

И.Г. Нетесова, М.Р. Бобкова

**Внутрилабораторный контроль
качества неколичественных методов
ИФА**

Информационно-методическое пособие

2011

Авторы:

к.б.н. Нетесова И.Г., ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск,
д.б.н. Бобкова М.Р., НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, Москва.

Авторы выражают благодарность за неоценимую помощь и поддержку в работе по подготовке данного пособия профессору, д.б.н. Малахову В.Н., к.б.н. Хайдуковой И.Л. (Центр внешнего контроля качества клинических лабораторных исследований, Москва), Ястребовой О.Н. (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск).

Внутрилабораторный контроль качества неколичественных методов ИФА: информационно-методическое пособие / И.Г. Нетесова, М.Р. Бобкова. – Новосибирск : Вектор-Бест, 2011. – 88 с.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	5
Основные термины	6
Внутрилабораторный контроль качества неколичественных методов ИФА с применением контрольных материалов	8
Порядок проведения внутрилабораторного контроля качества	10
Стадия 1. Оценка внутрисерийной сходимости результатов измерений.....	10
Стадия 2. Оценка чувствительности и специфичности анализа в лаборатории, ОП крит, межсерийной сходимости результатов измерений, построение контрольной карты.....	11
Стадия 3. Проведение оперативного контроля качества результатов лабораторных исследований в каждой аналитической серии с помощью KO_1 , KO_2 и KO_3	12
Смена контрольного материала	15
Смена серии набора реагентов	16
Приложение	17
Литература	18

Надежность лабораторных исследований, направленных на выявление социально значимых инфекций с целью обеспечения безопасности переливания донорской крови, а также для установления наличия или отсутствия определенной инфекции в порядке клинического обследования, является неперенным условием работы клинико-диагностических лабораторий и должна соответствовать требованиям, установленным нормативными документами Министерства здравоохранения России.

Контроль качества исследований, проводимых методом ИФА, производится в двух взаимосвязанных формах: внутрилабораторного контроля качества (ВКК) и внешней оценки качества (ВОК).

ВКК – система процедур с применением контрольных материалов или на основе статистического анализа результатов исследований проб пациентов для оценки характеристик аналитического качества используемых методик исследования с целью удовлетворения требований по качеству и повседневного мониторинга стабильности результатов (1).

Подробный порядок проведения ВКК количественных клинических лабораторных исследований приводится в приложении к Приказу N 45 МЗ РФ от 07.02.00 «Правила внутрилабораторного контроля качества количественных лабораторных исследований» (2) и в отраслевом стандарте «Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов» ОСТ 91500.13.0001-2003 (3).

Что касается контроля качества неколичественных методов, то первая попытка описания порядка ВКК была предпринята в методических рекомендациях «Применение контрольных образцов для внутрилабораторного контроля качества скринингового ИФА на наличие антител к ВИЧ» (4). Были предложены два контрольных образца с разным содержанием маркера, с их помощью можно было оценить сходимость и воспроизводимость анализов, но не была решена другая задача – найти аналог оценки систематической погрешности количественного анализа и ввести его в ВКК.

В данном пособии эта задача решена путем введения в ВКК оценки чувствительности и специфичности анализа с помощью контрольных образцов.

Основные термины, используемые в документе, и их практическое применение

Чувствительность теста – вероятность его положительного результата в присутствии патологии.

Истинно положительный результат подтверждает наличие действительно имеющейся патологии.

Ложноположительный результат указывает на присутствие патологии, несмотря на ее отсутствие в действительности.

Ложноотрицательный результат исключает наличие патологии, когда она действительно присутствует.

Специфичность теста – вероятность его отрицательного результата в отсутствии патологии.

Истинно отрицательный результат исключает наличие патологии в условиях действительного ее отсутствия(5).

В данном пособии под чувствительностью анализа в лаборатории будет подразумеваться доля положительных результатов среди повторных результатов анализа одного и того же образца с низким содержанием серологического маркера (значение оптической плотности (ОП) в диапазоне от $ОП_{крит}$ до $2 \times ОП_{крит}$). Под специфичностью анализа в лаборатории будет подразумеваться доля отрицательных результатов среди повторных результатов анализа одного и того же образца, заведомо не содержащего серологический маркер.

$ОП_{крит}$ – точка разделения (cut off) положительных результатов от отрицательных, вычисляется по формуле изготовителя теста, чаще всего, как $ОП_{К^-}$ (отрицательный контроль) + константа или $ОП_{К^-} \times константа$. В редких случаях вычисление $ОП_{крит}$ связано с $ОП_{К^+}$ (положительный контроль).

Аналитическая серия – совокупность измерений лабораторного показателя, выполненных одновременно в одних и тех же условиях без перенастройки и калибровки аналитической системы.

Внутрисерийная воспроизводимость (сходимость измерений) – качество измерений, отражающее близость друг к другу результатов измерений, выполняемых в одной и той же аналитической серии.

Межсерийная воспроизводимость – качество измерений, отражающее близость друг к другу результатов измерений, выполняемых в разных аналитических сериях (2). В данном случае это межсерийная сходимость, так как анализы выполне-

ны в одной лаборатории (см. ниже определение условий воспроизводимости).

Установочная серия – серия из 20-ти измерений контрольных материалов в 20-ти аналитических сериях с целью построения контрольной карты в течение продолжительного периода времени (от 10-ти до 20-ти дней) (2).

Условия сходимости – условия, при которых независимые результаты измерений получают одним и тем же методом на идентичных объектах испытаний, в одной и той же лаборатории, с участием одного и того же оператора, с использованием одного и того же оборудования, в пределах короткого промежутка времени.

Условия воспроизводимости – условия, при которых результаты измерений получают одним и тем же методом, на идентичных объектах испытаний, в разных лабораториях, разными операторами, с использованием различного оборудования.

На практике измерения в условиях сходимости должны проводиться в течение как можно менее продолжительного периода времени, чтобы свести к минимуму изменения условий окружающей среды, которым не может быть всегда гарантировано постоянство (6).

Измерения в условиях **сходимости** в ИФА проводятся в **одной** аналитической серии с минимальными временными затратами на одном стрипе или одном цельном планшете.

ВНУТРИЛАБОРАТОРНЫЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА НЕКОЛИЧЕСТВЕННЫХ МЕТОДОВ ИФА С ПРИМЕНЕНИЕМ КОНТРОЛЬНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Внутрилабораторный контроль качества представляет собой систему контрольных мер для **непрерывной оценки достоверности** получаемых результатов.

Основными параметрами качества тест-системы, обеспечивающими достоверность получаемых результатов, являются чувствительность и специфичность. Для оценки соответствия анализа заданным параметрам и проведения ВКК применяют специальные **контрольные материалы**: с минимальным содержанием маркера – для контроля чувствительности анализа и не содержащий маркера – для контроля специфичности анализа.

Значения ОП_{крит} позволяет отличать положительные от отрицательных результатов анализа. Ошибки, приводящие к неправильному определению значений ОП отрицательного контроля K^- или положительного контроля K^+ (если вычисление ОП_{крит} связано с K^+), приводят к неправильному вычислению ОП_{крит}, а значит, к ошибкам в интерпретации исследуемых образцов. Для повышения надежности контроля качества перед проведением собственно ВКК на основании измерений в 20-ти аналитических сериях устанавливаются **контрольные пределы разброса значений ОП_{крит}** ($ОП_{крит\ ср} \pm 3S$), от которых зависит принятие решения о результатах анализов. Все последующие значения ОП_{крит} должны укладываться в установленные пределы ОП_{крит}.

Для оценки вариации результатов неколичественного ИФА (внутри- и межсерийной сходимости) применяются те же параметры вариационной статистики, что и для оценки разброса результатов, получаемых количественными методами, то есть среднее значение, среднеквадратическое отклонение и коэффициент вариации CV. Использование этих параметров правомочно при условии, что частотные распределения многократного измерения одного и того же маркера в одном и том же контрольном материале одним и тем же аналитическим методом имеют вид нормального распределения.

Контрольные материалы

Для проведения внутрилабораторного контроля используются контрольные материалы, содержащие и не содержащие целевой маркер.

Для оценки **сходимости** результатов, построения **контрольной карты** и текущего **оперативного контроля** используется контрольный образец КО₁ с истинно положительным результатом, при этом значение его ОП находится в области линейной зависимости ОП от концентрации маркера (примерно от 0,5 о.е. до 1,5 о.е.). КО₁ не имеет аттестованных значений ОП, каждая лаборатория получает свои целевые значения в используемых тест-системах.

Для оценки **чувствительности** анализа в лаборатории применяется контрольный образец КО₂ с истинно положительным результатом, значение ОП которого превышает ОП_{крит}, но при этом является достаточно низким, в диапазоне от ОП_{крит} до 2х ОП_{крит}.

Для оценки **специфичности** анализа в лаборатории применяется контрольный образец КО₃ с истинно отрицательным результатом, значение ОП которого должно быть ниже ОП_{крит}.

Характеристики КО₂ и КО₃ в виде **коэффициентов позитивности** $K_{\text{поз}} = \text{ОП}_{\text{обр}} / \text{ОП}_{\text{крит}}$, установленных при их аттестации в разных наборах реагентов, должны приводиться в Приложении к инструкции по применению контрольных материалов.

Контрольные материалы, изготовленные на основе сыворотки или плазмы крови человека, являются потенциально инфекционными. При обращении с ними необходимо соблюдать меры предосторожности, предусмотренные правилами безопасности инструкции по применению контрольных материалов.

Применение контрольных материалов

Если контрольные материалы не определяются правильно в наборе реагентов, то они не могут быть использованы для проведения ВКК. Рекомендуется применять контрольные материалы в тех наборах реагентов, в которых они аттестованы (информация об этом должна содержаться в Приложении к инструкции по применению контрольного материала). Возможно применение контрольных материалов и наборов реагентов одного изготовителя.

Количество закупаемых контрольных материалов одной партии (серии), а также наборов реагентов одной серии должно быть достаточным для проведения оперативного контроля качества в течение не менее 3 месяцев (рекомендуется закупка контрольных материалов в расчете на 1 год).

Подготовка контрольного материала к исследованию проводится в соответствии с Инструкцией по применению контрольного мате-

риала. Контрольные материалы должны исследоваться так же, как и пробы пациентов, т.е. в тех же аналитических сериях и условиях.

Хранение контрольных материалов проводится в соответствии с инструкцией по применению контрольных материалов.

Порядок проведения внутрилабораторного контроля качества

Порядок проведения внутрилабораторного контроля качества состоит из трех последовательных стадий:

Стадия 1. Оценка внутрисерийной сходимости результатов измерений.

Стадия 2. Оценка чувствительности и специфичности анализа в лаборатории, ОП_{крит}, межсерийной сходимости результатов измерений, построение контрольных карт.

Стадия 3. Проведение оперативного контроля качества результатов лабораторных исследований в каждой аналитической серии.

На первой стадии в аналитической серии проводятся 10 измерений КО₁, на второй стадии в установочной серии – 20 измерений КО₁, КО₂ и КО₃ в 20-ти аналитических сериях. На третьей стадии проводится оперативный контроль с применением КО₁, КО₂ и КО₃.

Стадия 1. Оценка внутрисерийной сходимости результатов измерений.

Проводят 10 измерений КО₁ в одной аналитической серии. Из полученных 10-ти значений рассчитывают **коэффициент внутрисерийной вариации методики CV₁₀** и сравнивают с табличным (см. Приложение). Приведенные в таблице предельно допустимые значения коэффициентов вариации CV_{сход} получены эмпирическим путем на основании анализа результатов выявления образцов КО₁ лабораториями-участницами разных циклов Программы внешней оценки качества (ПВОК) ЗАО «Вектор-Бест» на наборах разных серий одного изготовителя (7). Вычисленное значение CV₁₀ в лаборатории должны быть меньше полученного в рамках ПВОК предельно допустимого значения CV_{сход}. Если вычисленный CV₁₀ для данного серологического маркера превышает табличное значение, следует провести работу по снижению внутрисерийной вариации результатов данного вида анализа.

Если внутрисерийная вариация метода отвечает установленным нормам, переходят к следующей стадии.

Стадия 2. Оценка чувствительности и специфичности анализа в лаборатории, ОП_{крит}, межсерийной сходимости результатов измерений, построение контрольной карты.

На этой стадии проводят по 20 измерений контрольных материалов КО₁, КО₂ и КО₃ в 20-ти аналитических сериях в течение 20-ти дней. Для сокращения продолжительности построения контрольной карты, а также для экономии контрольных материалов возможно проведение измерений дважды в день в течение 10-ти дней.

С помощью контрольного материала КО₂ проводится оценка чувствительности анализа в лаборатории. Основное требование к КО₂ заключается в том, что во всех 20-ти аналитических сериях значение ОП КО₂ должно превышать значение ОП_{крит}. Если значение ОП КО₂ ниже значения ОП_{крит}, необходимо найти причины ошибок, устранить их и повторить анализ.

С помощью контрольного материала КО₃ проводится оценка специфичности анализа в лаборатории. Основное требование к КО₃ заключается в том, что во всех 20-ти аналитических сериях значение ОП КО₃ должно быть ниже ОП_{крит}. Если значение ОП КО₃ выше или равно значению ОП_{крит}, необходимо найти причины ошибок, устранить их и повторить анализ.

Если КО₂ определяется как положительный, а КО₃ как отрицательный, то значение ОП КО₁ принимается.

По результатам 20 аналитических серий рассчитывают ОП КО_{1 ср.}, ОП_{крит ср.}, их средние квадратические отклонения S и коэффициенты вариации CV₂₀ :

$$\begin{aligned} X &= (\sum X_i) / 20 \\ S &= \sqrt{(X_i - X)^2 / 19} \\ CV_{20} &= S / X \times 100\% \end{aligned}$$

Полученный результат CV₂₀ КО₁ сравнивают с предельно допустимым табличным CV_{воспр} для данного серологического маркера (см. Приложение). Табличные значения CV_{воспр} получены эмпирическим путем на основании анализа результатов выявления КО₁ разными лабораториями-участницами разных циклов ПВОК на наборах разных изготовителей (7). Вычисленное значение CV₂₀ в лаборатории должны быть меньше предельно допустимого значения CV_{воспр}. Если вычисленный CV₂₀ для данного серологического маркера превышает табличное значение, следует провести

работу по снижению аналитической вариации метода, после чего провести 20 новых измерений KO_1 , KO_2 и KO_3 .

Для $ОП_{крит\ ср}$ рассчитывают контрольные пределы $\pm 3S$.

После получения удовлетворительных показателей для KO_1 , KO_2 и KO_3 переходят к этапу построения контрольной карты по значениям $ОП\ KO_1$. Из 20-ти полученных результатов вычисляют среднюю арифметическую величину $X_{ср}$, среднее квадратическое отклонение S и контрольные пределы $\pm 1S$, $\pm 2S$, $\pm 3S$. Наносят полученные значения на карту в виде горизонтальных линий (см. рис.1.). После построения контрольной карты переходят к следующей стадии.

Стадия 3. Проведение оперативного контроля качества результатов лабораторных исследований в каждой аналитической серии с помощью KO_1 , KO_2 и KO_3 .

С использованием построенной контрольной карты осуществляют оперативный (текущий) контроль качества результатов определения исследуемого показателя. С этой целью в каждой аналитической серии измеряют показатели оптической плотности KO_1 , KO_2 и KO_3 (каждый в одной лунке).

Вычисленное при оценке результатов значение $ОП_{крит}$ должно попадать в ранее рассчитанный интервал значений $ОП_{крит\ ср} \pm 3S$. Если значение $ОП_{крит}$ находится вне указанных пределов, необходимо найти ошибки, устранить их и провести анализ заново.

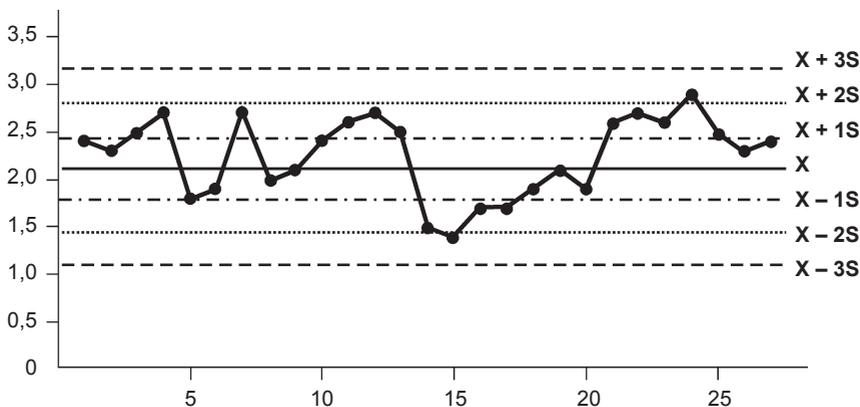
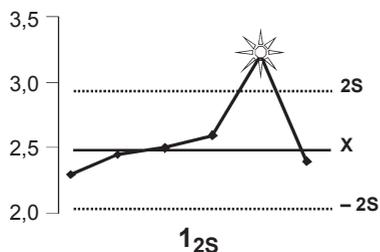


Рис.1. Контрольная карта

Если значение ОП_{крит} находится в установленном интервале ОП_{крит ср} ± 3S, переходят к оценке КО₂ и КО₃. Если КО₂ не определяется как положительный и/или КО₃ не определяется как отрицательный, то значение ОП КО₁ не засчитывается, необходимо найти ошибки, устранить их и провести анализ заново.

Если КО₂ определяется как положительный, а КО₃ определяется как отрицательный, то значение ОП КО₁ засчитывается и наносится на карту КО₁. Оценку результатов исследования контрольного материала КО₁ проводят с использованием контрольных правил Вестгарда (см. ниже).

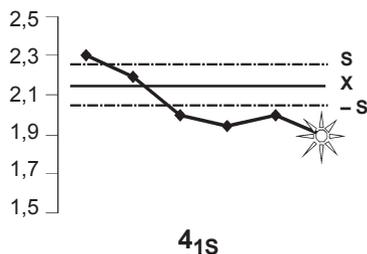
Правила Вестгарда



Правило 1_{2s} :

один из результатов ВКО выходит за пределы ±2S.

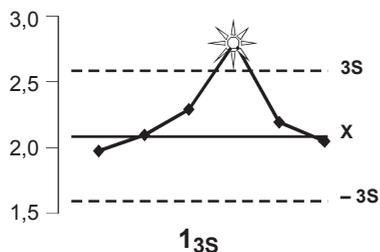
Признак **случайной** ошибки.



Правило 4_{1s} :

четыре последовательных измерения ВКО превышают +1S или лежат ниже предела -1S.

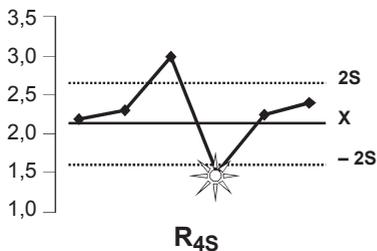
Признак **систематической** ошибки.



Правило 1_{3s} :

один из результатов ВКО выходит за пределы ±3S.

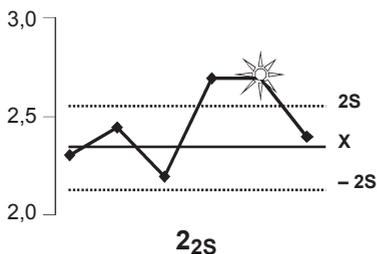
Признак **случайной** ошибки.



Правило R_{4s} :

два последовательных контрольных измерения ВКО расположены по разные стороны от «коридора» $\pm 2S$.

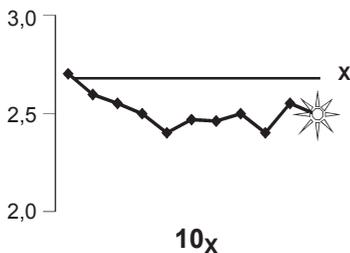
Признак **случайной** ошибки.



Правило 2_{2s} :

два последовательных контрольных измерения ВКО превышают предел $+2S$ или лежат ниже предела $-2S$.

Признак **систематической** ошибки.



Правило 10_x :

десять последовательных измерений одного из ВКО (или по пять последних измерений в каждом из двух ВКО) располагаются по одну сторону от линии, соответствующей X .

Признак **систематической** ошибки.

Проверка контрольных правил проводится в определенной последовательности (рис.2). Если полученные результаты измерения контрольного материала не выходят за пределы $\pm 2S$ (т.е. не нарушено правило **1_{2s}**), анализ признают удовлетворительным и результаты учитывают. Если не нарушено правило **1_{2s}**, но выявлен признак **4_{1s}**, результаты опыта также учитывают и делают попытку обнаружить причины этого предупреждения.

Если хотя бы один из результатов анализа контрольного материала выходит за пределы $\pm 2S$ (т.е. нарушено правило **1_{2s}**), то проверяется последовательно наличие остальных признаков.

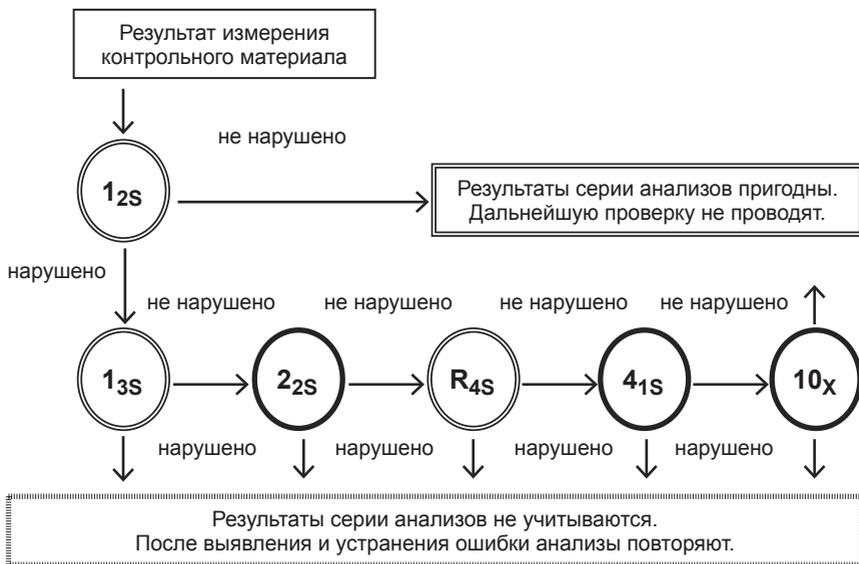


Рис.2.

Если при этом нарушено правило $41s$ или хотя бы одно из правил $13s$, $R4s$, $22s$ или $10x$, все результаты данного опыта считают неприемлемыми, проведение анализов приостанавливают, выявляют и устраняют возможные причины возникновения погрешностей.

Появление на контрольной карте признаков нарушения правил $12s$, $13s$ и $R4s$ свидетельствует о вероятном наличии случайных ошибок в ходе лабораторного процесса. Признаки $22s$, $41s$ и $10x$ более чувствительны к систематическим ошибкам.

Смена контрольного материала.

Для поддержания непрерывности внутрилабораторного контроля в период, когда используемого КО₁ остается только на 20 аналитических серий, осуществляют переход на новый контрольный материал путем «перекрывания». Для этого новый КО₁ исследуют в течение 20-ти рабочих дней в каждом опыте параллельно с используемыми КО₁, после чего для нового контрольного материала КО₁ рассчитывают контрольные пределы и строят новую контрольную карту. В период получения данных 20-ти аналитических се-

рий возможно вычисление среднего значения ОП KO_1 из двух-трех первых полученных значений, при этом возможно использование среднеквадратического отклонения S из предыдущей карты для построения временных контрольных пределов вокруг нового среднего. Переход к новым значениям среднеквадратического отклонения S осуществляется после накопления 20 новых значений KO_1 . Что касается KO_2 и KO_3 , то после окончания одной серии любого из этих контрольных материалов вводится другая, необходимости в параллельных постановках нет.

Смена серии набора реагентов.

В случае перехода на новую серию набора реагентов исследуют все контрольные материалы KO_1 , KO_2 и KO_3 , в 20-ти аналитических сериях, как описано на стадии 2. По полученным 20-ти значениям KO_1 рассчитывают контрольные пределы и строят **новую контрольную карту**. В период получения данных 20-ти аналитических серий возможно вычисление среднего значения ОП KO_1 из двух-трех первых полученных значений, при этом возможно использование среднеквадратического отклонения S из предыдущей карты для построения временных контрольных пределов вокруг нового среднего. Переход к новым значениям среднеквадратического отклонения S осуществляется после накопления 20 новых значений KO_1 .

Приложение.

Предельно допустимые значения 95% доверительного интервала для индивидуальных значений коэффициента вариации CV, рассчитанные по результатам измерений определяемого показателя в контрольных материалах, содержащих серологические маркеры гепатитов В, С, ВИЧ инфекции, в лабораториях России в рамках ПВОК ЗАО «Вектор-Бест» (7).

Серологический маркер	CV сход	CV воспр
HBsAg	0–11,3%	0–14,2%
анти-ВГС	0–15%	0–19%
анти-ВИЧ	0–15%	0–19%

Литература:

1. ГОСТ Р 53133.3-2008 Контроль качества клинических лабораторных исследований, часть 3.
2. Приказ N 45 МЗ РФ от 07.02.00 «Правила внутрилабораторного контроля качества количественных лабораторных исследований».
3. «Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов» ОСТ 91500.13.0001-2003.
4. Бобкова М.Р., Буравцова Е.В., Калашникова Т.В., Покровский В.В., Суворова З.К. «Применение контрольных образцов для внутрилабораторного контроля качества скринингового ИФА на наличие антител к ВИЧ», Москва, 2004.
5. ГОСТ Р 53022.3-2008 Требования к качеству клинических лабораторных исследований, часть 3.
6. ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002, часть 1, раздел 3.14.
7. Нетесова И.Г., Ярославцева О.А., Цой Л.В., Жуков В.А., Нетесов С.В. Результаты участия 360 лабораторий России в Программе Внешней Оценки Качества исследований HBsAg. Клин. лаб. диагностика, №3, стр. 47–50, 2007.

Информационно-методическое пособие

И.Г. Нетесова, М.Р. Бобкова

**Внутрилабораторный контроль качества
неколичественных методов ИФА**

Верстка С.А. Сизикова

Подписано в печать 23.03.11. Бумага офсетная. Формат 60×84/16.
Усл.-печ. л. 1,25. Тираж 1000 экз.

Отдел оперативной печати ЗАО «Вектор-Бест».
630559 Новосибирская обл., п. Кольцово, а/я 121.