



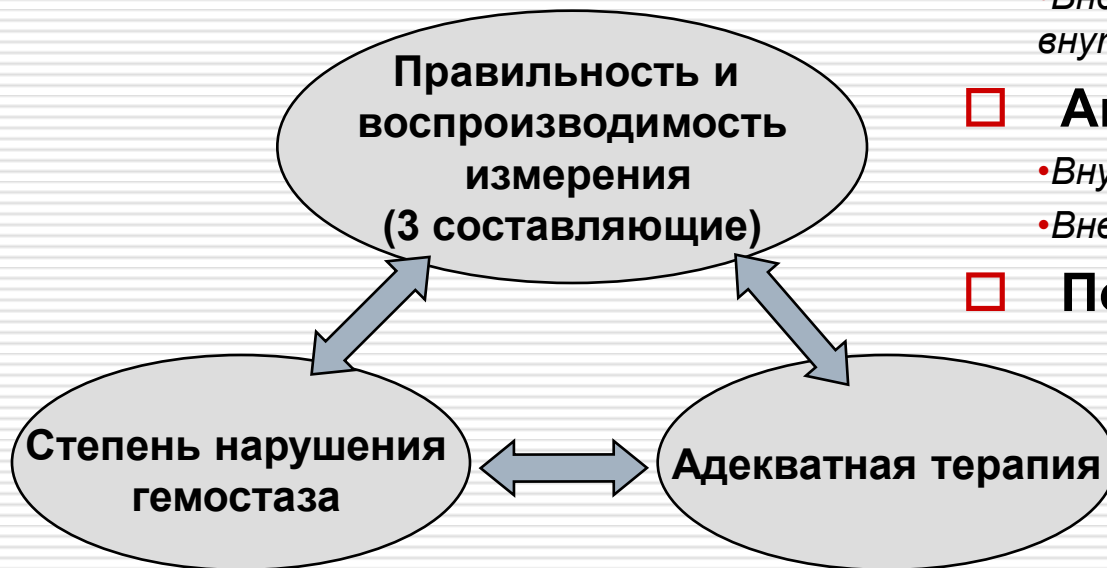
Проблемы стандартизации в коагулологии. Лабораторное сопровождение.

А.Л.Берковский, С.В.Бабенко,
А.В.Суворов

Гематологический Научный Центр МЗ РФ,

Стандартизация

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



- ☐ **Преаналитический этап**
 - *Внелабораторная и внутрилабораторная составляющие*
- ☐ **Аналитический этап**
 - *Внутрилабораторный контроль*
 - *Внешняя оценка качества*
- ☐ **Постаналитический этап**

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 (для производителей)

- ГОСТ Р 51352-2013 «Медицинские изделия для диагностики ИН ВИТРО». Методы испытаний.
- ГОСТ Р 51088-2013 «Медицинские изделия для диагностики ИН ВИТРО». Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.

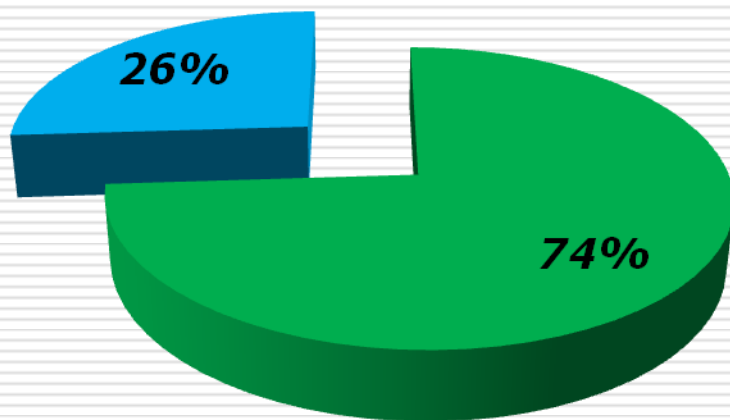
Внутрирегиональный контроль качества

В мероприятиях принимали участие больницы, поликлиники, диспансеры, госпитали, перинатальные центры, а также женские консультации, санатории и медицинские центры из 10 регионов РФ.



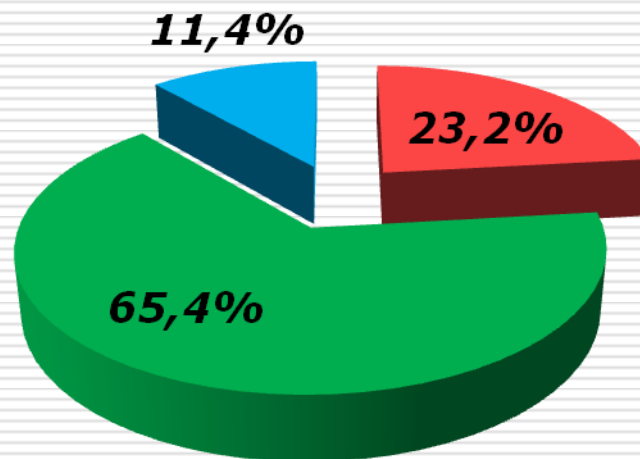
Внутрирегиональный контроль качества

Использование реагентов



- Отечественного производства
- Зарубежного производства

Использование оборудования



- Мануальное
- Полуавтоматическое
- Автоматическое

Внутрирегиональный контроль качества

В основном представлялись данные по двум простым скрининговым тестам: Протромбин в % по Квику / МНО и АЧТВ, в некоторых регионах дополнительно проводился контроль определения фибриногена.

Правильность определения протромбина в % по Квику **Правильность определения АЧТВ**



Normal High Abnormal

В уровне High Abnormal в категории не вошедших в диапазон данных, лабораториями использовались ручные методики~32,3%, полуавтоматы~54,8%, автоматические коагулометры~12,9%

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.

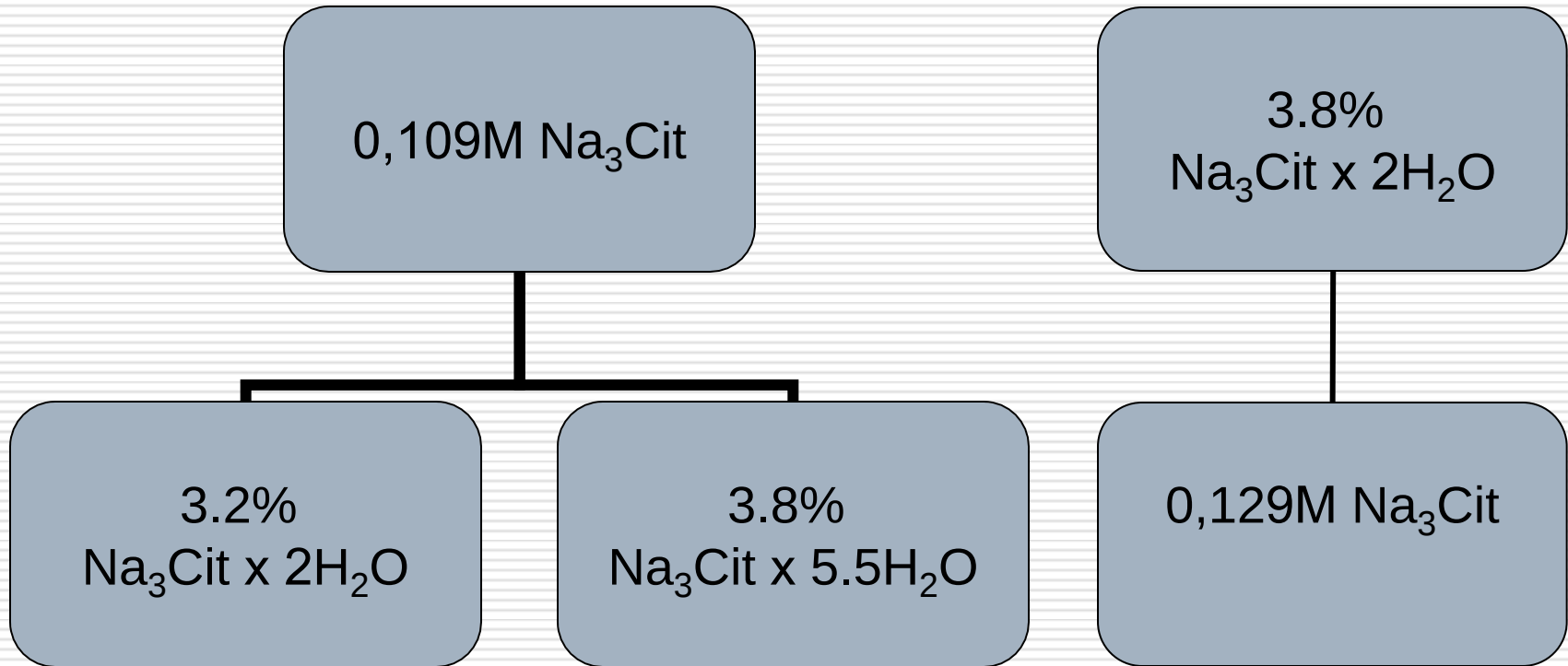
Преаналитический этап

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

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 обязательное при мониторинге гепаринотерапии)
- Доставка и хранение образцов.
- Выбор тест-систем для анализа.
- Строгое соблюдение инструкции, прилагаемой к тест-системе.

Преаналитический этап

(некоторые важные акценты)

- **АЧТВ:**
- Материалом должна быть цитратная **бедная тромбоцитами** плазма.
- Кровь **немедленно** центрифугируют, плазма отбирается. Плазма **стабильна в течение 4 часов при 4°C** или **28 суток в замороженном состоянии при -18°C**.
- Данные АЧТВ могут быть **занижены за счет тканевого тромбопластина** в результате травмы при взятии крови и **завышены при несоответствии объема антикоагулянта** высокому показателю гематокрита.

Преаналитический этап

(некоторые важные акценты)

- **Протромбиновое время:**
- Исследуемый материал - **цитратная плазма или цитратная цельная кровь.**
- **Проба стабильна в течение 8 часов** при комнатной температуре. Рекомендуется **контроль за точным соотношением между количеством крови и антикоагулянта (9 и 1).**

Преаналитический этап

(некоторые важные акценты)

- **Факторы VIII, IX, XI, XII:**
 - В качестве исследуемого материала используется **цитратная бедная тромбоцитами плазма**.
 - Цитратную кровь **немедленно** после взятия **центрифугируют, а плазму** до анализа **хранят** при температуре 4°C **не более 2 часов**.

Аналитический этап (АЭ)

- Качество клинико-лабораторных исследований (**КЛИ**) на **АЭ** 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 (Int Fed Clinical Chemistry) выражаются в виде среднеквадратичного (стандартного) отклонения (**S**) или коэффициента вариации (**CV**) и разности среднего арифметического (**X**) и истинного (**установленного**) значений

Аналитический этап

- 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, в пределах 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 карты

- ❖ Для оценки результатов **АЭ** на внутрилабораторном уровне для каждого контрольного материала вводится основной инструмент контроля качества - создание **контрольных карт** (Shewhart и тд.).
- ❖ С помощью контрольных карт проводится **текущий** контроль качества результатов КЛИ
- ❖ Анализ контрольных карт основан на теории вероятности, определяющей следующие положения:
 - ✓ **95%** результатов могут находиться в пределах $\pm 2S$;
 - ✓ результаты должны распределяться равномерно по обе стороны от величины **X** и **2/3** результатов должны лежать в пределах $\pm 1S$;
 - ✓ результаты за пределами **3S** не должны превышать **0,25%** от общего количества результатов.

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 **принятыми** 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 С**.
- 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.

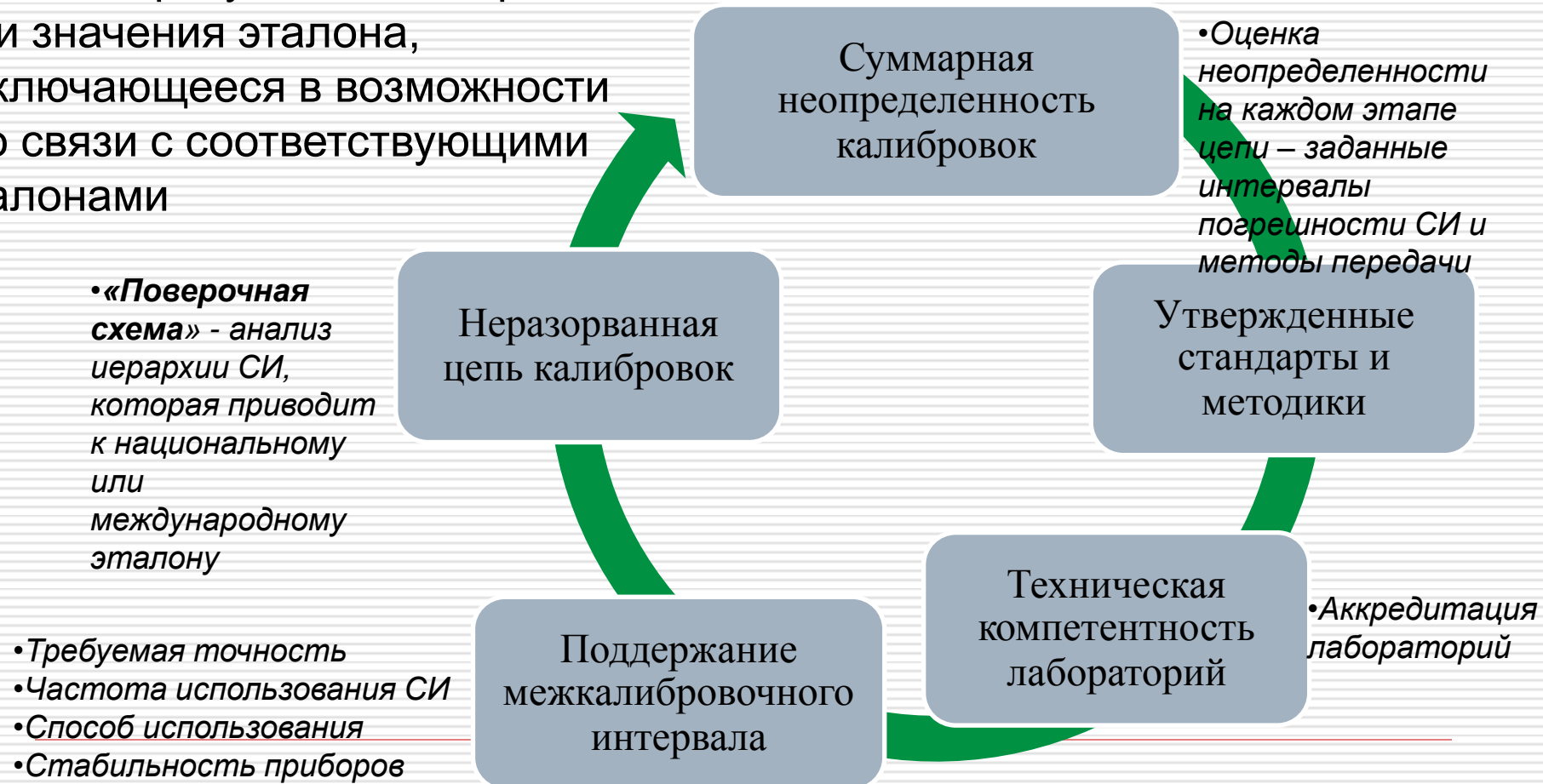
Внешний контроль качества – обязательная независимая

сопоставимость результатов лабораторий между собой и с данными международных референсных учреждений.

- 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.

Метрологическая прослеживаемость

Свойство результата измерения или значения эталона, заключающееся в возможности его связи с соответствующими эталонами



Международные стандарты

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

- тромбопластина, тромбина, альфа-тромбина, пламина;
- 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.

Метрологическая прослеживаемость

Обязательное требование к калибровочным и
ПРОИЗВОДСТВЕННЫМ лабораториям!

Первичные Международные Стандарты

(WHO International Standart),

*используемые НПО «Ренам» для подготовки вторичных (опорных и рабочих) производственных эталонов - как начало работы над выпуском **Национальных** стандартов Российской Федерации*

2 International Standart Thrombin Human
NIBSC code 01/580

Thromboplastin, rabbit, plain, lyophilized.
International Sensitivity Index:
1.0.HO/BS/95.1796

WHO International Standart:
2 IS for Fibrinogen Plasma

2 International Standart Antithrombin plasma
NIBSC code 93/768

Референсные материалы

К общепринятым **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.

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 реагентов в соответствии с требованиями для Международных Биологических Стандартов, с рекомендациями **головного центра по стандартизации ВОЗ - NIBSC** (Великобритания).
- Для решения этой задачи в первую очередь необходимо создать **НС тромбопластина, тромбина и плазм-калибраторов** для стандартизации измерения протромбинового комплекса, МНО, фибриногена и фактора VIII.

Унификация методик

- Для стандартизации коагулологических исследований необходима унификация методов и методических условий проведения тестов.
- Анализ существующих в настоящее время подходов к проведению базовых гемостазиологических тестов позволяет сделать отдельные заключения:

Унификация методик в гемостазиологии: Протромбиновое время (ПВ, например)

- 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 реагента**.

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 **МНО_{лок.}** не укладываются в диапазон **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 - **отсутствие реагентов для 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.

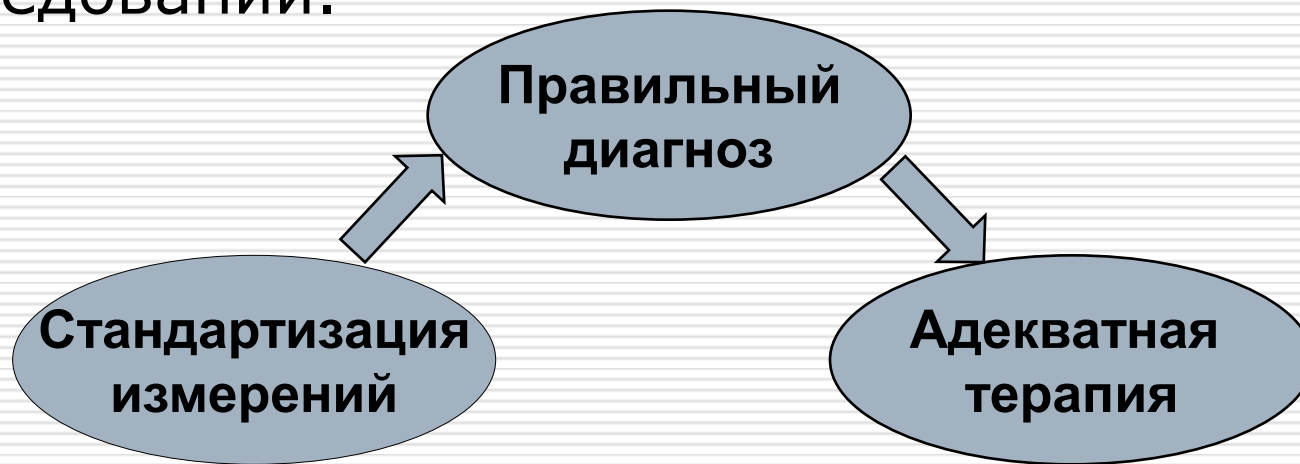
Концентрация фибриногена

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 аттестовать свои препараты-калибраторы и КМ.

Выводы:

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



Новые стандартизованные реагенты Отечественного производства НПО

С 1 января 2015 года набор реагентов для определения фибриногена («Фибриноген-тест» (кат.№ ПГ-10/1) является универсальным для всех типов коагулометров благодаря использованию универсального стандартизованного тромбина человека



КОНСУЛЬТАЦИИ ПО ТЕЛЕФОНАМ:

88002009057, 88043332261

звонки по России бесплатные

Спасибо за внимание!



Информация по теме на сайте: www.renam.ru