

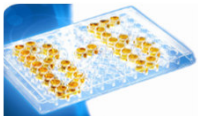
Организация и проведение внутрилабораторного контроля качества неколичественных методов ИФА с помощью оценки аналитической надежности лабораторных исследований

Нетесова Ирина Григорьевна

netesova@vector-best.ru

телефон 913 011 21 02

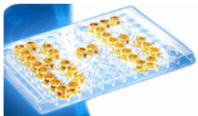
Краснодар, 6 июня 2018



www.vector-best.ru

Внутрилабораторный контроль качества

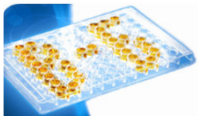
- Система процедур с применением **контрольных материалов** или **на основе статистического анализа** результатов исследований проб пациентов для оценки характеристик аналитического качества используемых методик исследования с целью удовлетворения требований по качеству и повседневного мониторинга стабильности результатов (ГОСТ Р 53133.3-2008 Контроль качества клинических лабораторных исследований).



ГОСТ Р 53022.2-2008 Требования к качеству клинических лабораторных исследований

Часть 2. Оценка аналитической надежности методов исследований

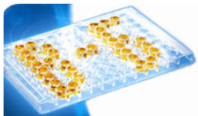
- **Аналитическая надежность** представляет собой важную составляющую качества исследований, характеризующую степень достоверности лабораторных данных об изучаемом анализе и тем самым определяющую возможность использовать их при принятии клинических решений
- **Аналитическая надежность** клинических лабораторных исследований характеризуется свойствами методов, которыми они выполняются:
- Для **количественных** методов:
- Точностью (правильностью и прецизионностью) измерений
- Аналитической чувствительностью и специфичностью
- Для **неколичественных (качественных)** методов:
- Частотой совпадения обнаружения патологических отклонений изучаемого компонента биоматериала с объективно подтвержденным наличием соответствующего заболевания



ГОСТ Р 53022.2-2008 Требования к качеству клинических лабораторных исследований

- 3.8. Правила оценки аналитической надежности неколичественных методов клинических лабораторных исследований.
- В отношении визуальных*** неколичественных методов применяют оценку по частоте обнаружения с их помощью искомым компонентам биоматериалов, включая компоненты, характерные (по своей морфологии, химическому или биологическому сродству с определенными хромофорами, флюорохромами, антителами) для специфических форм патологии, для диагностики которых предназначен данный вид исследований.

***Толковый словарь Т.Ф. Ефремовой: визуальный – наблюдаемый зрительно, видимый невооруженным глазом или с помощью оптического прибора



36 лабораторий-участниц проекта «Организация ВКК
неколичественных методов в лаборатории» (без СПК и ИБ), 2016 г

- ЦФО – 3 лаборатории
- ПФО – 21 лаборатория
- СФО – 4 лаборатории
- ДФО – 8 лабораторий
- Обращение к участнику;
- **Таблица** «Частота выявления маркера» (HBsAg, анти-ВГС)

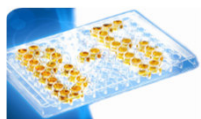
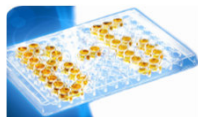


Таблица «Частота выявления маркера»

№ аналитической серии	дата анализа	ФИО оператора	№ серии набора реагентов	Изготовитель набора реагентов, кат.№	Количество исследованных образцов (n)	Количество первично положительных образцов (m)	Количество подтвержденных положительных образцов
1	01.09.16	Иванова И.И.	1599	ВБ D-0557	88	4	3
2	02.09.16	Иванова И.И.	1599	ВБ D-0557	91	5	3
3	05.09.16	Иванова И.И.	1599	ВБ D-0557	25	0	0
4	06.09.16	Иванова И.И.	1599	ВБ D-0557	37	1	0
5	07.09.16	Иванова И.И.	1599	ВБ D-0557	82	4	2
6	08.09.16	Иванова И.И.	1599	ВБ D-0557	68	3	2
7	09.09.16	Иванова И.И.	1599	ВБ D-0557	74	3	2
8	12.09.16	Иванова И.И.	1599	ВБ D-0557	90	4	3
9	13.09.16	Иванова И.И.	1599	ВБ D-0557	30	0	0
10	14.09.16	Иванова И.И.	1599	ВБ D-0557	86	3	2
11	15.09.16	Иванова И.И.	1599	ВБ D-0557	57	2	2
12	16.09.16	Иванова И.И.	1599	ВБ D-0557	90	3	2
13	17.09.16	Иванова И.И.	1599	ВБ D-0557	36	1	1
14	20.09.16	Иванова И.И.	1599	ВБ D-0557	30	0	0
15	21.09.16	Иванова И.И.	1599	ВБ D-0557	89	3	1
16	22.09.16	Иванова И.И.	1599	ВБ D-0557	77	3	2
17	23.09.16	Иванова И.И.	1599	ВБ D-0557	61	2	2
18	26.09.16	Иванова И.И.	1599	ВБ D-0557	89	5	3
19	28.09.16	Иванова И.И.	1599	ВБ D-0557	46	1	0
20	30.09.16	Иванова И.И.	1599	ВБ D-0557	83	3	2



Проект АО «Вектор-Бест» Организация ВКК не количественных методов ИФА (на примере HBsAg, доступен для анти-ВГС, анти-ВИЧ-1)

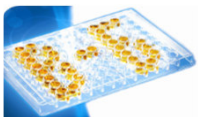
- Контрольные материалы:

ВЛК HBsAg (D-0538)

МИНИпол 2 (D-3002) минимальный положительный контроль для контроля аналитической надежности каждой аналитической серии, содержащий HBsAg, анти-ВГС. **Значение ОП МИНИпол находится в диапазоне от ОП крит до 2хОП крит**

ОДС (D-3020) отрицательная донорская сыворотка, не содержащая серологические маркеры инфекций: сифилиса (*антитела к Treponema pallidum*), гепатита В (HBsAg, *анти-HBs*), гепатита С (*анти-ВГС*), ВИЧ-инфекции (*анти-ВИЧ-1,2 и p24-антиген ВИЧ-1*) - для контроля аналитической надежности каждой аналитической серии. **Значение ОП ОДС ниже ОП крит**

- Контрольный набор реагентов для проведения исследований **Вектоген-В HBs-антиген (D-0557)**



ИСО 15189-2015, раздел 5.6.Обеспечение качества результатов исследований

5.6.2 Контроль качества

5.6.2.1 Общие положения

Лаборатория должна спланировать процедуры контроля качества, чтобы верифицировать *(подтвердить)* достижение желательного качества результатов.

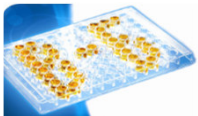
5.6.2.2 Материалы контроля качества

Лаборатория должна использовать материалы контроля качества, реакция которых с изучаемой системой близка, насколько это возможно, к реакции проб пациентов с системой.

Материалы контроля качества должны быть периодически исследованы с частотой, которая основана на стабильности методики и риске вреда пациенту от ошибочного результата.

Примечания

1. Лаборатория должна избрать концентрации контрольных материалов, насколько это возможно, близко к значениям клинических решений, тем самым подтверждая валидность принятых решений

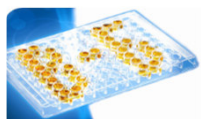


И.Г. Нетесова, Л.А. Мостович, О.А. Ярославцева «Некоторые результаты пилотного проекта «Организация внутрилабораторного контроля качества неколичественных методов иммуноферментного анализа» в 36 лабораториях 4-х регионов России» НОВОСТИ «Вектор-Бест» № 3 (85) 2017

Выводы

Применение контрольных материалов для ВКК («МИНИпол», «ОДС», «ВЛК HBsAg») позволило выявить **ошибки при проведении анализа в 12 (34, 3%) лабораториях.**

В результате контрольные карты по значениям ОП ВЛК HBsAg были построены для **19 из 35 (54,3 %) лабораторий** – участниц проекта из-за ошибок, допущенных при проведении и учете результатов исследований 20 установочных серий.



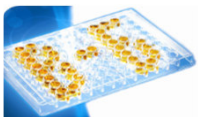
ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015
Статистические методы
Контрольные карты Шухарта

10. Контрольные карты для альтернативных данных

- **Альтернативные данные** представляют собой наблюдения, фиксирующие наличие или отсутствие некоторых характеристик (или признаков) у каждой единицы (образца крови) рассматриваемой подгруппы (аналитической серии). На основе этих данных производится подсчет числа единиц, обладающих или не обладающих данным признаком.
- Формула контрольных границ для контрольных карт ($\pm 3\sigma$), использующих альтернативные данные:

$$\pm 3 * \sqrt{\frac{P_{\text{cp}}(1 - P_{\text{cp}})}{n}}$$

Где P_{cp} – среднее значение доли несоответствующих (положительных) единиц,
 n – объем подгруппы (количество образцов в исследовании)

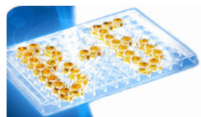


ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015
Статистические методы
Контрольные карты Шухарта

Альтернативная процедура для ситуаций, в которых объем подгруппы меняется существенно (более $\pm 25\%$ целевого объема) – использование нормированных переменных.

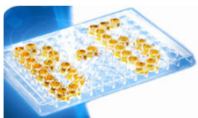
нормировка

$$z = \frac{(p - \bar{p})}{\sqrt{\frac{\bar{p}(1 - \bar{p})}{n}}}$$



Предварительный сбор данных

- Предварительные данные могут быть собраны **последовательно**, пока не будет получено 20-25 подгрупп (установочных серий) при **непрерывном ходе процесса**
- Необходимо использовать хоть какой-нибудь **контрольный материал** (МИНИпол, ВЛК, слитая сыворотка) при проведении 20-25 установочных серий для построения p (z)-карты, чтобы **верно установить среднюю частоту**, а также **контрольные пределы** p (z)-карты

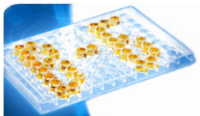


P (z)-карта частот выявления HBsAg ($p_{cp} = 0,028$) по первым 20 аналитическим сериям таблицы «частота выявления маркера» установлены параметры карты, частоты всех аналитических серий нанесены на карту



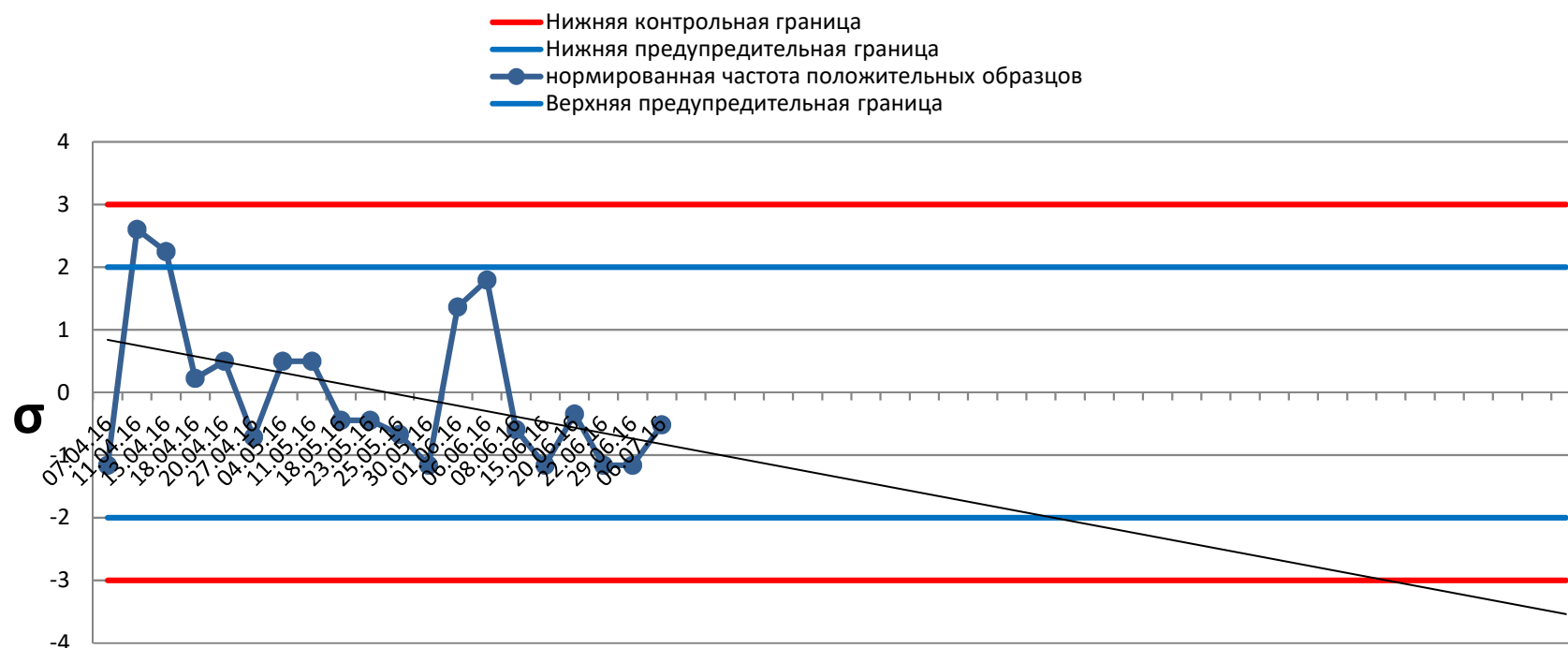
От чего зависит частота выявления маркера

- Распространенность заболевания
- Чувствительность и специфичность наборов реагентов
- Контингент обследуемых
- Время обследования (сезон)
- Смена изготовителя набора реагентов
- Ошибки или их воздействие на анализ может быть разнонаправленным!
- Еще?



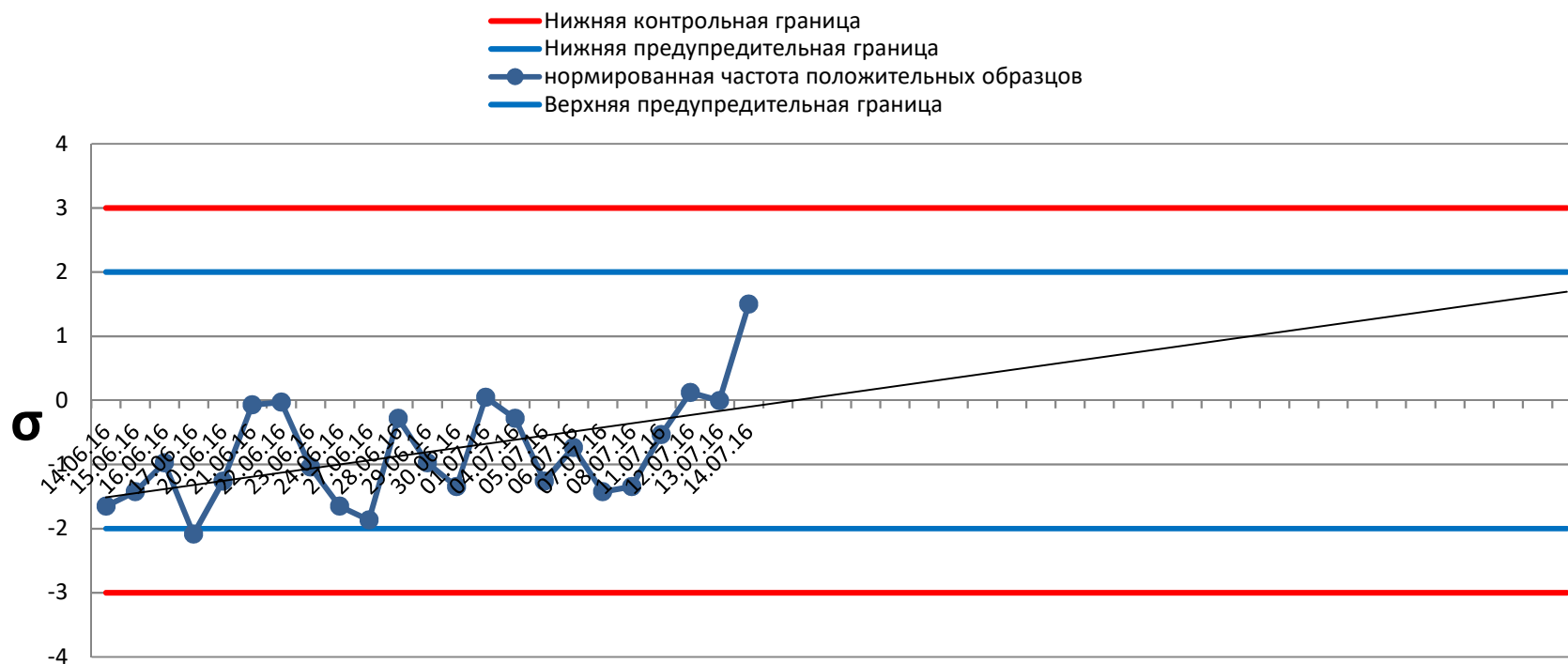
P (z)-карта частот выявления HBsAg ($p_{cp} = 0,018$) по первым 20 аналитическим сериям таблицы «частота выявления маркера» из лаборатории №27, нанесены частоты серий с 21 по 40

P (z)-карта частот HBsAg-положительных образцов



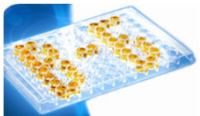
P (z) -карта частот выявления анти-ВГС ($p_{cp}=0,24$) по первым 20 аналитическим сериям таблицы «частота выявления маркера» из лаборатории №33, нанесены частоты серий с 21 по 43

P (z)-карта частот анти-ВГС-положительных образцов



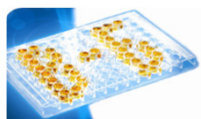
Нетесова И.Г., Мостович Л.А., Шумаков И.В., Ястребова О.Н., Ярославцева О.А.
«Внутрилабораторный контроль качества неколичественных методов ИФА по частоте
выявления искомых компонентов», Справочник заведующего КДЛ, №8, 2017

- Выводы
- Построенные по ретроспективным данным p (z)-карты частот выявления маркера можно использовать для дальнейшего оперативного контроля HBsAg в 24 (67%) из 36 (100%), анти-ВГС - в 5 (63%) из 8 (100%) лабораторий – участниц проекта
- В 33-37% лабораторий участниц обнаружены выходы за верхнюю контрольную границу $+3s$, тренд в 20 установочных сериях
- Нет выходов за нижнюю контрольную границу



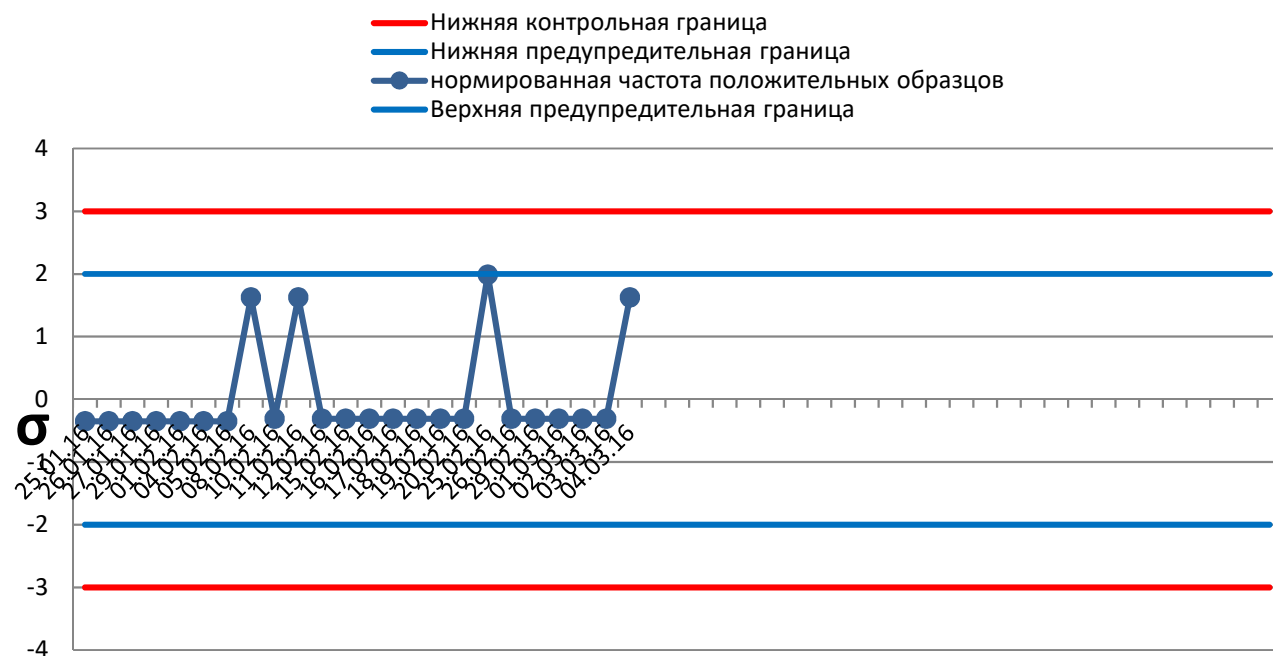
Данные 36 таблиц «Частота выявления HBsAg» и 8 таблиц «Частота выявления анти-ВГС»

Число таблиц	маркер	Средняя частота выявления маркера, %	Доля серий без положительных результатов, %	Среднее число образцов в аналитической серии
36	HBsAg	2,1	463 (43%) из 1072 (100%)	59
8	анти-ВГС	11	12 (4%) из 280 (100%)	53



Лаборатория №23, $p=0,9\%$, в 20 из 24 аналитических серий нет положительных результатов выявления HBsAg

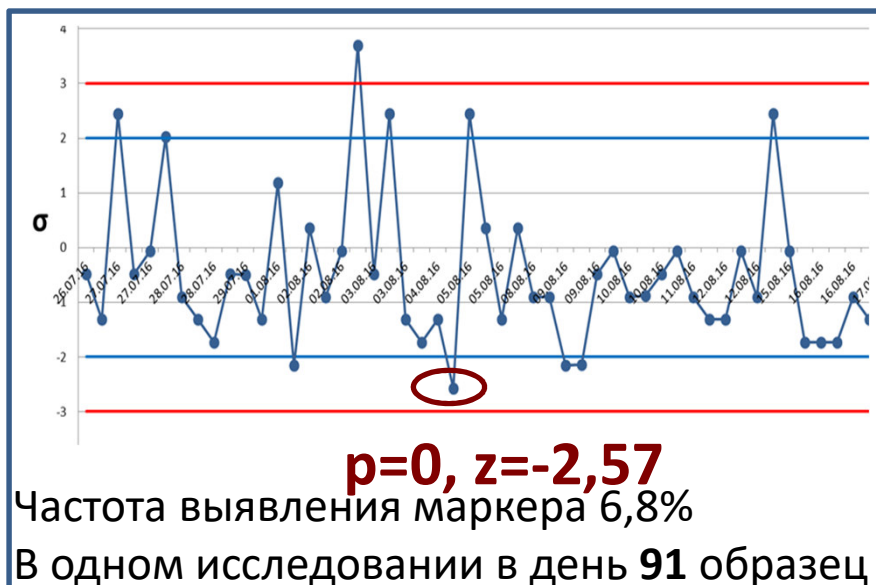
p-карта частот HBsAg-положительных образцов



Число образцов в аналитической серии, доля серий без положительных результатов, U-критерий Манна-Уитни для малых выборок <http://www.psychol-ok.ru/statistics/mann-whitney/>

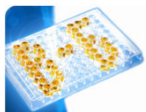
маркер	Число лабораторий	Доля серий без положительных результатов	Среднее число образцов в аналитической серии $\bar{X} \pm s$	U эмп	U крит	Значимость различий
HBsAg	16	0-40%	72±26	84,5	87	значимо
	20	40-90%	48±26			
анти-ВГС	6	0-5%	62±12	0	0	значимо
	2	7-14%	25±9			

Серии, где нет ни одного положительного результата



нормировка

$$z = \frac{(p - \bar{p})}{\sqrt{\frac{\bar{p}(1 - \bar{p})}{n}}}$$



Связь числа образцов в аналитической серии n со средней частотой выявления маркера P ср

$$Z = (P - P_{\text{ср}}) / \sqrt{P_{\text{ср}}(1 - P_{\text{ср}}) / n},$$

если $Z = -3$, $P = 0$, то $n = 9(1 - P_{\text{ср}}) / P_{\text{ср}}$ (для $-3s$);

если $Z = -2$, $P = 0$, то $n = 4(1 - P_{\text{ср}}) / P_{\text{ср}}$ при $P = 0$ (для $-2s$)

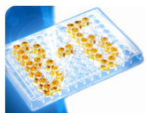
нормировка

$$z = \frac{(p - \bar{p})}{\sqrt{\frac{\bar{p}(1 - \bar{p})}{n}}}$$

Частота выявления маркера, %	0,1	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	15,0	20,0
n для контроля p=0 на границе -3s	8991	1791	891	441	291	216	171	141	120	104	91	81	51	36
n для контроля p=0 на границе -2s	3996	796	396	196	129	96	76	63	53	46	40	36	23	16

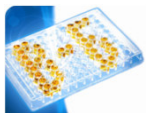
Увеличение числа образцов в аналитической серии

- Накопление образцов крови до проведения исследования, например, в течение недели или даже больше (Бурятия, ЦРБ)
- Но не в ущерб своевременности выдачи результатов!



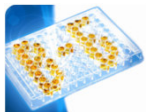
Объединение аналитических серий

Возможно объединение числа исследуемых образцов крови пациентов нескольких аналитических серий, выполненных в течение рабочего дня (на нескольких планшетах или несколько аналитических серий на одном планшете в течение дня при сохранении одинаковых условий проведения анализа) для ВКК, выдача результатов в таком случае проводится после оценки объединенной частоты выявления маркера.



Проблемы проведения ВКК по $p(z)$ –карте частоты выявления маркера

- Выход за **верхние** контрольные границы – поиск причин, возможно повторное исследование первично положительных образцов в скрининге, подтверждающем тесте, так как образцов **не много**.
- Выход за **нижние** предельные или контрольные границы – поиск причин. Что делать с **большим** количеством образцов с отрицательными результатами исследования?



Archana Solanki, Abhai Singh, Rajendra Chaudhary.

Impact of grey zone samples testing by enzyme-linked immunosorbent assay in enhancing blood safety: experience at a tertiary care hospital in North India. (Влияние тестирования образцов серой зоны в ИФА на повышение безопасности крови: опыт работы в больнице третичного звена в Северной Индии) Asian Journal of Transfusion Science, 2016, v10, p 71-74

- Автоматический ИФА-анализатор Davinci, Biomerieux
- Vironostika, HIV Ag/Ab, Biomerieux, Netherland
- Hepanostika, HBsAg ultra, Biomerieux, Netherland
- MonoLisa anti-HCV PLUS version 2, Biorad, France
- Контроль качества по контрольной карте положительного пограничного (приготовлен в лаборатории) КМ, построенной по 30 аналитическим сериям подряд
- **Серая зона – 10% ниже ОП крит**
- Образцы из серой зоны исследуются повторно в том же наборе реагентов на следующий день в дублях
- Если хотя бы в одном из дублей образца из серой зоны значение ОП выше ОП крит, образец признается реактивным
- Если хотя бы в одном из дублей образца из серой зоны значение ОП остается в серой зоне, образец признается неопределенным, донация бракуется, но донор документируется как нереактивный, и вызывается на повторное исследование через 6 месяцев
- Всего исследовано на три маркера 21252 донора, HBsAg выявлен в 382 (1,79%), анти-ВИЧ – в 82 (0,38%), анти-ВГС – в 108 (0,5%), кумулятивная серопозитивность по трем маркерам **2,67%**

Archana Solanki, Abhai Singh, Rajendra Chaudhary. Impact of grey zone samples testing by enzyme-linked immunosorbent assay in enhancing blood safety: experience at a tertiary care hospital in North India. (Влияние тестирования образцов серой зоны в ИФА на повышение безопасности крови: опыт работы в больнице третичного звена в Северной Индии) Asian Journal of Transfusion Science, 2016, v10, p 71-74

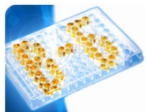
Из 21252 (100%) образцов крови доноров 119 (0,5%) попали в серую зону

маркер	Образцы серой зоны	Повторно не реактивны	Повторно реактивны	Повторно неопределенные
HBV	77	28	45	4
HIV	23	10	12	1
HCV	19	5	13	1
сумма	119 (100%)	43 (36%)	70 (59%)	6 (5%)

Archana Solanki, Abhai Singh, Rajendra Chaudhary.

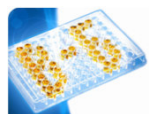
Impact of grey zone samples testing by enzyme-linked immunosorbent assay in enhancing blood safety: experience at a tertiary care hospital in North India. (Влияние тестирования образцов серой зоны в ИФА на повышение безопасности крови: опыт работы в больнице третичного звена в Северной Индии) Asian Journal of Transfusion Science, 2016, v10, p 71-74

- Введение серой зоны 10% ниже ОП крит при рутинном скрининге привело к возрастанию кумулятивной серопозитивности по трем маркерам с 2,67% до 3%



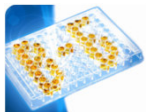
Что делать при выходе текущей частоты выявления маркера за нижние границы $p(z)$ –карты частот

1. Повторное исследование образцов 10% серой зоны $0,9 \cdot OP$ крит в скрининге в дублях, возможно, часть их станет положительными
2. Использовать во всех аналитических сериях МИНИпол, так как концентрация маркеров в нем находится близко к значениям клинических решений, тем самым подтверждая валидность принятых решений



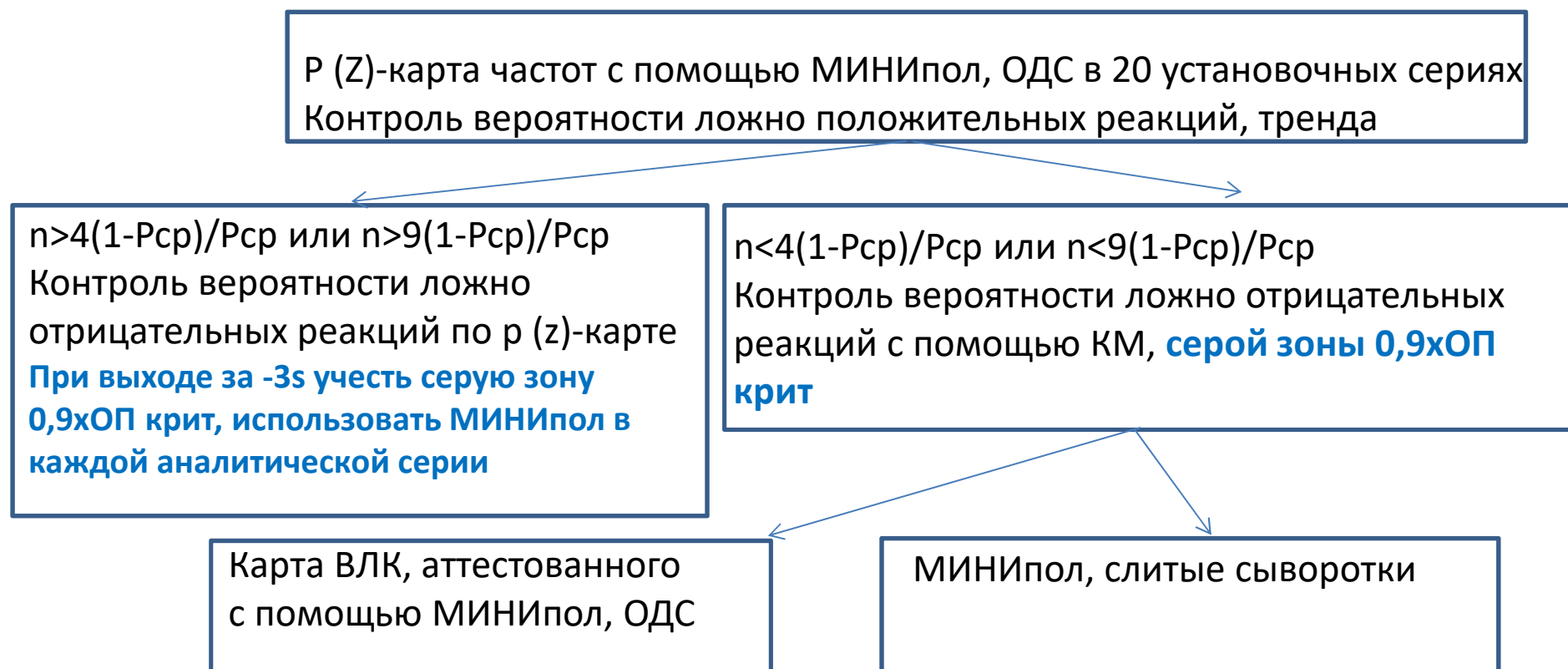
Проблемы организации и проведения ВКК неколичественных методов ИФА

- Низкая частота выявления маркера
- Малое число образцов в аналитической серии
- Нет возможности отслеживать вероятность появления ложно отрицательных результатов
- Необходимо использовать КМ (мало коммерческих КМ), слитые сыворотки (трудности при приготовлении и хранении) при проведении установочных серий



Организация и проведение ВКК не количественных методов ИФА в лаборатории

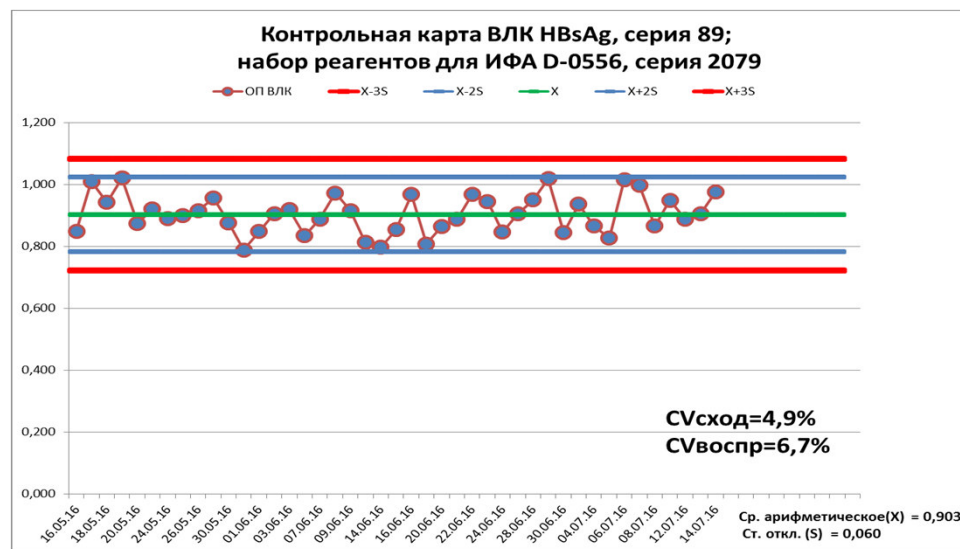
- По частоте выявления маркера, построение $p(z)$ -карты с помощью МИНИпол, ОДС; контроль вероятности ложно положительных реакций, стабильности процесса (тренд)
- Определение частоты выявления маркера и числа образцов в аналитической серии, выполнение требований по числу образцов при $P=0$
 $n > 9(1-P_{cp})/P_{cp}$ (для $-3s$) или $n > 4(1-P_{cp})/P_{cp}$ (для $-2s$)
- Оценить долю первично отрицательных результатов в зоне 0,9хОП крит по 20 анал. сериям
- Если нет контроля вероятности ложно отрицательных реакций по частоте и числу образцов, необходимо постоянно использовать КМ для слежения за стабильностью процесса: ВЛК, аттестован относительно МИНИпол и ОДС, построение карты ВЛК.
- Если построение карты ВЛК растягивается на продолжительный период времени (больше 1-2 месяцев), то необходимо использовать в каждом исследовании КМ для оценки аналитической надежности типа МИНИпол, ОДС.
- Ввести серую зону 0,9хОП крит для контроля вероятности ложно отрицательных реакций с последующим повторным анализом в дублях образцов серой зоны.



Нетесова И.Г., Мостович Л.А., Ярославцева О.А. «Организация внутрилабораторного контроля качества неколичественных методов иммуноферментного анализа с помощью оценки аналитической надежности лабораторных исследований» Спецвыпуск Лаборатория ЛПУ, Поликлиника, №12, 2018

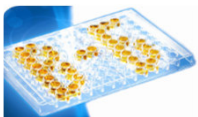
Лаборатории-участницы по итогам проекта получают в электронном виде и на бумажном носителе

- данные протоколов в виде **контрольных карт Шухарта по ВЛК** на контрольном и (или) имеющемся в лаборатории наборе одной серии и анализов
- **оценку сходимости** с помощью коэффициента вариации $CV_{сход}$, вычисленного по 10 значениям ОП ВЛК HBsAg в одной аналитической серии, **оценку воспроизводимости** с помощью CV_{20} , вычисленного по 20 значений ОП ВЛК в 20 аналитических сериях.



Лаборатории-участницы по итогам проекта получают в электронном виде и на бумажном носителе

- данные таблицы «Частота выявления маркера» в виде р (z)-карты частот согласно ГОСТ Р 50779.42-99 (ИСО 8258-91)



Лаборатории-участницы по итогам проекта получают в электронном виде и/или на бумажном носителе

- проект **стандартной операционной процедуры** (СОП) согласно **ИСО 15189** по организации ВКК неколичественных методов ИФА на аналитической и пост аналитической стадиях в лаборатории;
- **компьютерные программы в Microsoft Excel 2010 для построения контрольных карт;**
- **комментарии** по всем результатам исследования КМ и приведенным частотам выявления маркера

Как принять участие в проекте? Обратиться к ведущему менеджеру региона

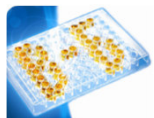
Терещенко Екатерина Николаевна

Анализ таблиц частот выявления HBsAg, анти-ВГС, анти-ВИЧ из лабораторий-участниц проектов «Организация ВКК» и «Построение контрольных карт» 10 регионов, 2016-2018

маркер	HBsAg	анти-ВГС	анти-ВИЧ
Число лабораторий	106	122	59
Средняя частота выявления маркера по первично положительным результатам	3,0%	7,8%	1,4%
Минимальная - максимальная частота	0,1% - 10,2%	0,1% - 45,1%	0,1% - 5,0%
Среднее число образцов в аналитической серии	61	58	89
Минимальное – максимальное число образцов в аналитической серии	11 - 307	3 - 312	6 - 850
Необходимое число образцов в аналитической серии для оценки вероятности ложно отрицательных результатов (-3s)	>296	>107	>643

Соавторы

- Мостович Людмила Андреевна, к.б.н., н.с.
- Безуглова Людмила Вячеславовна, с.н.с.
- Ярославцева Ольга Александровна, ст.
бактериолог отделения ИФА гепатита В





Когда следующая конференция?