

Серии научно-практических рецензируемых журналов



Медицинский АЛФАВИТ

6 (303) 2017



Modern
LABORATORY

MEDICAL ALPHABET
Russian Professional Medical Journal

Современная ЛАБОРАТОРИЯ том № 1

- Фундаментальные основы лабораторной медицины
- Разработка, производство, технологии
- Лабораторное оборудование
- Реагенты
- Новые методы
- Практика
- Экспресс-диагностика
- Организация лабораторной службы
- Конгрессы и конференции



В. В. Дорюфейков

Новый подход к стандартизации результатов определения D-димера с использованием универсальных контрольных материалов

В. В. Дорюфейков, д. м. н., проф. зав. кафедрой биохимии^{1,2}

М. И. Кадинская, к. м. н, зав. лабораторией клинической гемостазиологии, доцент кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины⁴

С. В. Мыльников, к. б. н., доцент⁵

Т. И. Опарина, к. б. н., с. н. с.³

В. Ю. Седихин, врач клинической лабораторной диагностики³

В. Л. Эмануэль, д. м. н., проф. зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины, директор научно-методического центра молекулярной медицины⁴

¹ФГБОУ ВО «Национальный государственный университет физической культуры, спорта и здоровья имени П. Ф. Лесгафта», г. Санкт-Петербург

²ФБГУЗ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

³ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д. О. Отта», г. Санкт-Петербург

⁴ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

⁵ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», г. Санкт-Петербург

New approach to standardization of D-dimer estimation using universal control materials

V. V. Dorofeykov, M. I. Kadinskaya, S. V. Mylnikov, T. I. Oparina, V. Y. Sedikhin, V. L. Emanuel

National State University of Physical Culture, Sports and Health n.a. P. F. Lesgaft; North-West Federal Medical Research Centre n.a. V. A. Almazov; Research Institute for Obstetrics and Gynecology n.a. D. O. Ott; First Saint Petersburg State Medical University n.a. I. P. Pavlov; Saint Petersburg State University; Saint Petersburg, Russia

Резюме

Главной проблемой в определении D-димера в плазме крови является практически полное отсутствие стандартизации как на этапе производства лабораторного оборудования, так и на этапе производства реагентов, калибраторов тест-систем, а также контрольных материалов. В двух циклах межлабораторных сравнений (100 лабораторий) коэффициент межлабораторной вариации достигал 80%. Предлагаемый производителями реактивов для каждой лаборатории метод набора нормальных значений в популяции является неприемлемым вследствие трудоемкости такой работы и ее высокой стоимости. Целью работы было сравнение результатов лабораторного определения D-димера в образцах плазмы реактивов пациентов и в контрольных материалах с использованием автоматизированных методов анализа для повышения точности определения этого аналита в клинической практике без набора референсных значений для групп здоровых лиц разного возраста и пола. Материалы и методы. Провели сравнительный анализ результатов определения D-димера в плазме крови здоровых доноров и пациентов, находящихся на лечении в НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д. О. Отта и в клиниках СПбГМУ имени академика И. П. Павлова. Результаты. Предложен математический метод recalibration приборов (методов) для сопоставления результатов определения D-димера с исследованием двух уровней (низкого и высокого) универсального контрольного материала. Установили, что целесообразно производить recalibration (умножать на коэффициент сопоставимости) результатов определения D-димера в плазме крови пациентов, полученных оцениваемым методом исследования, при значительном отклонении коэффициента сопоставимости от значения 1,0.

Ключевые слова: D-димер, аналитическое качество, стандартизация результатов.

Summary

The main problem in the D-dimer estimation in plasma is the almost complete lack of standardization at the production stage of laboratory equipment and reagents, calibrators, test systems, and control materials. In two cycles of interlaboratory comparisons (100 laboratories were included in the study) interlaboratory coefficient of variation reached 80%. Method of determining normal values for the population, offered by manufacturers of reagents for each laboratory, is unacceptable due to the complexity of this work and its high cost. The aim of this study was to compare laboratory D-dimer determination in plasma samples of patients and control materials with the use of automated analysis techniques to improve the accuracy of the determination of this analyte in clinical practice without a set of reference values for groups of healthy individuals of different age and gender. Materials and methods: comparative analysis of results of D-dimer determination in plasma of healthy donors and patients undergoing treatment at the Institute of obstetrics, gynecology and reproductology n.a. D. O. Ott and clinics of the Medical university n.a. acad. I. P. Pavlov (St. Petersburg). Results: mathematical method of recalibration of laboratory equipment (methods) to compare the results of the D-dimer determination with two levels (low and high) of universal control material was proposed. It was determined that it is advisable to make the recalibration (multiply by a factor of comparability) of the results of D-dimer determination if there is a significant deviation of the coefficient of correlation from the value of 1.0.

Key words: D-dimer, analytical quality, standardization of results.

Главной проблемой в определении D-димера в плазме крови является практически полное отсутствие стандартизации как на этапе производства лабораторного оборудования, так и на этапе производства реагентов, калибраторов тест-систем, а также контрольных материалов. Более того, даже единицы, в которых выражают концентрацию этого анализата, существуют двух типов — DDU и FEU, что также усложняет трактовку результатов определения D-димера врачами-лаборантами и клиницистами [1]. В дальнейшем мы будем придерживаться единиц DDU, как это рекомендует Федеральная система внешней оценки качества (ФСВОК) лабораторных исследований Российской Федерации. Для того чтобы оценить масштаб проблемы несогласованности результатов определения D-димера в клинико-диагностических лабораториях (КДЛ) нашей страны, приведем результаты обоих циклов ФСВОК за 2013 год. В межлабораторном сравнении в России приняли участие 100 лабораторий (циклы 1 и 2), коэффициент межлабораторной вариации составил в первом цикле 84,27%, а во втором — 77,33%. В первом цикле за 2014 год при целевом значении D-димера 2287 нг/мл диапазон допустимых значений (целевое значение $\pm 1,64 s$) составил от 734 до 7126 нг/мл, а коэффициент межлабораторной вариации — 69,3%! Для сравнения: при определении глюкозы в том же цикле ФСВОК коэффициент межлабораторной вариации составил 7,8%, то есть был почти в десять раз меньше. Важно отметить, что при отсутствии стандартизованных контрольных материалов для D-димера производители реактивов для лабораторий предлагают каждой КДЛ набирать свой уровень нормальных значений в популяции, что является абсолютно неприемлемым для подавляющего большинства, если не всех клинико-диагностических лабораторий России вследствие трудоемкости такой работы и ее высокой стоимости. Важно подчеркнуть и высокую вариабельность показателя у разных возрастных групп

населения и у беременных женщин, концентрация D-димера в плазме крови которых может возрастать по мере приближения к родам [2–3, 6]. Как и для других нестандартизированных тестов, фирмы-производители оборудования и реактивов также рекомендуют использовать референсные значения (границы нормы), исходя из значений, приведенных в инструкциях к наборам реактивов (то есть по результатам исследования показателя в здоровой популяции самой фирмой). Таким образом, участие каждой лаборатории в системе внешней оценки качества определения D-димера крайне важно. Проблема нестандартизованности усугубляется и тем, что в последние годы и по настоящее время федеральный контроль качества лабораторных исследований проводится только два раза в год, что не позволяет КДЛ оперативно реагировать при переходе на использование коммерческих реактивов для определения D-димера другого производителя. Кроме того, результаты ФСВОК только свидетельствуют о том или ином уровне отклонения от целевого значения, но не дают решения, как уменьшить систематическую ошибку в определении анализата для нестандартизованных показателей, к которым относятся и D-димер. Проблема эта не решена в Европейском союзе и США [2].

Группа исследователей из Санкт-Петербурга и Швеции в 2007 году предложила решить проблему стандартизации лабораторных исследований с помощью оригинального подхода, сущность которого заключалась в том, что проводили межлабораторное сравнение результатов анализа пациентов с низкими и высокими значениями анализата с последующим внесением изменений в калибровку приборов (процедура рекалибровки) [4].

Особенностью данного подхода к стандартизации тестов является использование не контрольного материала, а замороженной сыворотки пациентов, требующей специальных условий для транспортировки из одной лаборатории в другие. Авторы использовали межлабора-

торное сравнение в одном регионе, а в качестве референсной использовали одну из лабораторий-участниц такого сравнения (наиболее хорошо оснащенную КДЛ). Затем по результатам тестирования проводили рекалибровку других приборов, приводя их в соответствие с результатами референсной лаборатории. Таким образом, разработанный авторами оригинальный способ не вполне подходит для определения такого нестандартизованного показателя, как D-димер, возможно, даже может ухудшить качество анализа в одной конкретно взятой лаборатории. Кроме того, использование данного подхода технически сложно и малоприменимо в рутинной практике при проверке качества каждого нового набора реагентов для определения D-димера, так как требует затраты более 14 тестов из исследуемого набора, который содержит обычно 96 лунок для анализа в случае использования техники иммуноферментного анализа (ИФА) или 100 тестов в составе автоматизированных методов. С учетом обычной калибровки (два раза по 4–6 тестов) и постановки двух-трех-уровневого контроля это приводит к удорожанию одного анализа на 17–20%, что при средней стоимости анализа на D-димер в России 900–1 200 рублей (цены 2016 года) составляет не менее 200–300 рублей в расчете на один анализ.

Целью нашей работы было сравнение лабораторного определения D-димера в образцах плазмы крови пациентов и в контрольных материалах с использованием автоматизированных лабораторных методов для повышения точности и улучшения стандартизованности определения этого анализата в клинической практике рутинных исследований без набора референсных значений для групп здоровых лиц разного возраста и пола.

Материалы и методы

Был проведен сравнительный анализ результатов определения D-димера в плазме крови здоровых доноров и пациентов, находящихся

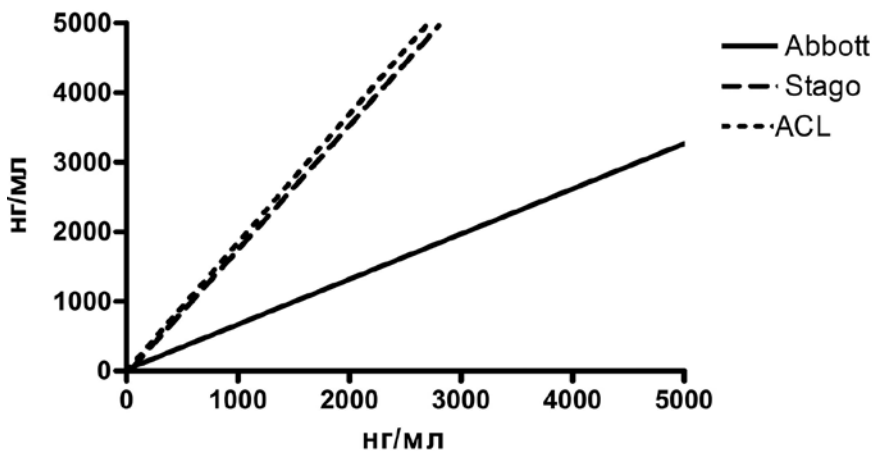


Рисунок 1. Зависимость (регрессия) концентрации D-димера в контрольных материалах фирмы Bio-Rad, определенной на Sysmex CS-2000i (ось Y) от концентрации, определенной на автоматических анализаторах Abbott, Stago, ACL Elite Pro.

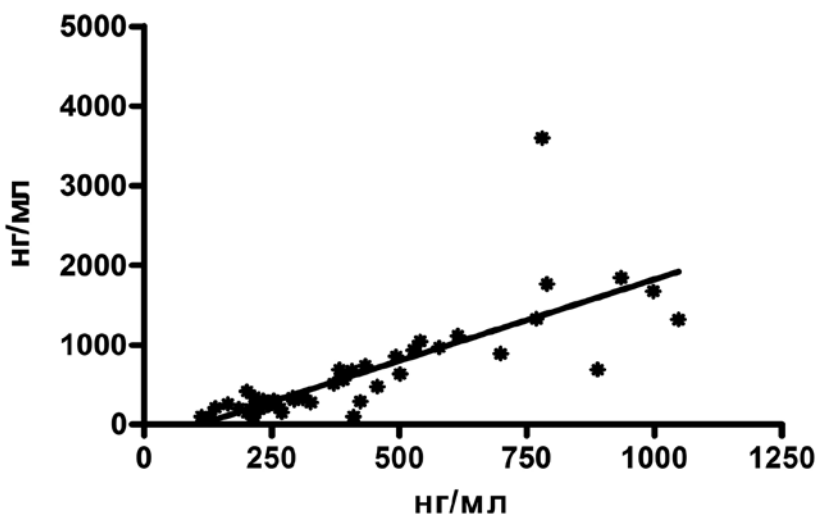


Рисунок 2. Регрессия концентрации D-димера в плазме крови пациентов, определенной на Sysmex CS-2000i по концентрации анализа, определенной на автоматическом анализаторе ACL Elite Pro.

на лечении в НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д. О. Отта и в клиниках СПбГМУ имени академика И. П. Павлова, произведена оценка контрольных материалов, аттестованных на D-димер, производства фирм Instrumentation Laboratory (США), Siemens (Германия), Abbott (США), Radiometer (Дания), Bio-Rad (США) с использованием автоматических анализаторов ACL Elite Pro (в дальнейшем в тексте ACL), Sysmex CS-2000i (Япония) и AQT90 Flex (Дания) соответственно. Определение D-димера проводили в день забора крови, центрифугированные образцы плазмы транспортировали при +4 °С не более 120 минут до на-

чала выполнения аналитического этапа лабораторного исследования. Результаты измерений содержания D-димера у пациентов обрабатывали методами вариационной статистики, включавшими расчеты ковариаций и дисперсий измеряемых признаков [5]. Поскольку иммунофелометрические методы определения анализа имеют нижний предел определения D-димера 120–180 нг/мл, образцы пациентов со значениями ниже указанной величины в статистический анализ не включали. Включение таких результатов в статистический анализ, по нашему мнению, может приводить к неправильной трактовке результатов авторами исследований,

которые проводили сравнения результатов с использованием количественных методов определения D-димера на разных приборах [6].

Результаты

В результате предварительных исследований нами был сделан вывод о необходимости использования контрольного материала, подходящего для всех используемых в настоящее время методов определения D-димера, то есть полученного с использованием материала из плазмы крови человека. Как показали результаты определения D-димера в контрольных материалах производства Siemens, IL, Radiometer, такие материалы производителей реактивов для определения D-димера представляют собой фрагменты антигена (молекулы) D-димера, а не нативную молекулу. Такой подход повышает стабильность контрольного материала и специфичность определения анализа, но не позволяет использовать контрольный материал в тест-системах других производителей. В результате сравнений контрольных материалов разных производителей нами было обнаружено, что аттестованные контрольные материалы фирмы Bio-Rad имеют несколько уровней концентрации анализа от низкого до высокого (четвертого уровня), определяются на всех автоматических анализаторах известных производителей из США, Японии, Германии и Дании (данные представлены на рис. 1). Результаты такого сопоставления определения D-димера показали высокую корреляцию между использованными методами, но значительную разницу в абсолютных значениях анализа (см. ниже). В качестве референсного метода нами был выбран метод определения D-димера на анализаторах фирмы Sysmex, хотя возможно использование и другого метода исследования в этом качестве. Наш выбор был обусловлен широкой известностью и распространенностью оборудования Sysmex в клиничко-диагностических лабораториях всего мира и России, высокими аналитическими характеристиками ре-

Таблица 1

Коэффициенты сопоставимости (рекалибровки) для анализаторов разных фирм-производителей по сравнению с выбранным референсным методом Sysmex (Япония)

	Abbot (США)	Stago (Франция)	ACL (США)	AQT90 flex (Дания)
По сравнению с Sysmex CS-2000i (Япония)	0,65	1,80	1,85	1,12

активов и оборудования указанной фирмы, огромным массивом данных по определению D-димера у здоровых и больных, а также беременных женщин в научной зарубежной и российской периодике [7, 8, 9].

В результате анализа полученных результатов сопоставления определения D-димера в контрольных материалах Bio-Rad нами был предложен математический метод рекалибровки приборов (методов) для сопоставления результатов определения D-димера с исследованием двух уровней (низкого и высокого) контрольного материала [10]. Для повышения надежности определение концентрации D-димера в каждом уровне контрольного материала Bio-Rad проводили не менее двух раз с вычислением среднего арифметического. По предложенной формуле определяли коэффициент сопоставимости оцениваемого и выбранного референсного методов:

$$CC = (\bar{Y}_{\text{high}} - \bar{Y}_{\text{low}}) / (\bar{X}_{\text{high}} - \bar{X}_{\text{low}}), \text{ где:}$$

- CC — коэффициент сопоставимости;
 \bar{X}_{high} — среднее арифметическое значение D-димера в контрольном материале высокого уровня, полученное оцениваемым методом;
 \bar{X}_{low} — среднее арифметическое значение D-димера в контрольном материале низкого уровня, полученное оцениваемым методом;
 \bar{Y}_{high} — среднее значение D-димера в контрольном материале высокого уровня, полученное выбранным референсным методом;
 \bar{Y}_{low} — среднее значение D-димера в контрольном материале низкого уровня, полученное выбранным референсным методом.

Если коэффициент сопоставимости находится в пределах 0,9–1,1 (то есть в пределах погрешности лабораторного теста), то это свидетельствует о близости результатов исследуемого и референсного методов определения аналита. Целесообразно производить рекалибровку

(умножать на коэффициент сопоставимости) результатов определения D-димера в плазме крови пациентов, полученных оцениваемым методом исследования, при значительном отклонении коэффициента сопоставимости от значения 1,0.

Приведем результаты сопоставления и рекалибровки определения D-димера в контрольных материалах конкретных лотов D-dimer Control, Level 1, 2, 3. Измеряли концентрацию D-димера в контрольной сыворотке производства фирмы Bio-Rad D-dimer Control, Level 1, 2, 3 Lot 13780 второго уровня (Level 2, 13782, exp. 31.03.2016) на автоматическом коагулометре ACL фирмы IL, реактивы HemosIL D-dimer. Получили значения 750 и 764 нг/мл. Среднее составляет 757 нг/мл. Процедуру повторили для контрольной сыворотки третьего уровня (Level 3, Level 13783 exp. 31.03.2016). Получили значения 1 445 и 1 423 нг/мл. Среднее арифметическое значение определения аналита составляет 1 434 нг/мл. Измеряли концентрацию D-димера в тех же образцах контрольных сывороток на автоматическом анализаторе фирмы Sysmex CS-2000i (Япония) с использованием рекомендованных реактивов Siemens / Sismex Series D-dimer (выбранный референсный метод). Получили значения 1 380 и 1 410 нг/мл. Среднее арифметическое составляет 1 395 нг/мл. Процедуру повторили для контрольной сыворотки третьего уровня. Получили значения 2 630 и 2 660 нг/мл. Среднее значение определения составляет 2 645 нг/мл.

Провели расчет по представленной формуле:

$$CC = (2645 - 1395) / (1434 - 757) = 1250 / 677 = 1,85$$

Таким образом, значения определения D-димера существенно отличаются при определении на этих двух

приборах. Полученный коэффициент сопоставимости (рекалибровки) составил 1,85.

Этот коэффициент использовали для определения концентрации D-димера в крови у пациентов. В плазме крови пациента А (от 14.02.2014) концентрация D-димера при измерении на анализаторе ACL составила 494 нг/мл. При умножении на поправочный коэффициент получено значение 914 нг/мл. Реальное измерение на анализаторе Sysmex CS-2000i дало значение 855 нг/мл (отклонение значений аналита составляет 9,4% по сравнению с 58% до процедуры рекалибровки).

Результаты нашей работы с контрольными материалами проверили в параллельном исследовании определения D-димера в плазме крови у пациентов (n = 70) на анализаторах ACL и Sysmex CS-2000i». Корреляционный анализ результатов определения D-димера по базе пациентов дает сходные результаты с моделированием по контрольным материалам с использованием коэффициента сопоставимости, если показания анализатора ACL Elite Pro находятся в рекомендованном диапазоне определения на том или ином приборе (200–1 500 нг/мл для анализатора ACL без разведения образцов пациентов). Средние значения D-димера для 70 пациентов оказались наиболее высокими на анализаторах Sysmex (при коэффициенте вариации $14,8 \pm 1,6\%$) и ACL (при коэффициенте вариации $11,2 \pm 1,1\%$). Отметим, что, по данным трех циклов ФСВОК за 2013–14 годы, метод ИФА, используемый в КДЛ НИИ имени Д. О. Отта, показал самый высокий коэффициент вариации теста ($18,7 \pm 2,0\%$). Сопоставление определения D-димера у пациентов представлено на рис. 2: на анализаторах ACL (по оси аб-

диссе) и Sysmex (по оси ординат показания анализатора Sysmex CS-2000i). В табл. 1 представлены коэффициенты сопоставимости (рекалибровки) для анализаторов разных фирм-производителей по сравнению с выбранным референсным методом Sysmex.

Дискуссия

Рассуждая о преимуществах и недостатках автоматизированного иммунофелометрического и иммуноферментного методов определения D-димера, мы считаем важным отметить следующее. Долгое время преимущественное использование иммуноферментного метода анализа (ИФА) для определения D-димера объяснялось низкой себестоимостью теста и отсутствием необходимости в дорогостоящем оборудовании. Кроме того, нужно отметить высокую чувствительность метода, возможность получать количественный результат при низких концентрациях аналита. Главными недостатками ИФА является зависимость качества результатов выполнения анализов от человеческого фактора (квалификация, тщательность, опыт работы, настроение оператора), зависимость от температуры и других физических факторов в лабораторном помещении, длительность выполнения теста, то есть неоперативность (обычно не менее трех часов), необходимость замораживания проб для экономической целесообразности тестирования при небольшом потоке анализов. Кроме того, необходимо отметить, что при высоких значениях D-димера, выходящих за пределы линейности, выдача ответа КДЛ откладывается как минимум еще на три часа, а часто в случае окончания рабочего дня сотрудников лаборатории происходит на следующий день. Лаборатории, использующие автоматизированный иммунофелометрический метод при наличии включенного и откалиброванного прибора обычно выдают ответ на D-димер в течение 20–30 минут, а при необходимости разведения в случае высоких значений — в течение 60 минут

от момента постановки образца на борт анализатора. Большинство современных автоматических анализаторов способны автоматически разводить образцы крови пациентов по заданной программе, не отвлекая оператора от выполнения других задач, а экспресс-анализатор AQT90 flex способен определять D-димер как в плазме, так и в цельной крови, не требуя центрифугирования. Необходимо отметить, что иммунофелометрический метод постоянно совершенствуется производителями оборудования и реактивов, появляются «высокочувствительные» методики, снижающие нижнюю границу количественного определения менее 120 нг/мл (DDU). Указанные соображения привели к тому, что, по результатам международных внешних систем контроля качества, количество лабораторий, использующих ИФА для определения D-димера, по всему миру резко сокращается от года к году. Например, в системе внешней оценки качества EQAS — Bio-Rad КДЛ, использующие ИФА для определения указанного аналита, попадают в группу методов «другие», а их количество не превышает пяти в течение года по сравнению со многими десятками лабораторий, использующих автоматизированные иммунофелометрические методы.

В заключение нужно отметить, что предложенный авторами математический метод рекалибровки приборов не претендует на полное решение нестандартизованности тестов по определению D-димера. Авторы хорошо понимают всю сложность задачи определения такого белкового комплекса, который является нестабильным как в цельной крови *in vivo*, так и в цитратной плазме. Однако предложенный подход позволит всем КДЛ, используя доступные контрольные материалы, уменьшить масштаб систематической ошибки, а при переходе на новые лоты реагентов или другой метод определения D-димера оперативно оценить получаемые результаты, не дожидаясь результатов очередного цикла ФСВОК.

Список литературы

1. Adam S. S., Key N. S., Greenberg C. S. D-dimer antigen: current concepts and future prospects. // *Blood*.— 2009.— Т. 113.— № 13: 2878–2887.
2. Frauke Bergmann, Nadine Pingel, Andreas Czwalinna and Matthias Koch. D-Dimer in normal pregnancy: determination of reference values for three commercially available assays. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2014. [www.degruyter.com/dg/viewarticle/jj\\$002fcclm.ahead-of-print\\$002fcclm-2014-0054\\$002fcclm-2014-0054.xml;jsessionid=4B436D6A2ED57A968121ECAA0E-CEFA5E7](http://www.degruyter.com/dg/viewarticle/jj$002fcclm.ahead-of-print$002fcclm-2014-0054$002fcclm-2014-0054.xml;jsessionid=4B436D6A2ED57A968121ECAA0E-CEFA5E7).
3. Зайнулина М. С., Корнюшина Е. А., Глотов А. С., Степанян М. Л., Бикмулина Д. Р., Шабанова Н. А. Тромбофилии в акушерской практике. Методические рекомендации. СПб.: Н-Л, 2009: 56 с.
4. Хоровская Л. А. Внутренний контроль качества и процедуры рекалибровки с использованием биоматериала пациента. Пособие для врачей. Под ред. А. Каллнера и В. Л. Эмануэля. — СПб. Изд-во СПбГМУ, 2007: 67с.
5. Мильников С. В. Азы Биометрии. СПб 2007 Изд-во НЛ 2007: 56 с.
6. Силина Н. Н., О. Г. Головина, О. А. Смирнова, А. Е. Николаева, Л. П. Папаян. Сопоставление результатов определения уровня D-димера различными методами у женщин с нормально протекающей беременностью. // *Журнал акушерства и женских болезней*. 2011. Т. LX (вып. 6): 74–79.
7. Воробьева Н. М., Добровольский А. Б., Титаева Е. В., Панченко Е. П. Тромбоэмболические осложнения и диагностическая значимость D-димера при сердечно-сосудистых заболеваниях: ретроспективное исследование 1000 пациентов. *Кардиологический вестник*. 2011. № 2: 10–16.
8. W. S. Chan, A. Lee, A. Spenser, S. Chunilal, M. Crowther, W. Wu, M. Johnston, M. Rodger and J. S. Ginsberg. D-dimer testing in pregnant patients: towards determining the next 'level' in the diagnosis of deep vein thrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*.— 2010, 8: 1004–1011.
9. A. A. Khalafallah, M. Morse, A. Al-Barzan, M. Adams, A. Dennis, G. Bates, I. Robertson, D. Seaton, T. Brain. D-Dimer levels at different stages of pregnancy in Australian women: A single centre study using two different immunoturbidimetric assays. *Thrombosis Research* 2012.— V. 130, 3: 171–177.
10. Дорофейков В. В., Опарина Т. И., Мильников С. В. Способ оценки качества определения D-димера в плазме крови в условиях клинико-диагностической лаборатории. Патент РФ № 2572226 по заявке на изобретение № 2014137237/15 от 15.09.2014. Положительное решение о выдаче патента от 09.10.2015.

