



Программа ЦКД-МИК

«Центр клинической диагностики —
Мобильные инструментальные комплексы»

*«Централизация лабораторной службы через ее
рассредоточение»*

Новосибирск, 2015 г.

Введение

Все современные клинические анализаторы (иммунохимия, гематология, иммунология, бактериология) базируются на технологии проточной цитометрии. Проточный цитометр играет в анализаторах такую же роль, как и процессор в компьютерах.

Современные проточные цитометры в подавляющем большинстве измеряют только концентрации молекул или клеток. Этого совершенно недостаточно, чтобы учитывать функции клеток в формировании диагноза. Для учета функции клеток необходимо измерять их динамические характеристики, например, скорость агрегации тромбоцитов, динамику лизиса эритроцитов и др. На измерение концентраций транспортировка пробы крови не оказывает существенного влияния, чем принципиально отличается измерение динамических характеристик клеток.

Создание центров клинической диагностики в классической конфигурации с парком анализаторов и доставкой проб не соответствует требованиям повышения качества анализа за счет измерения динамических характеристик клеток. Программа ЦКД-МИК направлена на решение данной стратегической проблемы организации клинической диагностики.

Проблемы:

1. Все гематологические анализаторы и проточные цитометры, используемые в ежедневной лабораторной клинической диагностике, являются импортными;
2. Расходные материалы и программное обеспечение для гематологических анализаторов и проточных цитометров являются импортными;
3. Расположение диагностических центров в крупных городах не позволяет обеспечить одинаковый уровень диагностики всех жителей регионов России. **Транспортировка крови приводит к искажению результатов анализа.**

Решение:

1. **Сканирующий проточный цитометр (СПЦ)**, совмещающий в себе функции гематологического анализатора и проточного цитометра. В Сибирском отделении РАН произведено несколько прототипов анализатора, на которых проводятся регулярные исследования, показавшие практическую значимость данного прибора в клинической диагностике;
2. Отличительной особенностью технологии является снижение объёма потребления расходных материалов. Необходимые расходные материалы могут быть изготовлены на биотехнологических предприятиях Российской Федерации;
3. СПЦ позволяет измерить существенно больше характеристик клеток крови. Список диагностируемых патологий может быть расширен (уже разработано несколько диагностических методик, которые невозможно выполнить на стандартных приборах);
4. Установка СПЦ на мобильные платформы позволит производить диагностику также в отдалённых населённых пунктах, повысив качество лабораторной службы по стране.

Основные этапы реализации проекта:

1. Проведение конструкторских работ по проектированию промышленного образца анализатора;
2. Проведение медицинских исследований для отработки методик;
3. Техническая и клиническая сертификация;
4. Организация обучающих курсов для врачей и лаборантов.

5. Производство анализатора и формирование Мобильных Инструментальных Комплексов (МИК).
Формирование региональных Центров Клинической Диагностики (ЦКД).

Результаты проекта:

1. Повышение уровня клинической диагностики в России, в том числе в рамках проведения скрининговых исследований;
2. Вытеснение импортных гематологических анализаторов, проточных цитометров и расходных материалов с Российского рынка;
3. Развитие технологического потенциала инновационных предприятий – производителей анализаторов и расходных материалов, увеличение занятости в высокотехнологической отрасли, увеличение налоговых поступлений в бюджет регионов;
4. Повышение уровня образования лабораторных диагностов и медицинских инженеров, закрепление выпускников медицинских ВУЗов в профильной области.

Актуальность

Развитие клинической диагностики в настоящий момент идёт по пути концентрации диагностического оборудования в крупных центрах и транспортировки проб крови по сети пунктов сбора. Наряду с финансовыми и организационными преимуществами, данная система не решает вопросов обслуживания удалённых населённых пунктов, а также проведения исследований, методически исключающих транспортировку проб.

Кроме того, используемые в настоящий момент гематологические анализаторы ограничены по своим возможностям, измеряя лишь **10 характеристик** клеток крови, куда входят концентрации 7 типов клеток крови, а также объём эритроцитов и тромбоцитов. Заявленное производителями увеличение количества измеряемых анализаторами параметров (33, 48, 72 штук) достигается лишь проведением арифметических операций между реально измеренными характеристиками клеток.

Эффективный путь получения первичной информации о состоянии пациента заключается в проведении *расширенного гематологического анализа крови*: измерении не только концентраций клеток, но и статических и динамических характеристик восьми типов клеток крови (эритроциты, тромбоциты, 5 типов лейкоцитов и микрочастицы крови).

Метод решения – расширенный гематологический анализ

Расширенный гематологический анализ в современных условиях может быть реализован с использованием технологии *сканирующей проточной цитометрии* (СПЦ). Использование данной технологии не предполагает значительного увеличения расходных материалов и может быть осуществлено в рамках скрининговых исследований. В расширенный анализ включаются:

- Концентрации семи типов клеток крови – повторение стандартного гематологического анализа.
- + Концентрация микрочастиц (везикул) крови, их плотность и склонность к агрегации.
- + Объем и содержание гемоглобина в каждом эритроците. Такое измерение делают некоторые гематологические анализаторы, но они используют закрытые биохимические растворы для калибровки и сферизации эритроцитов. СПЦ измеряет объем и гемоглобин эритроцитов без калибровки и сферизации, т.е. без расходных материалов.
- + Форма (площадь) эритроцита, эластичность, проницаемость мембраны эритроцита и чувствительность эритроцита к активации.
- + Форма тромбоцита, активационный и агрегационный индексы тромбоцитов.
- + Размер клетки и ядра, плотность ядра и цитоплазмы, апоптотический индекс мононуклеарных клеток (лимфоциты и моноциты).
- + Размер гранулоцитов (нейтрофилы, базофилы и эозинофилы).

СПЦ реально измеряет не 10 характеристик, а **33 характеристики** клеток крови (из которых при желании простыми арифметическими действиями можно получить, например, 200 параметров). Из 33 характеристик 25 являются статическими и 8 динамическими (двойное подчеркивание выше по тексту). Динамических характеристик немного, но они самые важные для диагностики. При этом эти характеристики сильно зависят от транспортировки пробы крови и измерять их надо **сразу же при заборе крови у пациента**.

Кроме гематологического анализа на том же приборе (СПЦ) возможно проведение

- + Иммунохимических исследований с помощью диагностических наборов: анализ гепатита, СПИД, онкомаркеров и т.д.
- + Иммунотипирование клеток крови. Работа в режиме проточного цитофлюориметра. Определяются не просто количество клеток определенного иммунотипа, но и количество искомых рецепторов на этих клетках, а также их аффинность к антителам, входящих в тестируемый набор.
- + Бактериологический анализ. Идентификация бактерий в пробе, а также исследование штаммовой резистентности к антибиотикам.

Распределённая система анализа

В связи с невозможностью транспортировки пробы крови и со сложностью решаемых вычислительных задач при анализе клеток крови с помощью СПЦ, требуется *распределённая система анализа*: измеряемые на анализаторе данные передаются в создаваемый Центр Клинической Диагностики (ЦКД) по широкополосной линии связи, в котором производится решение задач с определением характеристик клеток. Высокопрофессиональные специалисты ЦКД оформляют заключение о результатах исследования и формируют предложение по профилактике или лечению. ЦКД оснащается высокопроизводительными компьютерами (вплоть до суперкомпьютера) для оперативного анализа данных, получаемых из закрепленных за ЦКД Мобильных Инструментальных Комплексов (МИК).

Базирование анализатора (СПЦ) может быть, как мобильным, так и стационарным.

Мобильное базирование:

Анализатор может быть установлен на мобильную платформу (автомобиль, железнодорожный, речной и морской транспорт), с образованием Мобильного инструментального комплекса (МИК). В этом случае обслуживание анализатора предполагает наличие лаборанта, осуществляющего забор крови, и инженера, ответственного за текущее обслуживание анализатора.

В случае:

- 1) Автомобильного базирования МИК может быть реализован, как
 - а. Микроавтобус – базируется в райцентре и обслуживает близлежащие населённые пункты. Обслуживает два человека: лаборант и инженер.
 - б. Трейлер – курсирует между населёнными пунктами на постоянной основе. В нём постоянно проживают два человека: лаборант и инженер.
- 2) Теплоходного базирования:
 - а. Прибрежный – устанавливается на небольшой теплоход и обслуживает населённые пункты вдоль побережья или русла реки. Обслуживает два человека: лаборант и инженер.
 - б. Круизный – устанавливается на кораблях дальнего плавания для проведения срочных анализов. Обслуживает два человека: лаборант и инженер.

Стационарное базирование:

Как и существующие на рынке аналоги, анализатор может быть установлен в клинических лабораториях или кабинетах забора пробы. Работа на данном приборе предполагает квалификацию лаборанта.

Последовательность шагов

| Этап | Содержание этапа | Срок, мес. |
|--|---|------------|
| Изготовление опытных образцов анализаторов для проведения клинических исследований | Проведение ОКР на разработку анализатора и изготовление опытных образцов в количестве 5 штук. | 8 |
| Проведение клинических исследований | Выработка программы исследований, подбор доноров, разработка методик, выводы о применимости методик для диагностики патологий. Размещение 4 опытных образцов анализатора в медицинских центрах для проведения испытаний. | 6 |
| Сертификация | Техническая и клиническая сертификация прибора. | 12 |
| Организация производства | Подготовка производственных площадей, организация поставок, комплектующих и производства, организация сервисной службы | 6 |
| Оснащение мобильных инструментальных комплексов (МИК) | Оснащение транспортных средств. Варианты базирования: стационарное, автомобильное, ж/дорожное, водное, авиационное. | 2 |
| Формирование системы региональных ЦКД на базе крупных клинических центров. | В региональный ЦКД поступает вся информация с мобильных инструментальных комплексов. Обработка данных осуществляется с использованием высокопроизводительных компьютеров. Информация анализируется специалистами ЦКД и предоставляется в клиническое отделение для принятия заключения о состоянии пациента. Заключение о состоянии пациента передается в МИК с рекомендациями по лечению или профилактике. | 2 |
| Организация обучающих курсов для врачей и лаборантов. | Обучение практикующих врачей и лаборантов возможностям ЦКД для применения в диагностике и лечении пациентов | |
| Распространение | Установка приборов на стационарные и мобильные пункты для проведения анализа крови населения. Возможна коммерческая реализация приборов частным медицинским центрам в России и за рубежом, иностранным научным лабораториям и российским государственным учреждениям в рамках госзаказа | |

Сопутствующие вопросы:

1) Обслуживание

а) Расходные материалы.

При выборе сканирующей проточной цитометрии в качестве базовой технологии, большинство расходных материалов анализатора могут быть произведены на базе существующих в России биотехнологических компаний (Вектор-Бест и др.), что снизит стоимость расходных материалов за счет таможи и частично за счет транспортных расходов. При этом некоторые анализы клеток с использованием сканирующей проточной цитометрии выполняются вообще без расходных материалов или с использованием самых простых реагентов.

б) Сервис

Решается созданием логистического центра по сервисному обслуживанию МИКов, куда входит синхронизация обслуживания и заправки мобильных комплексов, формирование комплекта запасных частей инструментального комплекса по запросу. В рамках центра сервисного обслуживания планируется создание службы сервисных инженеров, которые могут осуществлять диагностику и ремонт на территории клиента.

2) Персонал

Подготовка лаборантов и инженеров МИК решается с использованием имеющихся в НГМУ, НГТУ и НГУ программ обучения студентов университетов и приглашенных специалистов в центрах повышения квалификации и переобучения. Созданием учебных лабораторий на базе ЦКД.

3) Производство установочной партии анализаторов

Данная технология существует в виде инструментального прототипа с большим набором методического программного обеспечения. Время развертывания этой технологии в составе МИК зависит от длительности проведения опытно-конструкторских работ по созданию пилотной партии анализаторов медицинского назначения, сертификации и организации производства. Это можно сделать только с помощью государства.

4) Финансовая оценка стоимости проекта.

При стоимости анализа 300 рублей (100 рублей налоговые отчисления) и при загрузке 50 анализов в сутки, на одном анализаторе (МИК) можно достичь финансовой прибыли в размере 50 000 рублей и 110 000 рублей налоговых поступлений в месяц. При такой загрузке анализатора для проведения одного анализа в год каждому гражданину России отрасли потребуется 11000 анализаторов (МИК). При этом общие налоговые поступления от всех МИКов в год составят 15 млрд. рублей.

Результаты

1. Повышение уровня клинической диагностики, в том числе в рамках проведения скрининговых исследований до уровня выше мирового;
2. Расширение возможностей клинических исследований для удалённых населённых пунктов;
3. Вытеснение импортных гематологических анализаторов, проточных цитометров и расходных материалов с российского рынка;
4. Увеличение налоговых поступлений в бюджет регионов.
5. Развитие технологического потенциала инновационных предприятий – производителей анализаторов и расходных материалов, увеличение занятости в высокотехнологической отрасли. Гематологический анализатор и МИК являются конечными продуктами и вызывают кооперативный эффект в экономике: в анализаторе используется по крайней мере 5 лазеров, оптические изделия, электроника и т.д.; в состав МИК входят автомобиль, тепловизор, лазерный перфоратор и др. Все это при реализации программы ЦКД-МИК обеспечит заказами производителей этих высокотехнологических изделий. В эту категорию следуют отнести еще и разработку специализированного программного обеспечения, вплоть до суперкомпьютеров, что сформирует заказ российским компаниям в секторе информационных технологий;
6. Повышение уровня образования лабораторных диагностов и медицинских инженеров, закрепление выпускников медицинских ВУЗов в профильной области.

Приложение. Избранные публикации

Публикации в международных журналах и главы в книгах

1) Maltsev V.P. Scanning flow cytometry for individual particle analysis. *Rev. Sci. Instr.* 71, 243–255 (2000)

В статье изложены принципы технологии сканирующей проточной цитометрии, приведены первые экспериментальные результаты.

2) Maltsev V.P., Chernyshev A.V., and Strokotov D.I. Light-scattering flow cytometry: Advanced characterization of individual particle morphology. in *Flow Cytometry: Principles, Methodology and Applications*, ed. Papandreou S., Nova Science Publishers, New York, pp. 79–103 (2013).

Данная глава в книге «Проточная цитометрия: Принципы, Методология, Применения» посвящена сканирующему проточному цитометру. На обложке книги – фото прототипа данного прибора, разработанного в лаборатории цитометрии и биокинетики ИХКГ СО РАН.

3) Konokhova A.I., Chernova D.N., Moskalensky A.E., Strokotov D.I., Yurkin M.A., Chernyshev A.V., and Maltsev V.P. Super-resolved calibration-free flow cytometric characterization of platelets and cell-derived microparticles in platelet-rich plasma, *Cytometry A*. doi: 10.1002/cyto.a.22621 (2015)

В статье развита методика анализа микрочастиц и тромбоцитов крови с помощью сканирующего проточного цитометра. При этом, в отличие от существующих методов анализа, не требуется использование дорогостоящих моноклональных антител, а объём получаемой информации гораздо больше.

4) Moskalensky A.E., Strokotov D.I., Chernyshev A.V., Maltsev V.P., and Yurkin M.A. Additivity of light-scattering patterns of aggregated biological particles, *J. Biomed. Opt.* 19, 085004 (2014).

В статье рассмотрены подходы для изучения агрегации тромбоцитов с помощью сканирующего проточного цитометра.

5) Konokhova A.I., Gelash A.A., Yurkin M.A., Chernyshev A.V., and Maltsev V.P. High-precision characterization of individual *E. coli* cell morphology by scanning flow cytometry, *Cytometry A* 83A, 568–575 (2013).

В статье приведена методика высокоточного измерения морфологических характеристик бактерий *e. coli*. Метод может быть использован для изучения любых палочкообразных бактерий, в том числе определения резистентности к различным антибиотикам.

6) Moskalensky A.E., Yurkin M.A., Konokhova A.I., Strokotov D.I., Nekrasov V.M., Chernyshev A.V., Tsvetovskaya G.A., Chikova E.D., and Maltsev V.P. Accurate measurement of volume and shape of resting and activated blood platelets from light scattering. *J. Biomed. Opt.* 18, 017001 (2013).

В статье приведена методика высокоточного измерения объёма и формы тромбоцитов на сканирующем проточном цитометре. Показано, что методика позволяет детектировать активированные тромбоциты на основе изменения их формы, без использования моноклональных антител.

7) Konokhova A.I., Yurkin M.A., Moskalensky A.E., Chernyshev A.V., Tsvetovskaya G.A., Chikova E.D., and Maltsev V.P. Light-scattering flow cytometry for identification and characterization of blood microparticles. *J. Biomed. Opt.* 17, 057006 (2012).

В статье приведена методика анализа микрочастиц крови на сканирующем проточном цитометре. Показана возможность отделения микрочастиц от других составляющих плазмы крови, а также точного измерения их размера и плотности.

8) Strokotov D.I., Yurkin M.A., Gilev K.V., van Bockstaele D.R., Hoekstra A.G., Rubtsov N.B., and Maltsev V.P. Is there a difference between T- and B-lymphocyte morphology? *J. Biomed. Opt.* 14, 064036 (2009).

В статье приведена методика высокоточного измерения размера, ядерно-цитоплазматического отношения, плотности ядра и цитоплазмы мононуклеарных лейкоцитов с помощью сканирующего проточного цитометра.

9) Orlova D.Y., Yurkin M.A., Hoekstra A.G., and Maltsev V.P. Light scattering by neutrophils: model, simulation, and experiment. *J. Biomed. Opt.* 13, 054057 (2008).

В статье проведены теоретические и экспериментальные исследования рассеяния света нейтрофилами крови человека, обсуждаются возможные подходы к характеристике этих клеток с помощью сканирующего проточного цитометра.

10) Maltsev V.P., Hoekstra A.G., and Yurkin M.A. Optics of white blood cells: optical models, simulations, and experiments. in *Advanced Optical Flow Cytometry: Methods and Disease Diagnoses*, ed. Tuchin V.V., Wiley-VCH, Weinheim, pp.63–93 (2011)

Данная глава в книге «Расширенная оптическая проточная цитометрия: методы и диагностика заболеваний» рассматривает современные методы расширенного анализа лейкоцитов.

11) Yurkin M.A., Semyanov K.A., Tarasov P.A., Chernyshev A.V., Hoekstra A.G., and Maltsev V.P. Experimental and theoretical study of light scattering by individual mature red blood cells with scanning flow cytometry and discrete dipole approximation. *Appl. Opt.* 44, 5249–5256 (2005).

В статье проведены теоретические и экспериментальные исследования рассеяния света эритроцитами крови человека, обсуждаются подходы к характеристике этих клеток с помощью сканирующего проточного цитометра.

12) Chernyshev A.V., Tarasov P.A., Semianov K.A., Nekrasov V.M., Hoekstra A.G., and Maltsev V.P. Erythrocyte lysis in isotonic solution of ammonium chloride: Theoretical modeling and experimental verification *J. Theor. Biol.* 251 93–107 (2008)

В статье исследуется изменение характеристик эритроцитов в процессе их лизиса. Предложенная теоретическая модель подтверждена измерениями на сканирующем проточном цитометре.

Важнейшие работы, представленные на международных конференциях (готовятся к публикации):

13) E. Chernyshova, A. Chernyshev, D. Strokotov and V. Maltsev. The Increase of the Effective cdB3 Amount in Human Erythrocytes by Magnesium Sulfate Studied with Scanning Flow Cytometry. *CYTO 2015 – 30th Congress of ISAC*, 26–30 June 2015, Glasgow, UK, p.167

В данном исследовании показана связь между риском преждевременных родов и уникальным диагностическим параметром, определяемым в настоящее время только на сканирующем проточном цитометре – количеством активного белка cdB3 на мембране эритроцитов.

14) I. Khalo, D. Strokotov, A. Chernyshev and V. Maltsev. High-Precise Measuring of Morphological Changes in Mononuclear Cells during Early Stages of Apoptosis Using a Scanning Flow Cytometer. *CYTO 2015 – 30th Congress of ISAC*, 26–30 June 2015, Glasgow, UK, p.153

Детальное исследование апоптоза лимфоцитов крови человека с помощью сканирующего проточного цитометра, позволяющее разработать методику для определения новых диагностических параметров

15) A. Litvinenko, A. Moskalensky, V. Nekrasov, D. Strokotov and V. Maltsev. Real-Time Measurement of Platelet Shape Distribution with the Scanning Flow Cytometry *CYTO 2015 – 30th Congress of ISAC*, 26–30 June 2015, Glasgow, UK, p.185

Детальное исследование активации тромбоцитов с помощью сканирующего проточного цитометра, позволяющее разработать методику для определения новых диагностических параметров

Контакты:

Мальцев Валерий Павлович, профессор, д.ф.-м.н., зав. лабораторией Цитометрии и Биокинетики ИХКГ СО РАН, 630090 г. Новосибирск, ул. Институтская. Тел. +7-383-3333240, эл. почта: maltsev@kinetics.nsc.ru.