

2019-15-16

**Заявление  
о рассмотрении протокола клинической апробации**

1.	Наименование федеральной медицинской организации, научной или образовательной организации, осуществляющей деятельность в сфере охраны здоровья, являющейся разработчиком протокола клинической апробации	ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России
2.	Адрес места нахождения организации	117036, Москва, Дм.Ульянова д.11
3.	Контактные телефоны и адреса электронной почты	телефон - (499) 124 43 00 E-mail: nmic.endo@endocrincentr.ru
4.	Название предлагаемого для клинической апробации метода профилактики, диагностики, лечения и реабилитации	Клиническая апробация метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) для диагностики нарушений стероидогенеза и дефектов биосинтеза тестостерона у пациентов с нарушением формирования пола 46ХУ
5.	Число пациентов, необходимое для проведения клинической апробации	30

Приложение:

1. Протокол клинической апробации на 21 л.
2. Индивидуальная регистрационная карта наблюдения пациента в рамках клинической апробации на 5 л.
3. Согласие на опубликование протокола клинической апробации на официальном сайте Министерства в сети «Интернет» на 1 л.

Руководитель организации

и.о. директора ФГБУ «НМИЦ эндокринологии»  
Минздрава России

академик М.В.Шестакова

(должность, ф.и.о., подпись)

"18" февраля 2019 г.

**Согласие на опубликование протокола клинической апробации на  
официальном сайте Минздрава России в сети «Интернет»**

Я, Шестакова Марина Владимировна, и.о. директора ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России разрешаю на безвозмездной основе опубликовать протокол клинической апробации «Клиническая апробация метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) для диагностики нарушений стероидогенеза и дефектов биосинтеза тестостерона у пациентов с нарушением формирования пола 46XY».

и.о. директора  
ФГБУ «НМИЦ эндокринологии»  
Минздрава России, академик РАН

М.В.Шестакова



« 18 » февраля 2019 года

## ОПРОСНЫЙ ЛИСТ

**по протоколу клинической апробации для рассмотрения на заседании  
Экспертного совета Министерства здравоохранения Российской Федерации  
по вопросам клинической апробации методов профилактики, диагностики,  
лечения и реабилитации (далее – Экспертный совет)**

дата \_\_\_\_\_

Ф.И.О. члена Экспертного совета: \_\_\_\_\_ подпись \_\_\_\_\_

Наличие (отсутствие) конфликта интересов да:  нет:

№	Показатель	комментарии	
1.	Регистрационный номер протокола клинической апробации		
2.	Разработчик	ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России	
3.	Название метода клинической апробации	Клиническая апробация метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) для диагностики нарушений стероидогенеза и дефектов биосинтеза тестостерона у пациентов с нарушением формирования пола 46XY.	
4.	Профиль медицинской помощи	Эндокринология (детская)	
5.	Общее число пациентов, которым будет оказана медицинская помощь в рамках клин. апробации	30	
6.	Срок проведения клинической апробации	2019 – 2021 г.	
7.	Стоимость оказания медицинской помощи в рамках клинической апробации одному пациенту	88,1 тыс руб.	
<b>8. Экспертное мнение – <u>ненужное зачеркнуть</u></b>			
8.1	Разрешение на оказание медицинской помощи в рамках клинической апробации	Поддержать	Отклонить
8.2	Оценка финансовых затрат на оказание медицинской помощи по протоколу клинической апробации	Согласовать заявленную стоимость	Не согласовать заявленную стоимость
9	Подпись члена Экспертного совета		

Протокол  
клинической апробации метода профилактики, диагностики,  
лечения и реабилитации

Идентификационный № \_\_\_\_\_

Дата \_\_\_\_\_

**I. Паспортная часть**

- 1. Название предлагаемого к проведению клинической апробации метода профилактики, диагностики, лечения и реабилитации (далее - метод).**

Клиническая апробация метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) для диагностики нарушений стероидогенеза и дефектов биосинтеза тестостерона у пациентов с нарушением формирования пола 46XY.

- 2. Наименование и адрес федеральной медицинской организации, разработавшей протокол клинической апробации метода профилактики, диагностики, лечения и реабилитации (далее - протокол клинической апробации).**

ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России, г. Москва, ул. Дмитрия Ульянова, 11.

- 3. Фамилия, имя, отчество и должность лиц, уполномоченных от имени разработчика подписывать протокол клинической апробации.**

Шестакова Марина Владимировна, директор ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России, академик РАН.

## II. Обоснование клинической апробации метода

### 4. Аннотация метода.

Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) представляет собой сочетание жидкостного хроматографа, соединённого с tandemным масс-спектрометром через интерфейс ионизации при атмосферном давлении. В самом интерфейсе, который также называют источником ионизации, можно реализовать три вида ионизации: ионизация электрораспылением (ИЭР), химическая ионизация при атмосферном давлении (ХИАД) и фотоионизация при атмосферном давлении (ФИАД). Определение концентраций стероидных гормонов в крови основано на хроматографическом разделении низкомолекулярной липофильной части крови с последующим детектированием отдельных фракций при помощи tandemного масс-спектрометра с источником ХИАД в режиме мониторинга множественных реакций (ММР). Режим ММР представляет собой детектирование наиболее интенсивного и наиболее характерного фрагментного иона определяемого вещества, получаемого в результате принудительной фрагментации его молекулярного или псевдомолекулярного иона внутри tandemного масс-спектрометра. Выбор детектируемого фрагментного иона и параметры фрагментации определяются отдельно в ходе предварительной подготовки метода и зависят прежде всего от конструкции каждого конкретного масс-спектрометра и условий создаваемой в нём принудительной фрагментации. Использование данного подхода позволяет существенно повысить селективность анализа и в значительной степени нивелировать химический шум масс-спектрометра, что даёт возможность определять целевые вещества с крайне высокой чувствительностью (до единиц пмоль/л). Таким образом, методом ВЭЖХ-МС/МС удаётся надёжно и точно обнаруживать и определять концентрации сразу несколько компонентов в ходе одного анализа независимо друг от друга. Создание аналитического метода на основе ВЭЖХ-МС/МС стало логическим продолжением работы по определению уровней стероидных гормонов иммуноферментными методами. Следует отметить, что последние имеют существенный ряд ограничений, связанных с перекрёстными реакциями схожих по строению субстратов с антителами к определённому аналиту, что приводит к завышению итогового результата. Для некоторых врождённых патологий, таких как неклассические формы дефицита 21-гидроксилазы, это может привести к неверному определению уровня кортизола ввиду перекрёстного процесса с повышенным 21-дезоксикортизолом и неверной постановке диагноза. Определение таких стероидных гормонов, как кортикостерон, 11-дезоксикортизол, 17-гидроксипрегненолон и 21-дезоксикортизол, методом иммуноферментного анализа в принципе невозможно

из-за высокой кросс-реактивности с близкими по строению другими стероидными гормонами. Метод ВЭЖХ-МС/МС позволяет избегать подобных проблем за счёт более высокой селективности, которую обеспечивает хроматографическое разделение анализируемых компонентов и масс-спектрометрическое детектирование в режиме ММР.

Несмотря на явные преимущества данного метода перед иммуноферментными его использование в сфере здравоохранения РФ ограничено высокими требованиями к квалификации персонала.

**Основной профиль медицинской помощи по протоколу:** детская эндокринология

**Цель клинической апробации:** Оценка клинико-экономической эффективности и безопасности метода ВЭЖХ-МС/МС для диагностики нарушений стероидогенеза и биосинтеза тестостерона у пациентов с НФП 46XY.

**Заболевание:** (МКБ10: Q56.0, Q56.1, Q56.3, Q56.4, E25.0)

Нарушение формирования пола 46XY

**Половозрастная характеристика пациентов:**

Пациенты с кариотипом 46XY в возрасте 0 лет и <18 лет

**Форма оказания медицинской помощи:** плановая

**Вид оказания медицинской помощи:** специализированная

**Условия оказания медицинской помощи:** стационарно

## **5. Актуальность метода для здравоохранения, включая организационные, клинические и экономические аспекты**

НФП 46XY в результате дефектов стероидогенеза представляет собой клинически и этиопатогенетически гетерогенную группу заболеваний, обусловленную недостатком гормонов, синтез которых невозможен при данном ферментативном блоке, и избыточным накоплением предшественников. По данным литературы заболевание выявляется с частотой 1 на 5-10.000 новорожденных и проявляется нарушением формирования наружных гениталий с развитием тяжелой глюко- и/или минералокортикоидной недостаточности или злокачественной артериальной гипертензии.

Ключевыми аспектами ведения данных пациентов являются выбор оптимальной половой принадлежности и назначение заместительной гормональной терапии, превентирующей развитие жизнеугрожающих состояний.

В настоящее время установить нозологическую форму НФП 46XY, обусловленную нарушением стероидогенеза, рутинными методами не

представляется возможным. В отличие от наиболее распространённого метода иммуноферментного анализа ВЭЖХ-МС/МС обладает более высокой селективностью и позволяет анализировать широкий круг аналитов в ходе одного анализа (от 200 до 500 компонентов в зависимости от модели масс-спектрометра).

Метод эффективен и безопасен для пациента, т.к. является малоинвазивным, требуется только забор венозной крови.

Основным преимуществом данного метода является оптимизация схемы обследования пациентов с НФП, ранняя диагностика заболеваний, подбор гормональной терапии, достижение оптимального контроля за лечением данных пациентов.

Использование аналогичных методик за рубежом показало свою высокую эффективность.

#### **6. Новизна метода и/или отличие его от известных аналогичных методов.**

Метод ВЭЖХ-МС/МС был разработан на базе ФГБУ НМИЦ Эндокринологии Минздрава России. Нами впервые применена система полуавтоматической пробоподготовки в хроматографической системе, которая позволяет избегать существенной доли случайных погрешностей и экономить время, затрачиваемое персоналом на ручную подготовку проб.

Существующие зарубежные аналоги метода ВЭЖХ-МС/МС показали свою высокую эффективность в диагностике различных нарушений стероидогенеза в зарубежных исследованиях.

К недостаткам метода ВЭЖХ-МС/МС можно отнести только высокие требования к квалификации персонала.

#### **7. Краткое описание и частота известных и потенциальных рисков применения метода для пациентов, если таковые имеются, и прогнозируемых осложнений.**

Рисков и осложнений нет

**8. Ссылки на литературные источники публикаций результатов научных исследований метода или отдельных его составляющих (в том числе собственных публикаций) в рецензируемых научных журналах и изданиях, в том числе в зарубежных журналах (названия журналов/изданий, их импакт-фактор).**

1. P. Rubtsov, A. Nizhnik, I. Dedov, N. Kalinchenko, V. Petrov, A. Orekhova, P. Spirin, V. Prassolov<sup>1</sup> and A. Tiulpakov. Partial deficiency of 17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20-lyase caused by a novel missense mutation in the canonical cytochrome heme-interacting motif. *European Journal of Endocrinology* (2015) 172, K19–K25. Impact factor 4.333. doi: 10/1530/EJE-14-0834
2. M. Peitzsch, T. Dekkers, M. Haase, Fred C.G.J. Sweep, I. Quack, G. Antoch, G. Siegert, J.W.M. Lenders, J. Deinum, H. S. Willenberg, G. Eisenhofer. An LC–MS/MS method for steroid profiling during adrenal venous sampling for investigation of primary aldosteronism. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. (2014) 145, pp. 75–84. Impact factor 4.095. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.10.006>
3. G. Eisenhofer, T. Dekkers, M. Peitzsch, A. S. Dietz, M. Bidlingmaier, M. Treitl, T. A. Williams, S. R. Bornstein, M. Haase, L.C. Rump, H. S. Willenberg, F. Beuschlein, J. Deinum, J.W.M. Lenders and M. Reincke. Mass Spectrometry–Based Adrenal and Peripheral Venous Steroid Profiling for Subtyping Primary Aldosteronism. *Clinical Chemistry* (2016) 62:3, pp. 514–524. Impact factor 8.008. DOI: 10.1373/clinchem.2015.251199
4. Julie A. Ray, Mark M. Kushnir, Richard A. Yost, Alan L. Rockwood, A. Wayne Meikle. Performance enhancement in the measurement of 5 endogenous steroids by LC–MS/MS combined with differential ion mobility spectrometry. *Clinica Chimica Acta*. 438 (2015).330-336. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.07.036> Impact factor 2,869.
5. Y. Wang, G.D.Gay, J.C. Botelho, S.P.Caudill, Hubert W. Vesper. Total testosterone quantitative measurement in serum by LC-MS/MS. *Clinica Chimica Acta*. 436 (2014).263-267. Impact factor 2,869. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.06.009>
6. J. Grace Van Der Gugten, Daniel T. Holmes. Quantitation of Aldosterone in Serum or Plasma Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC- MS/MS). From book *Clinical applications of mass spectrometry in biomolecular analysis: methods and protocols* (p.37-46)
7. Stacie L. Rice, Robert C. Hale. Parameters for Ultra-Performance Liquid Chromatographic/Tandem Mass Spectrometric Analysis of Selected Androgens versus Estrogens in Aqueous Matrices. *Anal. Chem*. 2009, 81(16), 6716–6724. DOI: 10.1021/ac900134m. Impact factor 6,042.



## **9. Другие сведения, связанные с разработкой метода.**

нет

### **III. Цели и задачи клинической апробации**

#### **10. Детальное описание целей и задач клинической апробации.**

##### *Цель*

Оценка клинико-экономической эффективности и безопасности метода ВЭЖХ-МС/МС для диагностики нарушений стероидогенеза и биосинтеза тестостерона у пациентов с НФП 46ХУ.  
(МКБ10: Q56.0, Q56.1, Q56.3, Q56.4, E25.0)

##### *Задачи*

- Сравнить клиническую эффективность метода ВЭЖХ-МС/МС для диагностики нарушений стероидогенеза и биосинтеза тестостерона у пациентов с НФП 46ХУ
- Сравнить экономическую эффективность метода ВЭЖХ-МС/МС для диагностики нарушений стероидогенеза и биосинтеза тестостерона у пациентов с НФП 46ХУ

### **IV. Дизайн клинической апробации**

#### **11. Научная обоснованность и достоверность полученных на стадии разработки метода данных, включая доказательства его безопасности.**

Нарушение формирования пола (НФП) - это состояние, связанное с клинико-биохимическим проявлением несоответствия между генетическим, гонадным и фенотипическим полом ребенка.

НФП 46ХУ условно можно разделить группы: гонадный дисгенез, нарушение стероидогенеза и биосинтеза тестостерона, и нарушение периферического действия тестостерона, каждая из этих групп включает множество нозологических форм.

Особенно сложной в диагностическом плане является группа НФП, сопровождающаяся нарушениями стероидогенеза в надпочечниках и гонадах, что может приводить при одних нозологических формах к развитию глюко- и минералокортикоидной недостаточности, при других к развитию тяжелой гипертонии, а также задержке полового развития на фоне снижения выработки тестостерона.

Предлагаемый протокол клинической апробации включает применение инновационного метода гормонального обследования - высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим

детектированием (ВЭЖХ-МС/МС). В настоящее время это единственный точный метод определения спектра стероидов в крови, который позволяет установить уровень ферментативного блока и поставить диагноз.

Использование данных методов диагностики позволит точно верифицировать диагноз, избежать развития не только жизнеугрожающих осложнений, но и фатальных ошибок в выборе половой принадлежности ребенка, прогнозировать течение заболевания и, следовательно, персонифицировать план наблюдения за пациентом.

В настоящее время существуют и другие методы верификации диагноза – методы молекулярно-генетической диагностики, однако данные методики существенно более дорогостоящие и длительные по времени выполнения анализа, срок исполнения может составлять несколько месяцев. Так стоимость исследования панели генов на заболевания ассоциированные с нарушением формирования пола составляет около 35000 руб, а исследование экзона около 60000 руб, тогда, как стоимость анализа одного образца крови методом ВЭЖХ-МС/МС составляет около 5000 руб.

Проведение анализа методом ВЭЖХ-МС/МС не требует больших временных затрат, анализ готов в тот же день, когда и поставлен на прибор.

## **12. Описание дизайна клинической апробации должно включать в себя:**

### **12.1. Указание основных и дополнительных (при наличии) исследуемых параметров, которые будут оцениваться в ходе клинической апробации;**

1. Оценка медицинского анамнеза
2. Физикальные показатели:
  - Рост, вес, SDS роста, SDS веса, SDS ИМТ, стигмы дисэмбриогенеза, описание гениталий, оценка маскулинизации (по Прадеру), половое развитие по шкале Таннера.
3. Общеклинические исследования: общий анализ крови, общий анализ мочи, биохимический анализ крови (натрий, калий, глюкоза, АЛТ, АСТ, холестерин общий, общий билирубин, общий белок, мочевины, креатинин, общий кальций, фосфор, сывороточное железо, щелочная фосфатаза)
4. Гормональные показатели:
  - ВЭЖХ-МС/МС
  - Прямой ренин (или активность ренина плазмы), АКТГ
  - СССГ, ЛГ, ФСГ, ингибин В, АМГ
5. Электрокардиография
6. УЗИ органов малого таза, мошонки, надпочечников
7. Определение «костного возраста» по данным рентгенографии кистей рук;

**12.2. Описание дизайна клинической апробации с графической схемой (этапы и процедуры, а также сроки и условия их проведения, иное);**

Всего в апробацию метода будет включено 30 пациентов.

Группа 1 (исследуемая группа): будут составлять пациенты с ИФП 46ХУ, которым будет проводиться исследование включающее определение стероидного профиля методом ВЭЖХ-МС/МС базально и на пробе с ХГЧ (см. блок-схему).

Группа 2 (группа сравнения): будут составлять пациенты с ИФП 46ХУ, которым диагноз установлен при проведении молекулярно-генетического исследования.

	Период включения в апробацию	Визит 1 (госпитализация) срок 7 дней
	Срок набора пациентов 24 месяца	
Критерии включения/ не включения	X	
Получение письменного информированного согласия	X	
Оформления врачебной комиссии	X	
Физикальный осмотр		X
Антропометрия		X
Оценка маскулинизации (по Прадеру)		X
Оценка стадии полового развития по Таннеру		X
Общий анализ крови		X
Общий анализ мочи		X
Биохимический анализ крови: Na, K, глюкоза, АЛТ, АСТ, холестерин общий, общий билирубин, общий белок, мочевины, креатинин, общий Са, Р, Fe, щелочная фосфатаза		X
Гормональный профиль базальный: прямой ренин, АКГГ методом ИФА		X
Стероидный профиль методом ВЭЖХ-МС/МС базальный		X
СССГ, ЛГ, ФСГ, ингибин В, АМГ		X
Стероидный профиль методом ВЭЖХ-МС/МС на фоне 3х дневной пробы с ХГЧ		X
Электрокардиография		X
УЗИ органов малого таза		X
УЗИ органов мошонки		X
УЗИ надпочечников		X
Рентгенография кистей		X
Анализ полученных данных, разработка и внедрение протокола использования ВЭЖХ-МС/МС		X

### 12.3. Описание метода, инструкции по его проведению;

Метод представляет собой определение концентраций стероидных гормонов, сконцентрированных в низкомолекулярной липофильной части сыворотки крови. Для этого сыворотку крови обрабатывают метанолом и 0.1М раствором сульфата цинка. После отделения осадка белковой и основной липидной составляющей образцы помещают в хроматографическую систему, адаптированную под твердофазную экстракцию on-line. Далее в хроматографической системе каждый образец подвергается очистке и хроматографическому разделению на обращено-фазовой колонке. Разделённые фазы детектируются на выходе из колонки при помощи тандемного масс-спектрометра с источником химической ионизации при атмосферном давлении. Для количественного анализа используется метод внутреннего стандарта. В качестве внутренних стандартов применяются образцы стероидных гормонов, имеющих стабильные изотопные метки ( $^2\text{H}$  и/или  $^{13}\text{C}$ , не менее трёх атомов). Их в одинаковых известных количествах добавляют в каждый образец (в отн числе градуировочные и контрольные) для нивелирования всех возможных погрешностей, связанных с любыми манипуляциями с образцом. Градуировка прибора по концентрациям осуществляется при помощи градуировочных образцов (не менее 8 точек), состоящих из очищенной от стероидов сыворотки крови, в которую добавлены все анализируемые компоненты в известных количествах, охватывающих область их возможных концентраций в анализируемых образцах. Для подтверждения точности градуировки и надёжности метода используются образцы контроля качества, приготовленные аналогичным образом.

**Блок-схема анализа:**



## **Блок-схема проведения клинической апробации**

### **Этап 1. Скрининг пациентов, формирование исследуемой группы, оценка по критериям включения**

- Создание выборки пациентов с неправильным строением наружных гениталий и кариотипом 46XY.
- Повышение уровня АКТГ или данные о близкородственном браке у родителей

### **Этап 2. Госпитализация**

- Оценка медицинского анамнеза
- Антропометрия, физикальный осмотр, оценка стадии полового развития
- Общеклинические исследования: общий анализ крови, общий анализ мочи, биохимический анализ крови
- Исследование гормонального профиля
- 1) Исследование базальных показателей:  
прямой ренин (активность ренина плазмы, АКТГ)  
стероидный профиль методом ВЭЖХ-МС/МС  
СССГ, ЛГ, ФСГ, ингибин В, АМГ методом ИФА или ИХЛА
- 2) Исследований показателей на фоне трехдневной пробы с ХГЧ:  
стероидный профиль методом ВЭЖХ-МС/МС
- Электрокардиография
- Проведение УЗИ органов малого таза, мошонки, надпочечников
- Рентгенография кистей рук
- Анализ полученных данных, разработка и внедрение протокола использования ВЭЖХ-МС/МС

**12.4. Ожидаемая продолжительность участия пациентов в клинической апробации, описание последовательности и продолжительности всех периодов клинической апробации, включая период последующего наблюдения, если таковой предусмотрен;**

Общая продолжительность участия пациентов в клинической апробации:

24 месяца +/- 3 месяца

Период включения пациентов в исследование – продолжительность набора пациентов 24 мес.

Запланированный срок исследования 2019-2021 гг.

Каждый пациент будет госпитализирован для обследования на 7 дней

В течение этого периода будут выполнены следующие действия:

- физикальное обследование;
- антропометрия;
- оценка степени маскулинизации по Прадеру, оценка стадии полового развития по шкале Таннер
- Лабораторно-инструментальное обследование (см. таблицу):

- Общеклинические исследования (общий анализ крови, мочи, биохимический анализ крови)
- Гормональный профиль:  
прямой ренин плазмы, АКТГ, СССГ, ЛГ, ФСГ, Ингибин В, АМГ
- Базальный стероидный профиль методом ВЭЖХ-МС/МС
- Исследования показателей на фоне трехдневной пробы с ХГЧ:  
Стероидный профиль методом ВЭЖХ-МС/МС
- Проведение УЗИ органов малого таза, мошонки, надпочечников
- Рентгенография кистей
- Электрокардиография
- Запись всех данных в ИРК
- Анализ полученных данных, разработка плана наблюдения и лечения

**12.5. Перечень данных, регистрируемых непосредственно в индивидуальной регистрационной карте клинической апробации метода (без записи в медицинской документации пациента) и рассматриваемых в качестве параметров, указанных в пункте 12.1 настоящего протокола клинической апробации.**

1. Паспортные данные пациента
2. Рост, SDS роста
3. Вес, SDS веса, SDS ИМТ, S поверхности тела
4. Описание наружных гениталий, в том числе и оценка вирилизации/маскулинизации по шкале Прадера
5. Стадия полового развития по шкале Таннер
6. Уровень прямого ренина плазмы
7. Уровень АКТГ
8. Уровень ЛГ, ФСГ, СССГ, ингибина В, АМГ крови

9. Результаты стероидного профиля методом ВЭЖХ-МС/МС базальные показатели
10. Результаты стероидного профиля методом ВЭЖХ-МС/МС на фоне трехдневной пробы с ХГЧ
11. Биохимические показатели крови: К, Na, холестерин общий, билирубин общий, белок общий, креатин, мочевины, глюкоза, АЛТ, АСТ, Са общий, железо, фосфор, ЩФ
12. Общеклинический анализ крови
13. Общий анализ мочи
14. Рентгенография кистей рук
15. УЗИ органов малого таза, мошонки
16. УЗИ надпочечников

#### **V. Отбор и исключение пациентов, которым оказывается медицинская помощь в рамках клинической апробации**

##### **13. Критерии включения пациентов.**

1. Возраст от 0 до 18 лет
2. Пациенты с неправильным строением наружных гениталий
3. Пациенты с кариотипом 46XY
4. Пациенты с повышенным уровнем АКТГ и/или рожденные от родителей состоящих в близкородственном браке
5. Желание принимать участие в процедурах клинической апробации в согласии с протоколом;
6. Информированное согласие.

##### **14. Критерии не включения пациентов.**

1. Пациенты с изолированным крипторхизмом
2. Пациенты с признаками дисгенезии гонад, наличием матки по данным УЗИ выполненном в специализированном учреждении

##### **15. Критерии исключения пациентов из клинической апробации**

1. Отказ от проведения клинической апробации по собственному согласию
2. Нарушение протокола клинической апробации
3. Возникновение клинически значимых, острых заболеваний сердечно-сосудистой, нервной, мочеполовой систем, желудочно-кишечного тракта и заболеваний крови.

Пациенты имеют право отказаться от продолжения участия в клинической апробации в любое время и по любой причине, включая причины личного характера. Врачи также имеют право исключить пациентов из клинической апробации в случае нарушения протокола или появления критериев для исключения. Врачи должны заполнить раздел отказа от участия в клинической апробации в ИРК с объяснением причины отказа.



## VI. Медицинская помощь в рамках клинической апробации

### 16. Вид, форма и условия оказания медицинской помощи.

Вид медицинской помощи: медицинская помощь в рамках клинической апробации

Форма: плановая.

Условия оказания медицинской помощи: стационарно

### 17. Перечень медицинских услуг (медицинских вмешательств).

#### Перечень медицинских услуг (медицинских вмешательств).

Наименование услуги
Осмотр пациента в приемном отделении
Прием (осмотр, консультация) врача-детского эндокринолога первичный, к.м.н.
Прием (осмотр, консультация) врача-хирурга-андролога первичный, к.м.н.
Один день в четырехместной палате
Измерение антропометрических показателей
Взятие крови из периферической вены
Исследование общеклинического анализа крови
Исследование общего анализа мочи
Исследование уровня глюкозы в сыворотке крови
Исследование уровня калия в сыворотке крови
Исследование уровня натрия в сыворотке крови
Исследование уровня общего холестерина в сыворотке крови
Исследование уровня общего кальция в сыворотке крови
Исследование уровня железа в сыворотке крови
Исследование уровня фосфора в сыворотке крови
Исследование уровня щелочной фосфатазы в сыворотке крови
Исследование уровня общего билирубина в сыворотке крови
Исследование уровня общего белка сыворотки крови
Исследование уровня креатинина крови
Исследование уровня мочевины крови
Исследование уровня аланинаминотрансферазы (АЛТ) в сыворотке крови
Исследование уровня аспаратаминотрансферазы (АСТ) в сыворотке крови
Исследование уровня лютеинизирующего гормона (ЛГ) в сыворотке крови

Исследование уровня фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) в сыворотке крови
Исследование уровня СССГ в сыворотке крови
Исследование уровня АМГ в сыворотке крови
Исследование уровня ингибина В в сыворотке крови
Исследование прямого ренина крови
Исследования АКТГ плазмы крови
Исследование стероидного профиля методом ВЭЖХ-МС/МС базальный
Проведение 3 дневной пробы с ХГЧ
Исследование стероидного профиля методом ВЭЖХ-МС/МС на пробе с ХГЧ
Электрокардиография
Рентгенография кистей рук
УЗИ органов малого таза и паховых каналов
УЗИ надпочечников

**18. Лекарственные препараты для медицинского применения, дозировка, частота приема, способ введения, а также продолжительность приема, включая периоды последующего наблюдения:**

**Пациентам с уточненным диагнозом назначается следующая терапия:**

1. Гидрокортизон (10 мг) 12-15 мг/м<sup>2</sup>/сутки, суточная доза должна быть разделена на 3 приема, постоянно по жизненным показаниям
2. Флудрокортизон (0,1 мг) 100-200 мкг в сутки, суточная доза должна быть разделена на 2 приема, в постоянном режиме

**наименования специализированных продуктов лечебного питания, частота приема, объем используемого продукта лечебного питания не используются;**

**перечень используемых биологических материалов - нет;**

**наименования медицинских изделий, в том числе имплантируемых в организм человека; и иное - нет.**

## **VII. Оценка эффективности**

### **19. Перечень показателей эффективности.**

Подтверждение нарушений стероидогенеза и дефектов биосинтеза тестостерона у пациентов с НФП 46ХУ по данным стероидного профиля, определенного методом ВЭЖХ-МС/МС

## **20. Перечень критериев дополнительной ценности**

1. Уровень АКТГ
2. Уровень ингибина В и АМГ
3. УЗИ органов мошонки и малого таза

## **21. Методы и сроки оценки, регистрации, учета и анализа параметров эффективности.**

Оценка показателей эффективности будет проводиться после проведения полного обследования.

Регистрация и учет показателей эффективности будет проводиться в ИРК пациентов. Анализ параметров эффективности будет проводиться по окончании исследования с использованием заранее определенных статистических методов.

## **VIII. Статистика**

### **22. Описание статистических методов, которые предполагается использовать на промежуточных этапах анализа клинической апробации и при ее окончании. Уровень значимости применяемых статистических методов.**

Статистический анализ данных будет выполняться с использованием пакета прикладных программ.

Описательная статистика количественных признаков будет представлена средними и средне-квадратическими отклонениями (в формате  $M(SD)$ ; в случае нормальных распределений) либо медианами и квартилями (в формате  $Me [Q1; Q3]$ ), описательная статистика качественных признаков - абсолютными и относительными частотами. Для анализа соответствия распределений количественных признаков нормальному закону будет применяться критерий Шапиро-Уилка.

Для сравнения несвязанных групп по количественным и порядковым признакам будет использован тест Манна-Уитни, ANOVA Краскел-Уоллиса, для сравнения связанных групп – тест Вилкоксона и ANOVA Фридмена. Сравнение несвязанных групп по качественным признакам будет проводиться с использованием теста Хи-квадрат и точного критерия Фишера.

Пороговый уровень статистической значимости принят равным 0,05. При необходимости будет применяться поправка на множественные сравнения (Бонферрони, Бенджамини-Хохберга).

95% доверительные интервалы (ДИ) для долей будут рассчитаны методом Клоппера-Пирсона.

При анализе точности диагностического теста будут рассчитаны чувствительность и специфичность относительно референсного метода, а также их 95% ДИ. В случае обеспечения соответствия долей позитивных и негативных

случаев реальной практике также будут рассчитаны прогностические ценности положительного и отрицательного результата диагностического теста и их 95% ДИ.

**23. Планируемое количество пациентов, которым будет оказана медицинская помощь в рамках клинической апробации с целью доказательной эффективности апробируемого метода. Обоснование численности пациентов, включая расчеты для обоснования статистической мощности и клинической правомерности клинической апробации.**

Расчет минимально необходимых объемов групп выполнен на основании следующих параметров:

- 1) основной (первичный) критерий оценки эффекта: прогностическая ценность положительного результата (доля правильных положительных результатов диагностического теста) (ПЦПР)
- 2) статистическая мощность - 80%,
- 3) уровень статистической значимости – 5%,
- 4) ожидаемая величина критерия ПЦПР оценки эффекта 70%.

Исходя из указанных параметров, число пациентов, которых необходимо включить: 30.

Для доказательства эффективности протокола необходимо набрать 30 пациентов. В 2019 году планируется набор 5 пациентов, в 2020 - 15 пациентов; в 2021 году будет включено 10 пациентов.

Ожидаемый ПЦПР - 70% [51%;85%]

## **IX. Объем финансовых затрат**

Для определения норматива финансовых затрат произведена оценка стоимости медицинских изделий и лекарственных препаратов, применяемых при апробации. Стоимость медицинских изделий и препаратов определена путем анализа информации, предоставленной в сети интернет, на официальном сайте Госзакупок, или же на официальном сайте производителя изделия/препарата, предусмотренное протоколом апробации. Помимо прямых расходов также учтены косвенные расходы, связанные с содержанием помещений (коммунальные услуги, уборка, техническое обслуживание и т.д.) для осуществления необходимых манипуляций, с работой вспомогательного персонала, административно-хозяйственных служб.

### **24. Описание применяемого метода расчета объема финансовых затрат.**

Для определения норматива финансовых затрат произведена оценка стоимости медицинских изделий и лекарственных препаратов, применяемых при апробации. Помимо прямых расходов также учтены косвенные расходы,

связанные с содержанием помещений (коммунальные услуги, уборка, техническое обслуживание и т.д.) для осуществления необходимых манипуляций, с работой вспомогательного персонала, административно-хозяйственных служб.

**Затраты на оказание единицы i-той услуги (Z<sub>i</sub>) определяются по формуле:**

$Z_i = (Z_{от} + Z_{рм} + Z_{ус} + Z_{си} + Z_{ин}) / Q_i$ , где

**Q<sub>i</sub>** - планируемое количество (объем) единиц оказания i-той государственной услуги, **Z<sub>от</sub>** - планируемые затраты по оплате труда и начислениям на выплаты по оплате труда персонала, **Z<sub>рм</sub>** - планируемые затраты на приобретение расходных материалов, связанных с оказанием услуги на основе расходов: из КОСГУ 340 – сырье, материалы, медикаменты, продукты питания, готовая продукция и т.д., **Z<sub>ус</sub>** - планируемые затраты на услуги, связанные с оплатой услуг связи, транспорта и прочих услуг рассчитываются на основе расходов: по КОСГУ 221, КОСГУ 222, **Z<sub>си</sub>** - планируемые затраты на услуги, связанные с оплатой коммунальных услуг, и иные затраты, связанные с использованием имущества на основе затрат:

- на потребление тепловой энергии в размере не менее 50% от общего объема планируемых затрат на оплату указанного вида коммунальных платежей (из КОСГУ 223);
- на водоснабжение и водоотведение в размере не менее 80% от общего объема планируемых затрат на оплату указанного вида коммунальных платежей (из КОСГУ 223);
- на потребление электрической энергии в размере не менее 50% от общего объема планируемых затрат на оплату указанного вида коммунальных платежей (из КОСГУ 223);
- на потребление газа в размере не менее 50% в случае газового отопления или 100% в иных случаях от общего объема планируемых затрат на оплату указанного вида коммунальных платежей (из КОСГУ 223);
- на содержание особо ценного движимого имущества из КОСГУ 225 – не менее 70% планируемых на 2018-2020 год затрат: техническое обслуживание, ремонт оборудования, настройка инструментов и т.д.);

**Z<sub>ин</sub>** - иные планируемые на 2018, 2019, 2020 год затраты, связанные с оказанием услуги.

**25. Предварительный расчет объема финансовых затрат на оказание медицинской помощи в рамках клинической апробации 1 пациенту, который включает:**

перечень медицинских услуг (наименования и кратность применения); перечень используемых лекарственных препаратов для медицинского применения (наименования и кратность применения), зарегистрированных в Российской Федерации в установленном порядке; перечень используемых медицинских изделий, в том числе имплантируемых в организм человека, зарегистрированных

в Российской Федерации в установленном порядке; перечень используемых биологических материалов (кровь, препараты крови, гемопоэтические клетки, донорские органы и ткани); виды лечебного питания, включая специализированные продукты лечебного питания; иное.

**Услуги (источник сведений о стоимости):**

[https://www.endocrincentr.ru/sites/default/files/all/price/11.02.19/Price\\_11.02.2019.xlsx](https://www.endocrincentr.ru/sites/default/files/all/price/11.02.19/Price_11.02.2019.xlsx)

№ п/п	Наименование	Цена, руб.	Кратность	Стоимость рублей
1.	Койко-день в четырех-местной палате	2500	6	15000
2.	Прием (осмотр, консультация) врача-эндокринолога	2600	1	2600
3.	Печатная продукция (медицинская документация)	300	1	300
4.	Ультразвуковое исследование надпочечников	1500	1	1500
5.	Ультразвуковое исследование органов мошонки	2500	1	2500
6.	Ультразвуковое исследование матки и придатков трансабдоминально	2200	1	2200
7.	Электрокардиография с расшифровкой	1000	1	1000
8.	Рентгенография кистей с лучезапястными суставами	1500	1	1500
9.	Общеклинический анализ крови (гемоцитогрaмма+СОЭ)	750	1	750
10.	Общий анализ мочи	330	1	330
11.	Исследование уровня аланинаминотрансферазы (АЛТ)	250	1	250
12.	Исследование уровня аспаратаминотрансферазы (АСТ)	250	1	250
13.	Глюкоза сыворотки крови	250	1	250
14.	Общий билирубин сыворотки крови	250	1	250
15.	Общий холестерин сыворотки крови	250	1	250
16.	Кальций общий сыворотки крови	250	1	250
17.	Фосфор общий сыворотки крови	250	1	250
18.	Белок общий сыворотки крови	210	1	210
19.	Мочевина сыворотки крови	250	1	250
20.	Креатинин сыворотки крови	250	1	250
21.	Натрий/калий/хлор сыворотки крови	250	1	250
22.	Щелочная фосфатаза сыворотки крови	250	1	250
23.	Ингибин В сыворотки крови	1300	1	1300
24.	17-гидроксипрогестерон в крови	700	1	700
25.	Адренкортикотропный гормон плазмы крови	720	1	720
26.	Ренин (прямой) плазмы крови	960	1	960
27.	Дегидроэпиандростерона-сульфат (ДГЭА-С) сыворотки крови	700	1	700

28.	Антимюллеров гормон (АМГ)	1200	1	1200
29.	Лютеинизирующий гормон (ЛГ) сыворотки крови	600	1	600
30.	Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) сыворотки крови	600	1	600
31.	Сексстероидсвязывающий глобулин (СССГ)	1200	1	1200
32.	Исследование спектра стероидных гормонов с использованием тандемной хроматомасс-спектрометрии (мультистероидный анализ)	4000	2	8000
33	Одень день питания сопровождающего лица в стационаре	1100	6	6600
34	Первичный осмотр больного в приемном отделении	500	1	500
	ИТОГО			51720

**Перечень используемых лекарственных препаратов для медицинского применения, зарегистрированных в Российской Федерации в установленном порядке**

Источник сведений о стоимости (<https://grls.rosminzdrav.ru/default.aspx>)

№ п/п	Международное непатентованное наименование	Стоимость 1 дозы, руб.	Среднее количество доз на пациента	Цена 1 курса лечения препаратом руб.	Количество пациентов, получающих препарат, чел.	Общая стоимость рублей
1.	Гонадотропин хорионический	303,75	3	911,25	30	27337,5

Стоимость апробации метода в одном случае составляет **88,1 тыс. руб.** Планируемое количество случаев апробации – 30 пациентов.

Общая стоимость апробации составит **2 643 тысяч руб.** (два миллиона четыреста девяносто шесть тысяч рублей), в том числе:

в **2019** году - 5 пациентов на сумму **440,5** тыс. руб.,

в **2020** году – 15 пациентов на сумму **1321,5** тыс. руб.,

в **2021** году – 10 пациента на сумму **881,0** тыс. руб.

Таким образом, исходя из количества участников клинической апробации (30 пациентов) и стоимости затрат на одного пациента общая стоимость финансовых затрат составит **2 643 тысячи рублей.**

**Расчет стоимости одного пациента по протоколу клинической апробации метода профилактики, диагностики, лечения или реабилитации.**

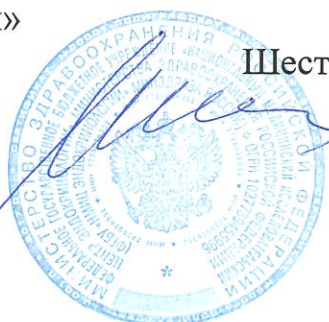
Наименование расходов	Сумма (тыс. рублей)

Наименование расходов	Сумма (тыс. рублей)	
Затраты на оплату труда с начислениями на выплаты по оплате труда работников, непосредственно связанных с оказанием медицинской помощи по каждому протоколу клинической апробации	54,1	61,4%
Затраты на приобретение материальных запасов (лекарственных препаратов, медицинского инструментария, реактивов, химикатов, мягкого инвентаря, прочих расходных материалов, включая импланты, вживляемые в организм человека, других медицинских изделий) и особо ценного движимого имущества, потребляемого (используемых) в рамках оказания медицинской помощи по каждому протоколу клинической апробации	25,6	29,1%
Иные затраты, непосредственно связанные с реализацией протокола клинической апробации	0	-
Затраты на общехозяйственные нужды (коммунальные услуги, расходы на содержание имущества, связь, транспорт, оплата труда с начислениями на выплаты по оплате труда работников, которые не принимают непосредственного участия в реализации протокола клинической апробации.	8,4	9,5%
4.1 из них расходы на оплату труда с начислениями на выплаты по оплате труда работников, которые не принимают непосредственного участия в реализации протокола клинической апробации	5,0	
<b>Итого стоимость 1 пациента:</b>	<b>88,1</b>	<b>100%</b>

Директор ФГБУ «НМИЦ эндокринологии»  
Минздрава России, академик РАН

Шестакова М. В

"18" февраля 2019 г.





Приложение к протоколу клинической апробации:

*«Апробация метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) для диагностики нарушений стероидогенеза и дефектов биосинтеза тестостерона у детей с нарушением формирования пола 46XY»*

## ИНДИВИДУАЛЬНАЯ РЕГИСТРАЦИОННАЯ КАРТА

Инициалы  
пациента

Номер пациента

## Оценка исходных параметров

ДАТА: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

<b>ФАМИЛИЯ ИМЯ ОТЧЕСТВО</b> пациента	
<b>Дата рождения:</b>	___ / ___ / ___ (ДД/ММ/ГГГГ)
<b>Паспортный пол:</b>	Мальчик / Девочка

## КРИТЕРИИ ВКЛЮЧЕНИЯ

Следующие критерии должны быть отмечены "Да"		Да	Нет
1.	Согласие на участие в клинической апробации		
2.	Девочки и мальчики в возрасте от 0 до 18 лет		
3.	Неправильное строение наружных гениталий		
4.	Повышенный уровень АКТГ и/или указание на возможное аутосомно-рецессивное заболевание		

## КРИТЕРИИ ИСКЛЮЧЕНИЯ

Следующие критерии должны быть отмечены "Нет"		Да	Нет
1.	Изолированный крипторхизмом		
2.	Признаки дисгенезии гонад, наличие матки по данным УЗИ выполненном в специализированном учреждении		

## Оценка анамнеза для создания выборки пациентов

ДАТА: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Параметры		Да комментарии	Нет
1.	Наличие близкородственного брака у родителей		
2.	Наличие сибсов с неправильным строением наружных гениталий		
3.	Смерть сибсов в неонатальном периоде		
4.	Длина тела (см), вес (грамм) при рождении		
5.	Оценка вирилизации наружных гениталий при рождении по шкале Prader		
6.	Наличие электролитных нарушений в неонатальном периоде		
7.	Наличие повышенного уровня АКТГ в анамнезе		
8.	Наличие матки по данным УЗИ при рождении		
10.	Кариотип		
11.	Наличие оперативных вмешательств		

## ГОСПИТАЛИЗАЦИЯ ВИЗИТ 1

### ОСМОТР

Артериальное давление: \_\_\_\_\_ мм рт. ст. Пульс: \_\_\_ уд/мин

ЧД \_\_\_\_\_ мин

Вес: \_\_\_\_\_ кг SDS веса \_\_\_\_\_

Рост: \_\_\_\_\_ см SDS роста \_\_\_\_\_ SDS ИМТ \_\_\_\_\_

S пов. тела \_\_\_\_\_

Температура тела: \_\_\_\_\_. \_\_\_\_ °С

Кожные покровы:

Подкожно-жировая клетчатка:

Костно-мышечная система:

Стигмы дисэмбриогенеза:

Сердечно-сосудистая система:

Система органов дыхания:

Половое развитие по шкале Tanner:

Степень маскулинизации, описание наружных гениталий по шкале

Prader, указать пальпируются ли гонады.

ПАРАМЕТРЫ	Данные	Комментарии
Общий анализ крови		
Общий анализ мочи		
Биохимический анализ крови		
АКТГ		
Прямой ренин		
СССГ		
АМГ		
Ингибин В		
ЛГ		

ФСТ		
Электрокардиография		
УЗИ органов малого таза		
УЗИ надпочечников		
УЗИ мошонки		
Рентгенография кистей		

### Стероидный профиль методом ВЭЖЧ-МС/МС

	Результат	Комментарии
Базальный		
На фоне пробы с ХГЧ		

Лечащий  
врач \_\_\_\_\_