

УДК 618.293-07: 616.15-097

## АНАЛИЗ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИНФОРМАТИВНОСТИ НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ «ТЕСТ-SRY» И «ТЕСТ-RHD» ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ПОЛА И РЕЗУС-ФАКТОРА ПЛОДА

<sup>1</sup>Тороповский А.Н., <sup>2</sup>Никитин А.Г., <sup>3</sup>Жмырко Е.В., <sup>1</sup>Скороходов Л.С.,  
<sup>1</sup>Беляков А.В., <sup>4</sup>Викторов Д.А.

<sup>1</sup>ООО «ТестГен», Ульяновск, e-mail: director@testgen.ru;

<sup>2</sup>ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий» ФМБА России, Москва, e-mail: avialn@gmail.com;

<sup>3</sup>ООО «Джинэкт», Ульяновск, e-mail: andtor11@gmail.com;

<sup>4</sup>Научно-исследовательский инновационный центр микробиологии и биотехнологии, Ульяновск, e-mail: viktorov\_da@mail.ru

В данной статье представлены результаты обширных доклинических испытаний наборов реагентов «Тест-SRY» и «Тест-RHD» производства компании «ТестГен» для раннего неинвазивного определения пола и резус-фактора плода по крови беременной женщины. Проведён анализ данных, полученных в ходе мульти-центрового исследования на базе 11 лабораторий. В исследовании приняло участие 1817 беременных женщин, 1006 были проанализированы по полу плода и 811 – по резус-фактору плода (все женщины, участвовавшие в анализе резус-фактора плода, сами имели отрицательный резус-фактор). Установлены показатели: диагностическая точность, чувствительность, специфичность, положительная прогностическая ценность, отрицательная прогностическая ценность, а также доли ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

**Ключевые слова:** пренатальная диагностика, неинвазивная диагностика, ранняя диагностика, беременность, пол плода, резус-фактор, резус-конфликт, внеклеточная фетальная ДНК, SRY, RHD, ПЦР, молекулярная генетика, тест-система, ТестГен

## THE ANALYSIS OF INDICATORS INFORMATIVENESS FOR THE REAGENT KITS «TEST-SRY» AND «TEST-RHD» WHEN DETERMINING SEX AND FETAL RH FACTOR

<sup>1</sup>Toropovskiy A.N., <sup>2</sup>Nikitin A.G., <sup>3</sup>Zhmyrko E.V., <sup>1</sup>Skorokhodov L.S.,  
<sup>1</sup>Belyakov A.V., <sup>4</sup>Viktorov D.A.

<sup>1</sup>«TestGen», Ulyanovsk, e-mail: director@testgen.ru;

<sup>2</sup>FGBU «Federal Research Clinical Center of Federal Medical and Biological Agency of Russia, Moscow, e-mail: avialn@gmail.com;

<sup>3</sup>«GeNext», Ulyanovsk, e-mail: andtor11@gmail.com;

<sup>4</sup>Research Innovation Center of Microbiology and Biotechnology, Ulyanovsk, e-mail: viktorov\_da@mail.ru

This article presents the results of extensive preclinical testing of reagent kits «Test-SRY» and «Test-RHD», produced by «TestGen» for early non-invasive prenatal determining of fetal sex and Rh factor. Conducted an analysis of the data obtained in the course of a multicenter study of 11 remote laboratories results. The study involved 1,817 pregnant women. 1006 were analyzed for sex of the fetus and 811 – Rh of the fetus (all the women who participated in the analysis of rhesus fetus itself had a negative Rh factor). Established indicators: diagnostic accuracy, sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value, as well as the proportion of false-positive and false-negative results.

**Keywords:** prenatal diagnosis, non-invasive diagnosis, early diagnosis, pregnancy, sex of the fetus, Rh, Rh factor, cell-free fetal DNA, SRY, RHD, PCR, molecular genetics, test system, TestGen

В настоящее время бурно развиваются методы неинвазивной пренатальной диагностики (НИПД) [2, 4], основанные на анализе плодного материала, попадающего в материнский кровоток. Несомненно, доступ к генетической информации плода на раннем сроке беременности без риска и без неприятных процедур для матери и ребенка открывает огромные возможности для диагностики состояний и патологий плода.

«Тест-RHD» (производство ООО «ТестГен», Россия) разработан для определения резус-фактора плода у резус-отрицательных женщин с целью выявления риска развития резус-конфликта и его обоснованной профилактики [8]. Сегодня во многих странах мира, и в России в том числе, предполагается введение анти-D-иммуноглобулина всем резус-отрицательным беременным женщинам в профилактических целях снижения риска гемолитической болезни ново-

рожденных в текущей и последующих беременностях. Стоимость иммуноглобулина достаточно высока, некоторые производители получают его из препаратов донорской крови, что является небезопасным для женщин. Кроме того, сама процедура введения иммуноглобулина может сопровождаться нежелательными побочными эффектами: развитие реакции гиперчувствительности, анафилактический шок, артралгии и др. Однако, так как около 40% резус-отрицательных беременных женщин на самом деле носят резус-отрицательный плод, рутинное тестирование вкфДНК (внеклеточной фетальной ДНК) предотвращает излишнее использование анти-D-иммуноглобулина в этих случаях [5, 14, 17].

Основная цель определения пола плода на сроке от 7 недель беременности – удовлетворение интереса родителей. Кроме того, «Тест-SRY» (производства компании ООО «ТестГен», Россия) актуален при необходимости выявления угрозы развития заболеваний, сцепленных с полом, что открывает не только большие диагностические, но и терапевтические возможности [11]. Определение пола плода может быть полезным при назначении специальной терапии плода на этапе внутриутробного развития, например, для лечения некоторых эндокринных расстройств, таких как врожденная дисфункция коры надпочечников [9]. Традиционные инвазивные методы, применяемые для выявления заболеваний, сцепленных с полом, имеют высокие риски и не могут быть выполнены до 11 недель беременности, а по результатам УЗИ пол может быть определен лишь с 11 недели, что связано с развитием наружных половых органов [15].

#### Материалы и методы исследования

В данное исследование включены результаты двухлетней работы 11 государственных и частных лабораторий (табл. 1). Всего в исследовании приняло участие 1817 беременных женщин, для 1006 из которых было проведено тестирование вкфДНК с целью выявления гена SRY и 811 женщин были резус-отрицательными и исследовались на установление резус-фактора плода, отрицательный резус-фактор у беременных был определен серологически. Всеми женщинами было подписано информированное согласие на выполнение данных исследований. Все женщины имели одноплодную беременность и беременность подтверждалась на УЗИ, генетическое исследование проводили в период первого и второго триместров беременности. Протоколы выделения вкфДНК и последующей ПЦР-амплификации были стандартизированы во всех медицинских учреждениях, участвующих в данном исследовании.

**Подготовка образцов.** Свежие образцы венозной крови собирались в пробирки объемом 8 мл с EDTA-антикоагулянтом, плазму отделяли от кле-

ток путем центрифугирования при низкой скорости: 2500–3000 g в течение 10 минут, с последующим разделением плазмы и фрагментов клеток путем центрифугирования при 16000 g в течение 15 минут. Эти процедуры производились не позднее чем через 24 часа от момента отбора крови у беременной женщины с целью сокращения доли материнской ДНК в плазме, высвобождающейся из лейкоцитов. Супернатант отбирали в стерильные, свободные от ДНК пробирки и далее проводили непосредственно процедуру выделения вкфДНК.

**Выделение внеклеточной циркулирующей фетальной ДНК из плазмы крови беременной матери.** Из всех образцов плазмы беременных женщин, участвующих в данном исследовании, была выделена вкфДНК с использованием набора для выделения ДНК из плазмы «ДНК-Плазма-2» (производство ООО «ТестГен», Россия). Исключение составили исследования, проводимые в одной из лабораторий (см. данные ниже).

**Выявление резус-фактора плода, обнаружение гена RHD методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ).** С целью повышения специфичности анализа ПЦР-амплификацию проводили по трем разным регионам гена RHD (экзоны 6, 7, 10). Для определения RHD состояния плода ПЦР проводили с использованием набора «Тест-RHD» (производство ООО «ТестГен», Россия), данный набор содержит все необходимые для реакции буферы, ферменты, dNTP, специфические праймеры для амплификации каждого из выбранных экзонов и специфичные для них флуоресцентно меченные зонды. ПЦР-РВ проводили на различных ПЦР амплификаторах (ДТ96 и ДТ-Lite производство «ДНК-Технология», Россия, IQ5 и CFX от Bio-Rad, США, Rotor-Gene 6000 от Corbett Life Science, США). Конечный объем реакционной смеси составлял 20 мкл. Протокол амплификации (в соответствии с инструкцией) – 95°C в течение 5 минут, затем 50 циклов 94°C в течение 10 секунд и 62°C в течение 50 секунд. Параллельно проводили реакцию амплификации гена GAPDH с целью контроля выделения ДНК и прохождения ПЦР. Отрицательный контроль и положительный контроль – RHD-положительная геномная ДНК (присутствует в наборе «Тест-RHD» (ООО «ТестГен», Россия), были включены в каждую реакцию.

**Обнаружение гена SRY – маркера Y-хромосомы методом ПЦР-РВ.** По аналогии с выявлением гена RHD исследование полученных образцов вкфДНК проводили по гену SRY – маркеру Y-хромосомы, с применением набора «Тест-SRY» (ООО «ТестГен», Россия). Набор также содержал все необходимые для реакции буферы, ферменты, dNTP, специфические праймеры и флуоресцентно меченные зонды для локусов гена SRY. ПЦР-РВ проводили на тех же ПЦР-амплификаторах. Конечный объем реакционной смеси составлял 20 мкл. Протокол амплификации (в соответствии с инструкцией) – 95°C в течение 5 минут, затем 50 циклов 94°C в течение 10 секунд и 62°C в течение 50 секунд. Параллельно проводили амплификацию участка гена GAPDH с целью контроля выделения ДНК. Отрицательный контроль и положительный контроль реакции также ставились (присутствуют в наборе «Тест-SRY» (ООО «ТестГен», Россия)).

**Статистический анализ.** По результатам исследования были определены чувствительность, специфичность, положительная прогностическая

ценность (PPV), отрицательная прогностическая ценность (NPV), диагностическая точность. Эти параметры были вычислены с использованием сведений, полученных после родов.

### Результаты исследования и их обсуждение

Для всех беременных, принявших участие в данном исследовании, были получены качественные результаты, отвечающие

всем необходимым параметрам верного прохождения реакций (рисунок).

Из 1006 образцов, проанализированных по полу, в 59,24% (596 обр.) ген SRY выявлен не был и в 40,76% (410 обр.) был выявлен; по резус-фактору – из 811 проанализированных образцов 80,39% (652 обр.) оказались резус-положительными и 19,61% (159 обр.) резус-отрицательными (табл. 1).

Таблица 1

Распределение образцов вкфДНК, принявших участие в исследовании по полу и резус-фактору плода

	Всего	Мал.	%	Дев.	%
Исследования по полу плода	<b>1006</b>	<b>410</b>	<b>40,76</b>	<b>596</b>	<b>59,24</b>
	Всего	+	%	–	%
Исследования по резус-фактору плода	<b>811</b>	<b>652</b>	<b>80,39</b>	<b>159</b>	<b>19,61</b>

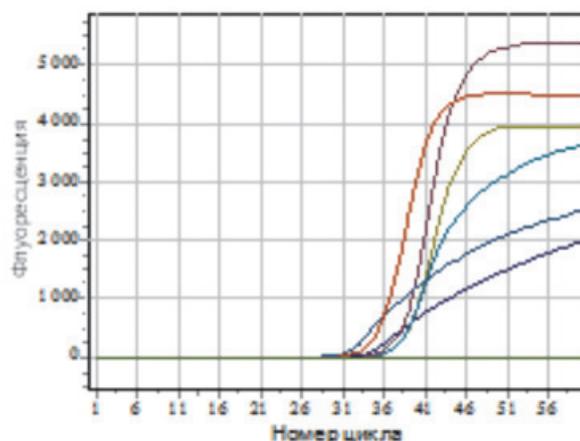
Программа амплификации: RHD\_SRY\_60cl\_6 (20мкл)

1. 95,0 °C - 05:00  
2. 94,0 °C - 00:10  
62,0 °C - 00:50

### Качественный анализ

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Ср. Fam	Ср. Hex	Результат
D3	G_Пациент1	34,0		+
D4	SRY_Пациент1	38,6		+
D5	SRY_Пациент1	37,8		+
D6	SRY_Пациент1	38,2		+
E4	G_+	31,6		+
E5	SRY_+	35,4		+
F4	G_-			-
F5	SRY_-			-

### Зависимость флуоресценции канала FAM от номера цикла



а

Примеры положительных результатов ПЦР-амплификации в режиме реального времени:  
а – «Тест-SRY» (ООО «ТестГен», Россия)

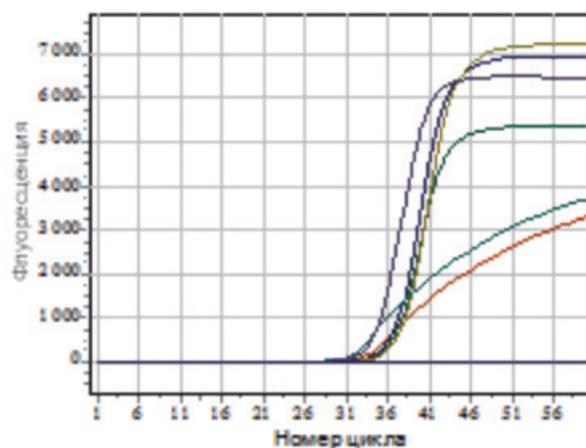
Программа амплификации: RHD\_SRY\_60cl\_6 (20мкл)

1. 95,0 °C - 05:00  
 2. 94,0 °C - 00:10  
 62,0 °C - 00:50 } \*60

**Качественный анализ**

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Ср. Fam	Ср. Hex	Результат
D1	GAPDH_Пациент2	33,4		+
D2	RHD_Пациент2	36,7		+
D3	RHD_Пациент2	36,7		+
D4	RHD_Пациент2	37,5		+
E2	GAPDH_+	31,5		+
E3	SRY_+	34,6		+
E6	GAPDH_-			-
E7	SRY_-			-

**Зависимость флуоресценции канала FAM от номера цикла**



б

Примеры положительных результатов ПЦР-амплификации в режиме реального времени:  
 б – «Тест-RHD» (ООО «ТестГен», Россия)

По результатам проведенного исследования «Тест-SRY» (производство ООО «ТестГен», Россия) имеет диагностическую точность 99,50%. «Тест-RHD» (производство ООО «ТестГен», Россия) – 97,90%. Чувствительность «Тест-SRY» составила 99,03%, а чувствительность «Тест-RHD» –

98,47%. Количество ложноположительных результатов «Тест-SRY» составило 1 (PPV: 99,76%) и ложноотрицательных 4 (NPV: 99,33%) (табл. 2, 3). Количество ложноположительных результатов «Тест-RHD» – 7 (PPV: 98,93%)\* и ложноотрицательных – 10 (NPV: 93,71%)\*\* (табл. 2, 3).

**Таблица 2**

Сводная таблица по результатам проведенного исследования

	Анализ SRY	Анализ RHD
Всего	1006	811
Выявлено	410 (40,76%)	652 (80,39%)
Не выявлено	596 (59,24%)	159 (19,61%)
Несовпадений среди выявленных	1 (0,24%)	7 (1,07%)*
Несовпадений среди невыявленных	4 (0,67%)	10 (6,29%)**
Всего несовпадений анализов	5 (0,50%)	17 (2,10%)

Таблица 3

## Основные общие аналитические характеристики использованных диагностических методик

	Анализ SRY	Анализ RHD
Диагностическая точность	99,50 %	97,90 %
Чувствительность	99,03 %	98,47 %
Специфичность	99,83 %	95,51 %
Доля ложноположительных результатов	0,10 %	0,86 %
Доля ложноотрицательных результатов	0,40 %	1,23 %
Положительная прогностическая ценность	99,76 %	98,93 %*
Отрицательная прогностическая ценность	99,33 %	93,71 %**

## Примечания:

\*Во всех случаях ложноположительных результатов несоответствия были сняты путём проведения генетических анализов детей после рождения, результаты показали наличие у них гена RHD.

\*\* Все ложноотрицательные результаты были получены в одной и той же лаборатории, где использовался метод выделения ДНК, не ориентированный на вкфДНК. Поэтому получение ложноотрицательных результатов мы связываем с обработкой этапа выделения ДНК.

Нами было проведено распределённое исследование по определению диагностической точности, чувствительности и специфичности набора «Тест-RHD» (ООО «ТестГен», Россия) для неинвазивного определения резус-фактора плода на основе анализа вкфДНК, выделенной из плазмы крови резус-отрицательных беременных матерей. В данном исследовании приняло участие 11 независимых лабораторий России и стран ближнего зарубежья (Казахстан и Украина), в нем участвовало 811 резус-отрицательных женщин. В проведенном нами исследовании диагностическая точность методики неинвазивного определения резус-фактора плода по крови беременной матери на сроках беременности от 9 недель составила 97,90%, чувствительность использованной методики составила 98,47%, специфичность – 95,51%. Безусловно, диагностическая точность, чувствительность и специфичность методики увеличиваются при увеличении срока беременности. Это обуславливается увеличением количества генетического материала плода в кровотоке матери. Так, по данным литературы, на сроке в 9 недель беременности лишь 1% от всей свободно циркулирующей внеклеточной ДНК является фетальной, а на сроке в 20 недель – около 7% [12].

При сравнении полученных результатов с аналогичными зарубежными исследованиями, очевидно, что полученные данные весьма схожи. Так, в одном из самых ранних сообщений по данному направлению, в статье Finning и соавт., диагностическая точность выбранной ими методики составила 97%, в исследование были включены 137 беременных первым ребенком женщин, фетальную ДНК авторам исследования удалось достоверно проанализировать только

на 11 неделе беременности [5]. Аналогичные данные были получены и в исследовании Hyland и др. в 2009 году [6].

В настоящем исследовании было получено 7 (0,86%) ложноположительных результатов и 10 (1,23%) ложноотрицательных результатов. Это сопоставимо с количеством ложноположительных и ложноотрицательных результатов в аналогичных исследованиях. Так, например, у Sedrak и соавт. сообщается о двух ложноположительных результатах для методики выявления генотипа резус-фактора плода у 90 D-отрицательных беременных женщин [18]. Javadi и соавт. сообщили об одном ложноположительном результате среди 72 резус-отрицательных женщин на сроке от 11 до 19 недель беременности [3].

Ложноположительные результаты могут быть объяснены тем, что генетически резус-фактор у плода положительный, но каким-то образом функция гена подавлена или ограничена, и серологически этот резус-фактор не определяется; также ложноположительные результаты могут свидетельствовать о наличии в геноме у плода так называемого псевдогена RhD [10]. Небольшое количество ложноположительных результатов не приведёт к серьезным клиническим проблемам, так только еще несколько матерей будет получать анти-RhD иммуноглобулин, а это на порядки меньше того количества беременных, которых сейчас необоснованно получают данную терапию.

В настоящем исследовании ложноотрицательные результаты были получены в 1,23%. В аналогичных исследованиях при достаточно большой выборке участников исследования авторы также выявляли от 1 до 2% ложноотрицательных результатов. Это может быть связано с нарушениями

гена GAPDH у матери, наличием точечных мутаций в гене RHD плода, индивидуально низким уровнем апоптоза клеток плода или присутствием в кровотоке матери ДНК плода прошлой беременности (например, если предыдущая беременность была менее чем за 3 месяца до настоящей), деградация ДНК на этапе выделения или хранения, неустойчивость продуктов ПЦР и др. [6, 7]. Ложноотрицательные результаты клинически более значимы, так, необнаружение резус-положительного плода повлечет отсутствие иммунопрофилактики матери и может увеличить риск развития ГБПиН (геморрагической болезни плода и новорожденного) [16]. Не следует также исключать и развитие аутоиммунной реакции у D-отрицательной матери с D-отрицательным плодом, это возможно менее чем у 0,5% таких беременных [10]. По результатам проведенных исследований стало очевидно, что применение неадаптированных методов выделения внеклеточной ДНК является первостепенной причиной получения ложноотрицательных результатов.

Настоящее исследование определения пола плода при помощи набора «Тест-SRY» показало точность и высокую надежность разработанного анализа уже с 7 недели беременности. Диагностическая точность составила 99,50%, чувствительность – 99,03%, специфичность – 99,83%. Это также весьма соотносится с данными, полученными в аналогичных работах. Так, в исследовании Zhao и Zou, Wataganara и соавт. и у Wright с соавт. чувствительность составила от 89 до 97% [1, 19, 20, 21], а в исследованиях Vrojer и соавт. и Scheffer с соавт. диагностическая точность также была выше 99% [13]. Эти расхождения могут быть связаны с различиями в способах выделения ДНК, с низкой концентрацией вкфДНК у разных беременных.

#### Заключение

Методики определения пола и резус-фактора плода по крови беременной женщины с применением наборов «Тест-SRY» и «Тест-RHD» (ООО «ТестГен», Россия) обладают высокими показателями диагностической точности, чувствительности и специфичности; являются легкими, простыми и надежными в исполнении и могут быть рекомендованы для применения в рутинной лабораторной практике.

#### Список литературы/References

1. Cell-free fetal DNA levels in maternal plasma after elective first trimester termination of pregnancy / T. Wataganara [et al.] // *Fertility and Sterility*. – 2004. – № 81. – P. 638–644.
2. Chiu R.W. Non-invasive prenatal diagnosis by fetal nucleic acid analysis in maternal plasma: the coming of age / R.W. Chiu, Y.M. Lo // *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*. – 2011. – № 16(2). – P. 88–93.

3. Comparison of different blood sample processing methods for sensitive detection of low level chimerism by RHD real-time PCR assay / A. Javadi [et al.] // *Chimerism*. – 2013. – № 4(1). – P. 9–14.
4. Daley R. Non-invasive prenatal diagnosis: progress and potential / R. Daley, M. Hill, L.S. Chitty // *ADC Fetal & Neonatal Edition*. – 2014. – № 99(5). – P. 426–430.
5. Effect of high throughput RHD typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD negative pregnant women: prospective feasibility study // K. Finning [et al.] // *BMJ*. – 2008. – № 336. – P. 816–818.
6. Evaluation of non-invasive prenatal RHD genotyping of the fetus / C.A. Hyland [et al.] // *MJA*. – 2009. – № 191. – P. 21–25.
7. Evaluation of two DNA extraction methods from maternal plasma for using in non-invasive bovine fetus gender determination / A. Davoudi [et al.] // *The Journal of Reproductive Medicine*. – 2012. – № 10(6). – P. 523–530.
8. Kolialexi A.L. Noninvasive fetal RhD genotyping from maternal blood / A.L. Kolialexi, G. Tounta, A. Mavrou // *Expert Rev Mol Diagn*. – 2010. – № 10(3). – P. 285–296.
9. New management strategy of pregnancies at risk of congenital adrenal hyperplasia using fetal sex determination in maternal serum: French cohort of 258 cases (2002–2011) / V. Tardy-Guidollet [et al.] // *JCEM*. – 2014. – № 99(4). – P. 1180–1188.
10. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal blood group phenotypes: current practice and future prospects / G. Daniels [et al.] // *Prenatal Diagnosis*. – 2009. – № 29. – P. 101–107.
11. Prospective register of outcomes of free-fetal DNA testing (PROOF) – results of the first year’s audit / L. Chitty [et al.] // *Newsletter of the British Society for Human Genetics*. – 2007. – № 37. – P. 8–9.
12. Quantification of cell-free DNA in normal and complicated pregnancies: overcoming biological and technical issues / I. Manokhina [et al.] // *PLoS One*. – 2014. – № 9(7). – e 101500.
13. Reliability of fetal sex determination using maternal plasma / P.G. Scheffer [et al.] // *Obstetrics & Gynecology*. – 2010. – № 115(1). – P. 117–126.
14. Routine fetal RHD genotyping with maternal plasma: a four-year experience in Belgium / J.M. Minon [et al.] // *Transfusion*. – 2008. – № 48. – P. 373–381.
15. Sonographic fetal sex determination / M. Odeh [et al.] // *Obstetrics & Gynecology Survey*. – 2009. – № 64. – P. 50–57.
16. Turner M.J. Detection of fetal rhesus D gene in whole blood of women booking for routine antenatal care / M.J. Turner, C.M. Martin, J.J. O’Leary // *EJOG*. – 2003. – № 108. – P. 29–32.
17. Use of cfDNA to avoid administration of anti-D to pregnant women when the fetus is RhD-negative: implementation in the NHS / P. Soothill [et al.] // *BJOG*. – 2014. – doi: 10.1111/1471-0528.13055.
18. Use of free fetal DNA in prenatal noninvasive detection of fetal RhD status and fetal gender by molecular analysis of maternal plasma / M. Sedrak [et al.] // *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*. – 2011. – № 15(9). – P. 627–631.
19. Wright C. Cell-free fetal nucleic acids for non-invasive prenatal diagnosis // Report of the UK expert working group. PHG Foundation. – 2009.
20. Wright C.F. The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis / C.F. Wright, H. Burton // *Human Reproduction Update*. – 2009. – № 15. – P. 139–151.
21. Zhao Y. Application of fetal DNA in maternal plasma in noninvasive prenatal diagnosis // Y. Zhao, L. Zou // *Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*. – 2004. – № 24. – P. 59–61.

#### Рецензенты:

Васильев Д.А., д.б.н., профессор, генеральный директор ООО «НИИЦМБ», г. Ульяновск;

Девяткин А.А., д.м.н., начальник отдела медицинской статистики и управления качеством, ГБУЗ «Самарская городская клиническая больница № 1 им. Н.И. Пирогова», г. Самара.

Работа поступила в редакцию 25.12.2014.