	(нмоль/л) x 0,289 = нг/мл	(нг/мл) x 3,45 = нмоль/л

Проблема интерпретации результатов традиционно является актуальной. Большинство лабораторий пользуются диапазонами, приведенными в инструкциях к наборам, зачастую считая их абсолютной истиной. Это не является правильным, поскольку содержание многих маркеров может варьировать в различных популяциях в зависимости от географических, этнических, расовых и других особенностей. Поэтому каждый производитель в инструкциях к наборам оговаривает, что приведенные данные являются ориентировочными и каждая лаборатория должна уточнить собственные нормальные значения, характерные для конкретной территории. Однако гораздо более грубой ошибкой является использование референтных интервалов одного из сравниваемых тестов для интерпретации результатов другого, зачастую не обращая внимания даже на то, что величины выражены в разных единицах! В идеале каждая лаборатория должна не только определять референтные интервалы для каждого аналита, но и периодически их пересматривать в соответствии с п. 5.5.5 ГОСТ Р ИСО 15189 [1]: **«Биологические референтные интервалы следует периодически пересматривать. Если лаборатория имеет основания полагать, что данный референтный интервал больше не соответствует референтной популяции, должны быть предприняты исследования с дальнейшими, при необходимости, коррективами. Пересмотр биологических референтных интервалов также должен иметь место, когда лаборатория изменяет аналитические и преаналитические процедуры».**

Сравнение результатов тестирования индивидуальных образцов неправомерно без учета неопределенности измерения, особенно, если речь идет о значениях концентраций аналитов, близких к пограничным (см. рис.1). Из приведенных примеров истинным расхождением можно считать лишь 3-ий, когда один результат находится в нормальном диапазоне, а другой – повышен. Примеры 1, 4 и 5 демонстрируют качественное совпадение результатов. Необходимо учитывать, что при измерении и сравнении содержания аналита в концентрациях, находящихся выше верхнего калибратора (в данном примере 16 мкМЕ/мл), образец требует предварительного разведения и учета в дальнейшем фактора разведения. Это может служить дополнительным источником погрешности (пример 4).



№	Примеры:	Интерпретация
1	2,9 и 3,5	Значения в пределах N.
2	3,7 и 4,2	Значения в пределах N?
3	3,1 и 7,5	Качественное расхождение.
4	53 и 38	Значения значительно выше нормы и верхнего калибратора. Расхождения количественные.
5	0,15 и 0,22	Значения ниже N.

Рис. 1 Возможные результаты сравнения двух тестов (на примере ТТГ)

Отдельной проблемой являются ситуации, когда результаты попадают в район пограничных значений, но в разные диапазоны (пример 2). В этом случае часто делается вывод о качественном несовпадении результатов, что является неверным, поскольку практически всегда разброс значений лежит в пределах неопределенности измерения лаборатории.

Любой результат лаборатории отражает содержимое аналита в пробе пациента с некоторой степенью неопределенности. Суммарная лабораторная ошибка (TE) складывается из лабораторной составляющей систематической погрешности в условиях повторяемости (смещение) (B) и случайной составляющей погрешности (SD). Brooks [2] предлагает использовать следующую формулу:

$$TE = BI + 2SD \quad (1)$$

или

$$\%TE = I\%BI + 2CV\% \quad (2), \text{ где}$$

CV – коэффициент вариации

Коэффициент вариации для планшетного анализа регламентируется ГОСТ Р 51352-99 [3] и не должен превышать 8%. Таким образом, учитывая только случайную составляющую ошибки измерения, мы имеем для двух сравниваемых величин (пример 2): $3,7 \pm 0,59$ мкМЕ/мл (3,11-4,29) и $4,2 \pm 0,67$ (3,53-4,87) мкМЕ/мл.

В п. 5.6.2 ГОСТ Р ИСО 15189 «Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности» [1] содержится следующая информация:

«Лаборатория должна установить фактическую и возможную неопределенность результатов. Должны быть приняты во внимание важные компоненты неопределенности. Источниками неопределенности могут быть взятие проб, подготовка проб, отбор порций проб, калибраторы, стандартные образцы, используемое оборудование, условия окружающей среды, условия взятия пробы, смена оператора».

Основным фактором неопределенности лабораторных измерений, не являющихся аналитической вариацией, является биологическая вариабельность [4,5,6,7,8].

Биологической вариабельностью называются естественные колебания содержания элементов биологических жидкостей организма около определенной гомеостатической точки (величины). Она может быть 2 видов и выражается через коэффициент вариации [5]:

- полученная при анализе образцов от одного пациента (within-subject variation, CV_w)
- полученная при анализе образцов от разных пациентов (between-subject variation, CV_g).

Требования к аналитическим характеристикам метода, позволяющим различить патологическую и аналитическую вариации, основываются на понятии биологической вариабельности и описаны в ГОСТ Р 53022.2-2008 [9].

Лаборатория должна оценивать неопределенность измерений и информировать врача – клинициста о достоверности выдаваемого результата.

Проблема сопоставления результатов количественных тест-систем заключается в том, что наборы разных производителей (как отечественных, так и зарубежных) зачастую дают заведомо различающиеся результаты (см. табл.2), даже с учетом неопределенности измерений.

Таблица 2

**Контрольные результаты определения ТТГ в контрольном препарате
ГормоКон для иммуноанализа (ЗАО «Хема-Медика», сер.605)**

Производитель	Тест-система	Единицы	Контроль	
			Среднее	Диапазон
Хема-Медика	ИФА	мМЕ/л	2,39	2,15 – 2,63
Алкор-Био	ИФА	мкМЕ/мл	2,49	2,24 – 2,74
Вектор-Бест	ИФА	мМЕ/л	2,40	2,16 – 2,64
Имунотех	ИФА	мкМЕ/мл	3,98	3,58 – 4,38
Abbott	Axsym	мкМЕ/мл	3,61	3,25 – 3,97
Bayer	Advia Centaur	мкМЕ/мл	1,10	0,99 – 1,21
Roche	Elecsys	мкМЕ/мл	2,88	2,59 – 3,17

Причиной несовпадения уровня определяемого аналита двумя разными методами (тест-системами) при исследовании одного индивидуального образца может быть как метод - зависимое смещение, характеризующееся селективностью (специфичностью антител), пределом обнаружения, конструктивными особенностями теста, так и использование аттестованных относительно разных эталонов калибраторов.

Единых требований к выбору стандартов нет, более того, для целого ряда аналитов стандартов нет вообще.

Однако производитель должен указывать в инструкции к набору и паспорте к серии стандарт (эталон) более высокого уровня, по которому аттестуются калибровочные пробы, и обеспечивать метрологическую прослеживаемость и межсерийную воспроизводимость. Другими словами, калибраторы каждой серии препарата должны быть аттестованы относительно одного стандарта и этот стандарт должен быть указан.

Результаты постоянного мониторинга тест-систем, представленных на рынке, показали, что не всегда производителям удается постоянно, от серии к серии, обеспечивать номинацию калибраторов в соответствии с заявленным стандартом (рис.2). Подобные факты, к сожалению, не только делают невозможным сравнение результатов двух или более тестов, но и подвергают сомнению ценность подобной лабораторной информации для клиницистов.

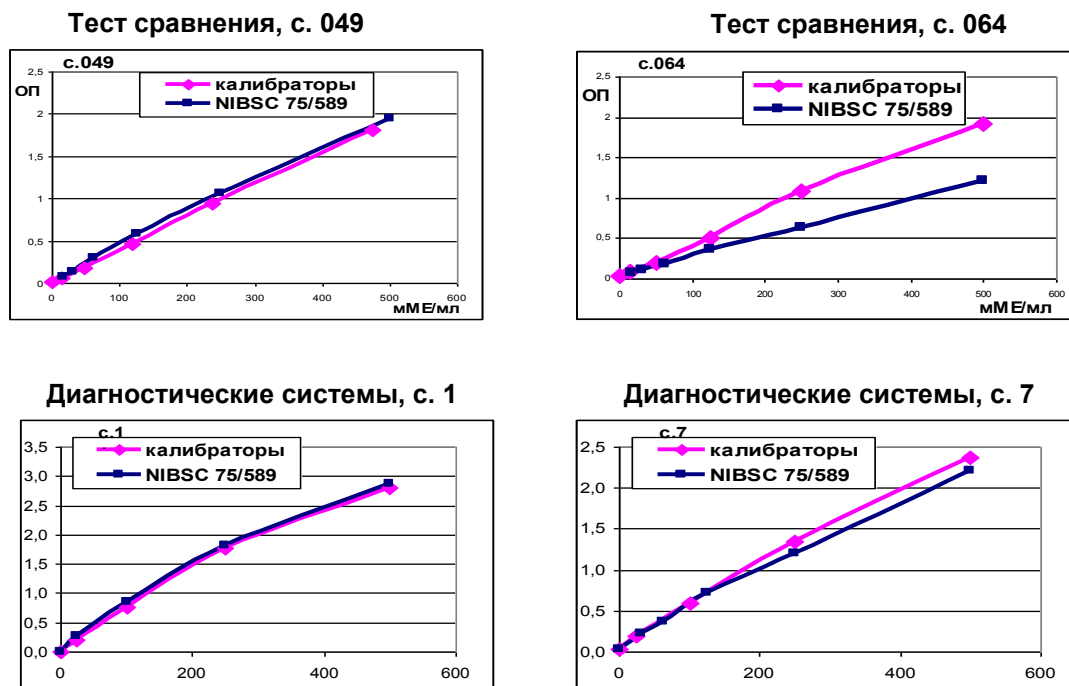


Рис 2. Кривые титрования 4 международного стандарта ВОЗ (NIBSC 75/589) и калибровочные кривые коммерческих тестов для определения ХГч (результаты эксперимента ООО НПО «Диагностические системы»)

Исследование, проведенное С. Stephan и соавт. (2007), выявило значительные различия результатов на ПСА общий и ПСА свободный, полученных с использованием 5 наиболее известных зарубежных наборов для автоматических анализаторов [10]. Одним из объяснений такой ситуации, по мнению авторов, является то, что наборы лишь трех производителей калиброваны по Международному стандарту. Целый ряд работ, проведенных за последние годы, подтверждают значимость данной проблемы [11,12,13,14,15].

Заключение: современные рыночные условия предоставляют широкий выбор диагностикумов как отечественных, так и зарубежных производителей с открытым и с закрытым форматом анализа. Клинико-диагностические лаборатории должны использовать регламентированные методы для оценки и сравнения, учитывая ограничения в применении метода, особенности аналита и используемых методик.

ЛИТЕРАТУРА

1. ГОСТ Р ИСО 15189-2006 «Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности».- М., 2007.
2. Brooks Z. Performance-Driven Quality control.// AACCPress, 2001
3. ГОСТ Р 51352-99 Наборы реагентов для клинической лабораторной диагностики. Методы испытаний. – М., 1999.
4. Ricos C., Alvarez V., Cava F., Garcia-Lario J.V., Hernandez A., Jimenez C.V. Biological variation database// <http://www.westgard.com/guest17.htm>
5. Soletormos G., Semjonow A., Sibley P.E. et al. Biological variation of total prostate-specific antigen: a survey of published estimates and consequences for clinical practice// Clin Chem., 2005. Vol. 51. p.1342-1351
6. Erden G, Barazi AO, Tezcan G, Yildirimkaya M.M. Biological variation and reference change values of CA 19-9, CEA, AFP in serum of healthy individuals// Scand J Clin Lab Invest. 2008. Vol. 68(3). p. 212-218

7. *Browning M.C., Bennet W.M., Kirkaldy A.J., Jung R.T.* Intra-individual variation of thyroxin, triiodothyronine, and thyrotropin in treated hypothyroid patients: implications for monitoring replacement therapy// *Clin Chem.* 1988. Vol. 34(4). p. 696-699
8. *Jensen E., Petersen P.H., Blaabjerg O., Hegedüs L.* Biological variation of thyroid autoantibodies and thyroglobulin// *Clin Chem Lab Med.* 2007. Vol.45 (8). p.1058-1064
9. ГОСТ Р 53022.2-2008 Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству лабораторных исследований. Часть 2. Оценка аналитической надежности методов исследования (точность, чувствительность, специфичность).- М., 2009.
10. *Stephan C., Kramer J., Meyer H.A., Kristiansen G.* Different prostate-specific antigen assays give different results on the same blood sample: an obstacle to recommending uniform limits for prostate biopsies// *BJU Int.* 2007. Vol. 99. p. 1427-1431
11. *Link R.E., Shariat S.F., Nguyen C.V. et al.* Variation in prostate specific antigen results from 2 different assay platforms: clinical impact on 2304 patients undergoing prostate cancer screening// *J Urol* 2004. vol. 171. p. 2234-2238
12. *Patel D., White P.A., Milford W.A.* A comparison of six commercial assays for total and free prostate specific antigen (PSA): the predictive value of the ratio of free to total PSA// *BJU Int.* 2000. Vol. 85. p. 686-689
13. *Kort S.A., Martens F., Vanpoucke H., van Duijnhoven H.L., Blankenstein M.A.* Comparison of 6 automated assays for total and free prostate-specific antigen with special reference to their reactivity toward the WHO 96/670 reference preparation// *Clin Chem* 2006. Vol. 52. p. 1568-1574
14. *Roddam A.W., Rimmer J., Nickerson .C, Ward A.M.;* NHS Prostate Cancer Risk Management Programme. Prostatespecific antigen: bias and molarity of commercial assays for PSA in use in England// *Ann Clin Biochem.* 2006. Vol. 43. p. 35-48
15. *Blijenberg B.G., Yurdakul G., Van Zelst B.D., Bangma C.H., Wildhagen M.F., Schroder F.H.* Discordant performance of assays for free and total prostate-specific antigen in relation to the early detection of prostate cancer// *BJU Int.* 2001. Vol. 88. p. 545-550

Клиническая лабораторная диагностика – 2012. - №4.- С.32-35