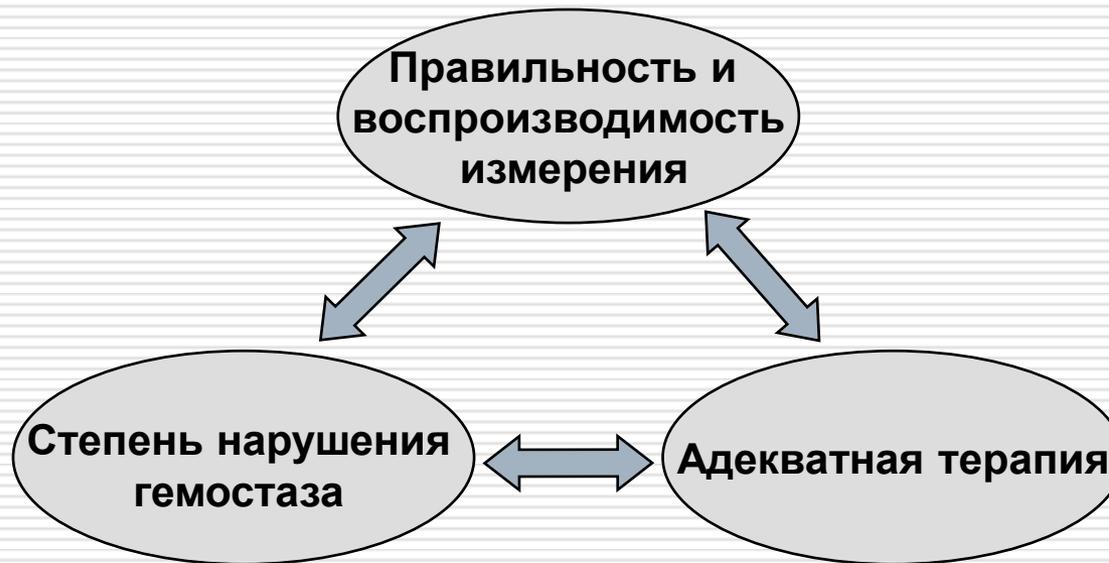

Стандартизация коагулологических исследований

А.Л.Берковский, С.В.Бабенко, А.В.Суворов
Гематологический Научный Центр МЗ РФ
Лаборатория стандартизации методов контроля
НПО Ренам

Стандартизация

Комплекс мероприятий, позволяющих получать правильные, адекватные состоянию пациента, результаты анализов



Требования к стандартизации разработаны:

- ❑ Международной Организацией Стандартизации (ISO) в руководствах ISO 9000-9004
- ❑ ВОЗ (серия Технических Докладов, Бюллетени ВОЗ)
- ❑ Профильными комитетами и обществами (для коагулологии ICSH, ISTH)
- ❑ ГОСТами
- ❑ Приказами МЗ РФ

ГОСТЫ

- ❑ ГОСТ ISO 18153-2011 «Изделия медицинские для диагностики in vitro. Измерение величин в биологических пробах. Метрологическая прослеживаемость значений каталитической концентрации ферментов, приписанных калибраторам и контрольным материалам»
- ❑ ГОСТ Р 53079.1-2008 «Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 1. Правила описания методов исследования»
- ❑ ГОСТ Р 53133.1-2008 «Технологии лабораторные клинические. Контроль качества клинических лабораторных исследований. Часть 1. Пределы допускаемых погрешностей»
- ❑ ГОСТ Р 53133.2-2008 «Технологии лабораторные клинические. Контроль качества клинических лабораторных исследований. Часть 2. Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов»

ГОСТы (продолжение)

- ГОСТ Р 53133.3-2008 "Технологии лабораторные клинические. Контроль качества клинических лабораторных исследований. Часть 3. Описание материалов для контроля качества клинических лабораторных исследований".
- ГОСТ Р 53133.4-2008 "Технологии лабораторные клинические. Контроль качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила проведения клинического аудита эффективности лабораторного обеспечения деятельности медицинских организаций."

Приказы МЗ РФ

- ❑ МЗ РФ Приказ от 21.12.1993 N 295 "Об утверждении Положения об аккредитации клинико-диагностических лабораторий"
- ❑ МЗ РФ Приказ от 07.02.2000г. №45 "О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения РФ"
- ❑ МЗ РФ Приказ от 26.05.2003г. №220 "Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований".

Преаналитический этап

- ◆ Комплекс мероприятий, выполняемых от назначения врачом лабораторного анализа до осуществления лабораторных измерений взятого изучаемого материала.
- ◆ В настоящее время именно ПЭ стал источником многих, если не большинства диагностических ошибок при определении показателей системы гемостаза.

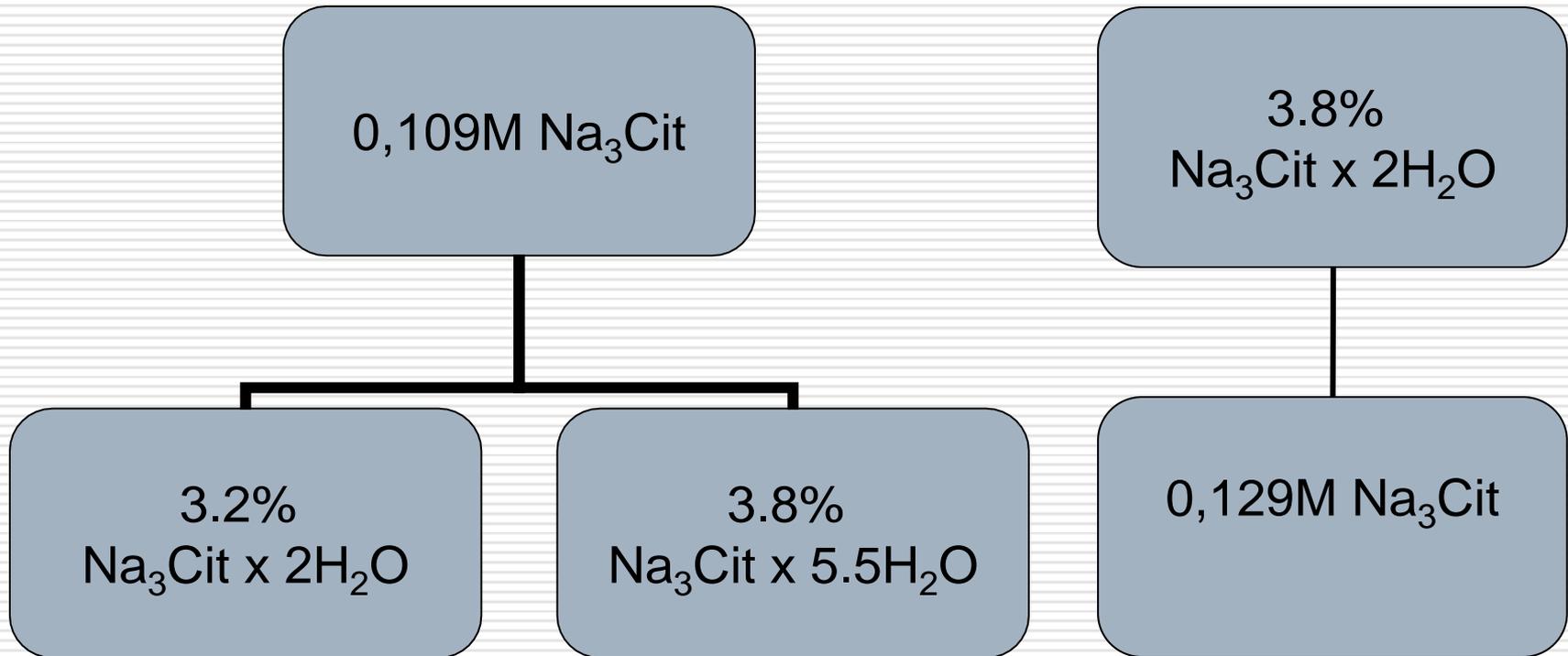
Преаналитический этап

- ВНЕЛАБОРАТОРНАЯ СОСТАВЛЯЮЩАЯ ПРЕАНАЛИТИЧЕСКОГО ЭТАПА
 - Правильность направления на гемостазиологические лабораторные исследования
 - Физиологический статус больного
 - Гематокрит
 - Суточные вариации
 - Факторы «стиля жизни»

Преаналитический этап

- ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ СОСТАВЛЯЮЩАЯ ПРЕАНАЛИТИЧЕСКОГО ЭТАПА
 - Идентификация проб крови
 - Емкости (пробирки) для забора образцов крови (только пластик, прозрачный поликарбонат)
 - Антикоагулянты для проб крови ВОЗ, ISTH, CLSI/NCCLS рекомендуют использовать в роли антикоагулянта 0,105-0,109 М раствор Na_3Cit

Антикоагулянты



Использование 0,129M цитрата натрия в качестве антикоагулянта приводит к значительному удлинению кальций зависимых коагуляционных тестов

Преаналитический этап

- Подготовка проб для анализа:
 - Взятие крови (соблюдение соотношения кровь/антикоагулянт)
 - Получение плазмы (двойное центрифугирование при мониторинге гепаринотерапии)
- Доставка и хранение образцов.
- Выбор тест-систем для анализа.
- Строгое соблюдение инструкции, прилагаемой к тест-системе.

Аналитический этап

- Качество клинико-лабораторных исследований (КЛИ) на аналитическом этапе определяется на двух уровнях : внутрилабораторный контроль и внешняя оценка качества
- Стандартизация КЛИ на уровне внутрилабораторного контроля качества заключается в обеспечении нормативных точности и правильности измерений, внутри- и межсерийной воспроизводимости
- Основными аналитическими характеристиками являются воспроизводимость и правильность измерений, которые по рекомендациям IFCC выражаются в виде среднеквадратичного (стандартного) отклонения (S) или коэффициента вариации (CV) и разности среднего арифметического (X) и истинного (установленного) значений

Как это обеспечивается

- Наличие калибраторов и контрольных образцов.
- Строгое соблюдение температуры проведения анализа.
- Правильность разведения калибраторов, контрольных и исследуемых образцов.
 - Предварительная калибровка пипеток
 - Использование только пластиковой посуды.

Проведение анализа

- ◆ Калибровочный график должен быть построен в как можно более широком диапазоне, однако, без потери чувствительности тест-системы
- ◆ Минимум три разведения необходимы для построения калибровочного графика, т.е. для установления линейности тест-системы

Контроль необходим для каждого анализа

- Лабильность компонентов в системе коагуляционного анализа
- Каждая серия анализов должна сопровождаться параллельными определениями свежеприготовленного, соответствующего данному случаю, контрольного образца
- Сводится к минимуму погрешность, вносимая лабильными компонентами набора и условиями работы лаборанта

Контрольные материалы

Требования, предъявляемые к КМ:

- минимальная межфлаконная вариация, гомогенность;
- хорошая растворимость лиофилизированных КМ;
- высокая стабильность всех содержащихся в КМ веществ (до и после растворения);
- специфичность, КМ должен быть получен на основе человеческого матрикса (если комбинированный, то должен быть близок к человеческому матриксу);
- все компоненты аттестованного КМ должны быть оценены референсными методами и большим количеством существующих методических модификаций;
- по всем определяемым показателям КМ должен иметь несколько пределов концентрации (активности), минимально - 2 (норма/патология).

Контрольные материалы

Стандартизация коагулологических исследований предполагает унификацию используемых КМ. В настоящее время в РФ производятся следующие типы стабилизированных и лиофилизированных КМ на основе человеческой плазмы:

- Плазмы контрольные (пул здоровых доноров и патологическая), аттестованные по пяти основным параметрам гемостаза (ПВ, АЧТВ, ТВ, фибриноген, АТIII).
- Плазмы контрольные (пул здоровых доноров и патологическая), аттестованная по ПВ, АЧТВ, ТВ, фибриногену, факторам II, VII, VIII, IX, X, XI, XII, Виллебранда, антитромбину III, протеину С, плазминогену, α 2-антиплазмину.
- Плазмы контрольные патологические с пониженным и повышенным уровнем активности фактора VIII.

Контрольные материалы

- Плазма контрольная, содержащая волчаночный антикоагулянт.
- Плазма контрольная с резистентностью фактора Va к активированному протеину C.
- Плазмы контрольные с различными уровнями нефракционированного и низкомолекулярного гепаринов, аттестованные по антиХа активности.
- Плазмы контрольные (3 уровня) для контроля правильности определения МНО в широком диапазоне (проходят регистрацию).

Внешний контроль качества

- Национальный – Федеральная система внешней оценки качества (ФС ВОК)
- Международный:
 - United Kingdom National External Quality Assessment Service (NEQAS)
 - ECAT Foundation – некоммерческая организация для обеспечения международной внешней оценки качества (EQAR) для лабораторий, работающих в области гемостаза и тромбоза.

Международные стандарты

В настоящее время существуют Международные Стандарты, рекомендуемые к использованию ICSH, ISTH:

- тромбопластина, тромбина, альфа-тромбина, плазмина;
- концентратов фактора VIIa, факторов II+IX+X, фактора VIII, фактора IX;
- международные стандарты для определения активности в плазме факторов VIII и Виллебранда, антитромбина III, белка C и белка S, плазминогена;
- международные эталонные препараты нефракционированного и низкомолекулярного гепаринов.

Референсные материалы

К существующим референсным материалам относятся:

- препараты референсной плазмы;
- плазмы для определения волчаночного антикоагулянта;
- плазмы-калибраторы для Международного Нормализованного Отношения, для фактора VIII;
- Национальные стандарты плазмы (Великобритания, Бельгия);
- реагенты для стандартизации АЧТВ.

Протромбин-калибратор



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАРОВООХРАНЕНИЯ
(РОСЗДРАВНАДЗОР)

**РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ
НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ**
от 10 апреля 2015 года № РЗН 2015/2546

На медицинское изделие
Плазма-калибратор для определения МНО и протромбина по Квику
(Протромбин-калибратор) по ТУ 9398-057-05595541-2013

Настоящее регистрационное удостоверение выдано
Межрегиональная благотворительная общественная организация инвалидов
"Общество больных гемофилией" (МБОУ "Общество больных гемофилией"),
Россия, 125167, Москва, Новый Зыковский проезд, д. 4

Производитель
Межрегиональная благотворительная общественная организация инвалидов
"Общество больных гемофилией" (МБОУ "Общество больных гемофилией"),
Россия, 125167, Москва, Новый Зыковский проезд, д. 4

Место производства медицинского изделия
125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 4.

Номер регистрационного досье № РД-2674/43882 от 17.12.2013

Вид медицинского изделия -

Класс потенциального риска применения медицинского изделия 2а

Код Общероссийского классификатора продукции для медицинского изделия 93 9816

приказом Росздравнадзора от 10 апреля 2015 года № 2361
допущено к обращению на территории Российской Федерации.

Врио руководителя Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения



М.А. Мурашко
0011531

22.04.2015

МОНИКИ

Национальные стандарты

- Стандартизация коагулологических исследований предполагает наличие в стране материалов в ранге Национальных Стандартов (НС).
- Проведение такой работы необходимо осуществить на основе апробированных аттестованных отечественных препаратов в соответствии с требованиями для Международных Биологических Стандартов, с рекомендациями головного центра по стандартизации NIBSC и привлечением ФС ВОК РФ.
- Для решения этой задачи в первую очередь необходимо создать НС тромбопластина, тромбина и плазм-калибраторов для стандартизации измерения протромбинового комплекса, МНО и фактора VIII.

Унификация методик

- Не менее важно, для стандартизации коагулологических исследований унификация методов и методических условий проведения КЛИ.
- Анализ существующих в настоящее время подходов к проведению базовых гемостазиологических тестов позволяет сделать следующие заключения:

Протромбиновое время (ПВ)

- В последние годы многие лаборатории в РФ перешли на использование для определения ПВ водорастворимого тромбопластина с аттестованным значением Международного Индекса Чувствительности (МИЧ), что позволяет выражать результаты исследований в стандартизированной форме Международного Нормализованного Отношения (МНО).
- Кроме этого необходимо быть уверенным, что используемый для проведения теста тромбопластин имеет достаточную и адекватную чувствительность к факторам протромбинового комплекса и, в особенности, к фактору VII свертывания.
- Данные положения предполагают необходимость использования в лабораториях только промышленно произведенные партии тромбопластина, аттестованные производителем против Стандартного препарата.

Контроль правильности определения МНО*

- Контроль определения МНО должен проводиться в каждой лаборатории. Для его проведения необходим набор контрольных сертифицированных плазм (не менее 3, МНО=1,5-4,5).
- Каждое определение МНО повторяют как минимум дважды в каждый из дней (не менее 2).
- Разница определения МНО в течение одного дня и в разные дни не должна превышать 10%.
- Результат не должен отличаться от установленного производителем МНО более, чем на 15%.

Procedures for Validation of INR and Local Calibration of PT/INR Systems: Approved Guideline; CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) Document H54-A, Vol 25, No. 23, Replaces H54-P, Vol 24, No. 30 (formerly NCCLS), 2005

Контроль правильности определения МНО^{*}

- Процедура проверки должна проводиться для всех приборов, используемых в лаборатории для теста ПВ.
- Контроль необходим каждый раз при смене реагента, серии реагента, инструмента или после его ремонта, а также после проведения калибровки тест-системы (или не реже 1 раза в год).
- Если значения $\text{МНО}_{\text{лок.}}$ не укладываются в диапазон $\text{МНО} \pm 15\%$, результаты измерений не могут считаться достоверными!

АЧТВ

К сожалению, до настоящего времени тест АЧТВ имеет по сравнению с тестом ПВ гораздо меньшую степень стандартизации.

Так, результаты анализа выражаются в абсолютных величинах (в секундах), которые существенно зависят от активности и чувствительности АЧТВ-реагентов, порой в значительной степени отличающихся у различных производителей.

Особенно явно это проявляется при использовании теста АЧТВ для контроля за проведением гепаринотерапии.

Тромбиновое время (ТВ)

Стандартизация теста ТВ достигается путем использования для его проведения тромбина с установленной активностью.

Однако до настоящего времени в РФ не существует Национального Стандарта тромбина, что не позволяет рассматривать производимые в РФ препараты тромбина для определения ТВ как основу для получения стандартизованных результатов.

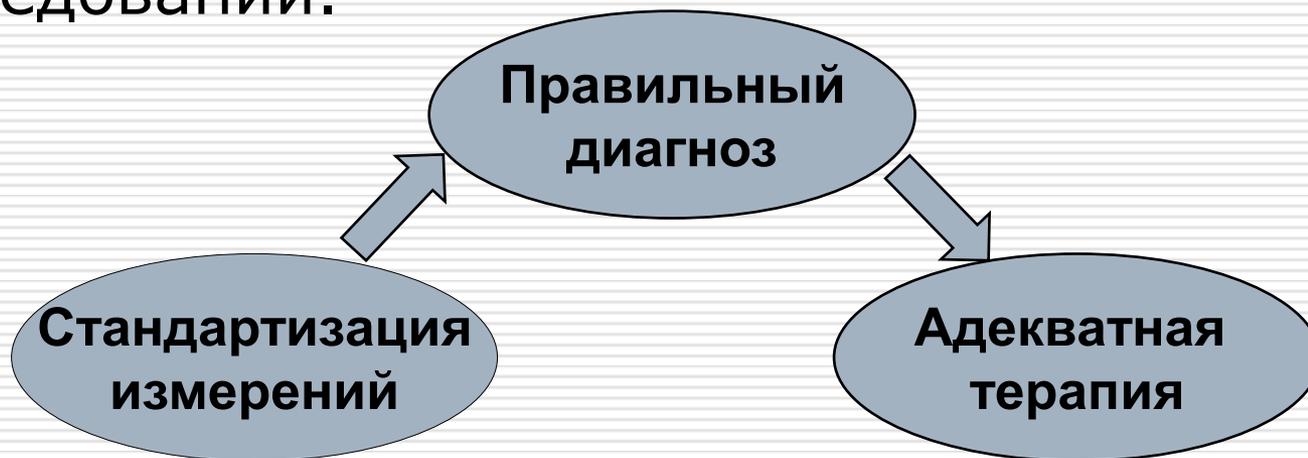
Концентрация фибриногена

Анализ работы отечественных КДЛ позволяет сделать вывод о целесообразности унификации методической базы определения концентрации фибриногена на основе общепринятого в мире метода Клаусса.

Кроме того, результаты определения станут в значительной степени более достоверными после введения в практику Национального Стандарта плазмы, против которого производители теста смогут аттестовывать свои препараты-калибраторы и КМ.

Выводы:

Осуществляемые мероприятия в мире и РФ позволяют надеяться на успешное решение проблемы стандартизации коагулологических исследований.



Вопросы?