



ОЦЕНКА КЛИНИЧЕСКОЙ ПРИЕМЛЕМОСТИ ВЕЛИЧИН НЕСТАБИЛЬНОСТИ БИОПРОБ

Методические указания

Москва, 2016

Учреждение-разработчик: ЗАО «Аналитика», г. Москва.

Авторы-составители: к.м.н. А.В. Багаев, к.т.н. С.П. Петров, к.т.н. М.И. Прищепа.

Общая редакция: к.т.н. М.И. Прищепа.

© ЗАО «Аналитика», 2016.

Рецензент: заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики РМАПО, д.м.н., профессор В.В. Долгов.

Назначение: настоящие методические указания предназначены для выполнения оценки клинической приемлемости величин нестабильности биопроб при подготовке мероприятий по централизации лабораторных исследований.

Информационная справка об учреждении-разработчике

С момента создания в 1989 году ЗАО «Аналитика» уделяет большое внимание вопросам контроля и обеспечения аналитического качества результатов лабораторных исследований. «Аналитика» первой из коммерческих компаний начала систематическую пропаганду внутрилабораторного контроля качества (ВКК) в профессиональной лабораторной среде и создала первую в РФ компьютерную программу «QC» для ведения ВКК.

Специалисты компании разработали утверждённые ДЗ Москвы методические рекомендации «Основы статистики и методы ведения внутрилабораторного контроля качества» (изданы в 1997 и 2002 г.г.), при участии «Аналитики» были подготовлены пособие «Обеспечение качества исследований в КДЛ» (1997 г.), справочник «Медицинские лабораторные технологии и диагностика» (1999 г.), приказ МЗ РФ №45 «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований» (2000 г.), ОСТ «Правила проведения внутрилабораторного контроля качества лабораторных исследований» (2003 г.) и ГОСТ Р 53133.2-2008 «Технологии лабораторные клинические. Контроль качества клинических лабораторных исследований. Часть 2».

Специалисты «Аналитики» опубликовали целый ряд статей по вопросам метрологии в КДЛ и улучшения межлабораторной сопоставимости результатов, неоднократно делали сообщения на профильных форумах, а также провели в Москве и регионах более 80 семинаров для работников КДЛ по актуальным вопросам лабораторных исследований.

ЗАО «Аналитика» входит в число крупнейших российских поставщиков продукции для КДЛ (полный перечень поставляемой продукции доступен на сайте www.analytica.ru), предлагая широкий спектр аналитических систем и всё необходимое для обеспечения надлежащего качества результатов лабораторных исследований, включая техническое обслуживание оборудования и методическую поддержку пользователей.

Поскольку одним из направлений развития отечественной лабораторной службы является централизация исследований, «Аналитика» предлагает регионам свою новую разработку - изложенную в настоящем пособии методологию оценки и контроля нестабильности биопроб в реальных условиях их хранения и транспортировки.

РАЗДЕЛ 1

Определение величин нестабильности состава биопроб и клинической приемлемости этих величин

1.1. Введение.....	4
1.2. Теоретические основы определения величин нестабильности состава биопроб.....	6
1.2.1. Основные принципы количественного определения величин нестабильности состава биопроб.....	6
1.2.2. Определение величины нестабильности с использованием двух аналитических систем.....	9
1.2.3. Определение величины нестабильности с использованием одной аналитической системы.....	11
1.3. Предварительные измерительные процедуры.....	13
1.3.1. Установление или подтверждение рабочих значений характеристик аналитических систем.....	13
1.3.2. Определение величин систематических сдвигов между аналитическими системами.....	15
1.4. Практическое определение величин отклонений содержания аналита в биопробах после их хранения и транспортировки.....	16
1.4.1. Выполнение измерений содержания аналитов в биопробах.....	16
1.4.2. Оценка статистической значимости отличий результатов измерений	21
1.4.3. Вычисление ожидаемых величин нестабильности в результате хранения и/или транспортировки биопроб	25
1.5. Оценка клинической приемлемости величин нестабильности биопроб.....	28
1.5.1. Определение предельно допустимых значений нестабильности биопроб.....	28
1.5.2. Установление клинической приемлемости отклонений лабораторных результатов от исходного содержания аналита в биопробах после их хранения и/или транспортировки.....	30

РАЗДЕЛ 2

Оперативный контроль клинической приемлемости величин нестабильности биопроб

2.1. Оперативный контроль за сохранением в допустимых пределах текущей нестабильности биопроб, доставляемых в централизованную лабораторию.....	32
2.1.1. Основные принципы ведения оперативного контроля для выявления значимых изменений величин нестабильности.....	33
2.1.2. Основные принципы метода контроля по «ежедневным средним»	34
2.1.3. Критерий установления клинической приемлемости текущих величин нестабильности	36

РАЗДЕЛ 3

Рекомендации по выбору аналитов и периферийных ЛПУ на начальном этапе внедрения методики

3.1. Основные принципы выбора ЛПУ для отработки навыков использования методики.....	37
3.1.1. Характеристики аналитических систем.....	38
3.1.2. Поток исследований и перечень анализов, наличие стационара или экспресс-лаборатории.....	38
3.1.3. Удаленность ЛПУ от ЦЛ.....	39
3.1.4. Оборудование пунктов взятия биопроб.....	39
3.2. Принципы выбора базового перечня аналитов.....	40
3.2.1. Температура и время хранения.....	40
3.2.2. Чувствительность к ненормируемым внешним воздействиям (свет и вибрация).....	41
3.2.3. Чувствительность к гемолизу.....	41
3.2.4. Внутрииндивидуальная и межиндивидуальная вариабельность.....	42
3.2.5. Принцип неоднородности.....	42
3.3. Принципы выбора контрольных материалов и проб пациентов.....	43
3.3.1. Контрольные материалы.....	43
3.3.2. Пробы пациентов.....	44
4. Практические рекомендации для апробации методики.....	44

Приложение 1

Перечень биохимических тестов, рекомендованных для апробации методики.....	46
--	----

Приложение 2

Краткий алгоритм подготовки и начального этапа внедрения методики в регионе.....	47
--	----

ЛИТЕРАТУРА.....	48
------------------------	-----------

РЕЦЕНЗИЯ

заведующего кафедрой КЛД ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава РФ д.м.н., проф. В.В. Долгова.....	49
--	----

РАЗДЕЛ 1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЕЛИЧИН НЕСТАБИЛЬНОСТИ СОСТАВА БИОПРОБ И КЛИНИЧЕСКОЙ ПРИЕМЛЕМОСТИ ЭТИХ ВЕЛИЧИН

1.1. ВВЕДЕНИЕ

Одним из направлений развития лабораторной службы здравоохранения является централизация исследований. Централизация предусматривает, что исследования содержания определенных аналитов в биопробах пациентов (далее для краткости будем говорить о биопробах), ранее выполнявшиеся в лабораториях конкретных лечебно–профилактических учреждений (далее будем называть их периферийными ЛПУ или просто ПЛПУ), передаются в централизованную лабораторию (далее ЦЛ). В результате в отношении аналитов, исследования которых подлежат централизации, лаборатории ПЛПУ будут превращаться в пункты взятия биопроб.

При централизации исследований между взятием биопроб в ПЛПУ и исследованием их в ЦЛ будут лежать следующие процедуры преаналитического этапа: 1) пробоподготовка и/или хранение биопроб в ПЛПУ в ожидании транспортировки, 2) транспортировка биопроб из ПЛПУ в ЦЛ и 3) хранение биопроб в ЦЛ до проведения их исследования. Проведение каждой из указанных процедур неизбежно повлечёт за собой изменения (хотя и разной степени) уровней аналитов в биопробах от уровней «in vivo», присущих биопробам в момент их взятия у пациента.

В этой связи актуальной задачей, требующей заблаговременного решения при подготовке к централизации исследований, становится определение стабильности содержания аналитов в биопробах при реальных условиях их взятия, пробоподготовки и доставки в ЦЛ из ПЛПУ. При централизации исследований достоверность получаемых в ЦЛ результатов, характеризующаяся степенью их соответствия исходным значениям аналитов, присущих пациенту «in vivo», будет определяться не только характеристиками используемых в ЦЛ аналитических систем (далее АС), но и текущей величиной нестабильности аналитов в доставляемых в ЦЛ биопробах. Если к моменту исследования в ЦЛ отклонение содержания аналита в биопробе от исходного уровня превысит предельно допустимое значение, то полученные в ЦЛ результаты не будут достоверно отражать состояние пациента и, следовательно, не будут обладать клинической приемлемостью, т.е. приемлемостью для решения клинических задач - скрининга, постановки диагноза и контроля за эффективностью терапии.

Общие требования к условиям и процедурам преаналитического этапа установлены ГОСТ Р 53079.4-2008 [3], в том числе требования к условиям хранения и транспортировки биопроб. Этот же стандарт определяет и количественные требования к максимально допустимым значениям величин нестабильности и времени хранения биопроб, устанавливая, что «...максимально допускаемая нестабильность, выраженная в %-ном отклонении результата после хранения от исходного уровня, не должна превышать половины размера общей ошибки определения, рассчитываемой из суммы биологической и аналитической вариаций данного аналита. Максимально допускаемое время хранения измеряется периодом времени, в течение которого в 95% образцов содержание аналита сохраняется на исходном уровне». Фактически стандарт

требует выполнения регулярной практической проверки клинической приемлемости «величины отклонения от исходного уровня результатов исследований проб пациентов после их хранения и транспортировки».

Однако указанные в Приложении Б к данному стандарту справочные данные о стабильности аналитов не являются, во-первых, исчерпывающими в плане перечня аналитов и видов биопроб и, во-вторых, относятся только к условиям стационарного хранения биопроб при определённых температурах, поэтому не могут быть экстраполированы на реальные условия централизации исследований.

Кроме того, из практики известно, что детали подготовки пациентов к взятию биопроб и процедуры взятия, конкретные сроки и условия хранения и транспортировки биопроб могут варьировать не только от ПЛПУ к ПЛПУ, но и в одном и том же ПЛПУ, что может приводить к существенной неконтролируемой вариации состава и свойств биопроб, присущих пациенту «in vivo», еще до начала исследования проб в ЦЛ даже при соблюдении известных сроков стабильности аналитов. Поэтому соблюдение установленных ГОСТ Р 53079.4-2008 условий хранения и транспортировки биопроб не гарантирует **клинической приемлемости** результатов, т.е. того, что содержание аналитов в биопробах до исследования в ЦЛ не отклонилось от их исходного содержания за допускаемые ГОСТ Р 53079.4-2008 пределы.

Таким образом, решение вопроса о передаче исследований любого аналита из лаборатории конкретного ПЛПУ в ЦЛ требует предварительного определения ожидаемого значения для величины их нестабильности и оценки его клинической приемлемости. Чтобы провести такую оценку, необходимо по результатам, полученным в ЦЛ и характеризующим содержание аналита в поступивших биопробах к моменту их исследования, определить величину отклонения содержания аналита от исходного уровня, затем оценить клиническую приемлемость полученной величины нестабильности путём сравнения её с максимально допускаемым для нее значением. Очевидно, что централизация исследований может проводиться только для тех аналитов и из тех ПЛПУ, для которых ожидаемые величины нестабильности не превышают максимально допускаемых для них значений. Поэтому перед началом мероприятий по централизации любого аналита важно заранее объективным путем убедиться, что эти мероприятия не приведут к тому, что получаемые в ЦЛ результаты не будут клинически приемлемыми.

Поскольку текущие величины нестабильности содержания аналитов в биопробах, поступающих из ПЛПУ в ЦЛ, изо дня в день могут значительно варьировать из-за неконтролируемых изменений в процессах взятия биопроб, пробоподготовки, хранения и транспортировки, то уже после того, как исследования каких-либо аналитов будут признаны пригодными для централизации, в ЦЛ необходимо вести оперативный контроль того, что изначально определённый уровень нестабильности биопроб, поступающих из конкретного ПЛПУ в ЦЛ, сохраняется в допустимых пределах. Причём этот контроль должен проводиться в условиях, когда исследования биопроб в этом ПЛПУ уже невозможны.

Из изложенного следует, что любая программа централизации исследований должна, во-первых, обязательно предваряться исследованиями по количественной оценке нестабильности

содержания аналитов для реальных условий хранения и транспортировки биопроб из конкретных ПЛПУ в ЦЛ и, во-вторых, предусматривать в дальнейшем возможность ведения для биопроб, поступающих в ЦЛ из всех ПЛПУ, оперативного ежедневного контроля за сохранением в допустимых пределах изначально определённого уровня нестабильности аналитов.

В работе [1] была предложена именно такая методика, использование которой позволяет количественно определять уровни нестабильности по отклонениям содержания аналитов в исследуемых в ЦЛ биопробах от их исходного значения и оценивать клиническую приемлемость уровня нестабильности согласно требованиям ГОСТ Р 53079.4-2008. Кроме того, эта методика позволяет вести в дальнейшем оперативный контроль для выявления существенных отклонений содержания аналитов от исходного уровня в ежедневно доставляемых в ЦЛ биопробах. Методические указания (далее МУ) по использованию этой методики изложены ниже.

1.2. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЕЛИЧИН НЕСТАБИЛЬНОСТИ СОСТАВА БИОПРОБ

1.2.1. Основные принципы количественного определения величин нестабильности состава биопроб

В известных технологиях оценки нестабильности выполняют взятие биопроб по установленной процедуре, измеряют исходные содержания аналитов в биопробах, затем осуществляют хранение биопроб в течение заданных интервалов времени при заданных температурах, повторно измеряют содержание аналитов с использованием той же АС, по разнице измеренных значений содержания аналитов оценивают величину нестабильности. При этом измерения проводят с использованием одной и той же АС и только для ограниченных условий и сроков хранения биопроб, оперативный контроль стабильности характеристик АС в течение времени исследований осуществляют с помощью стандартных процедур внутрилабораторного контроля качества (далее ВКК). Отметим, что данные об исследованиях нестабильности биопроб при воздействии факторов транспортировки в литературе отсутствуют.

Предлагаемая методика решает задачу количественной оценки величин нестабильности при различной локализации ПЛПУ и используемой для измерений содержания аналитов АС при произвольных сроках хранения и условиях транспортировки биопроб. При этом описываются способы, когда измерение содержания аналитов в биопробах до и после их хранения и транспортирования может быть выполнено как с использованием двух АС, первая из которых располагается в конкретном ПЛПУ, а вторая – в ЦЛ, так и с использованием только одной АС, расположенной в ЦЛ.

При использовании двух АС для учета возможных систематических смещений между результатами, получаемыми с использованием первой и второй АС, предусматривается специальная процедура определения текущих значений систематического сдвига между первой и второй АС. В этой процедуре определение величины систематического сдвига предлагается выполнять не реже одного раза в день, поскольку известно (по данным Food and Drug Administration, FDA, США), что стабильность калибровки АС, используемых в медицинских

лабораториях, в среднем не превышает 48 часов. Кроме того, поскольку решаемая с использованием методики задача количественной оценки типовых величин нестабильности во избежание снижения их достоверности требует существенно более высокой точности для определения текущих значений систематического сдвига по сравнению с результатами исследований содержания аналита в биопробах, то в данных МУ рекомендуется ежедневно выполнять многократные измерения содержания аналита в образцах одного и того же контрольного материала (далее КМ) с использованием первой и второй АС. Более того, такие измерения следует проводить ежедневно для образцов КМ с содержанием аналита не менее двух уровней, то есть для нормы и для патологии, так как АС могут иметь разные величины систематических сдвигов для нормальных и патологических уровней аналита, и это нужно учитывать, поскольку биопробы, стабильность которых подлежит оценке, могут иметь как нормальные, так и патологические уровни аналитов.

Поскольку исследования содержания аналита в пробах одних и тех же пациентов могут в общем случае проводиться в ЦЛ и в ПЛПУ в разные дни, то значение систематического сдвига между первой и второй АС на каждом исследуемом уровне аналита вычисляют по формуле

$$V_{js} = (X_{\text{ср.2}})_s - (X_{\text{ср.1}})_j, \quad (1)$$

где V_{js} – значение систематического сдвига между первой и второй АС, соответствующее j -му дню исследований в ПЛПУ и s -му дню исследований в ЦЛ; $(X_{\text{ср.1}})_j$ и $(X_{\text{ср.2}})_s$ – средние значения результатов многократных измерений содержания аналита в образцах одного и того же КМ, выполненных с использованием соответственно первой (в ПЛПУ) и второй (в ЦЛ) АС в течение соответственно j -того и s -того дня исследований.

Отметим, что предпочтительным, но не обязательным, вариантом выполнения измерений, который, как представляется, получит распространение на практике, является вариант выполнения исследований в ПЛПУ и ЦЛ в один день, т.е. когда $s = j$.

Поскольку под существенно более высокой точностью определения подразумевается, что точность определения значений V_{js} должна не менее, чем в 3 раза, превышать точность однократного определения содержания аналита в биопробах, то отсюда вытекает, что ежедневное число измерений содержания исследуемого аналита в образцах одного и того же КМ на каждой АС должно быть не менее 10 измерений.

Примечание:

- здесь и далее индексы « s » и « j » будут соответствовать дням измерений и могут изменяться от 1 до 20 в предположении, что исследования проводятся в течение 20 дней;

- индекс « i » будет соответствовать исследуемым биопробам и может меняться от 1 до 400 в предположении, что исследования проводятся ежедневно в 20 биопробах в течение 20 дней;

- индекс « k » будет соответствовать исследуемым анализам и может изменяться от 1 до последнего порядкового номера аналита в перечне запланированных для исследования аналитов;

- индекс «m» будет соответствовать принимающим участие в исследовании ПЛПУ и может изменяться от 1 до последнего порядкового номера ПЛПУ в перечне запланированных для испытаний ПЛПУ;

- показатели $(CV_{1a}),\%$ и $(CV_{2a}),\%$ будут обозначать коэффициенты аналитической вариации для измерений содержания аналита в образцах КМ с одним и тем же уровнем аналита соответственно при использовании АС в ПЛПУ и ЦЛ, при этом значения для $(CV_{1a}),\%$ и $(CV_{2a}),\%$ соответственно для уровней нормы и патологий определяют в конце исследований на основе результатов, полученных в течение всего срока испытаний при измерениях содержания каждого аналита в образцах КМ каждого уровня;

- показатель $(CV_1),\%$ будет обозначать коэффициент внутрииндивидуальной биологической вариации для исследуемого аналита.

Перед вычислением текущих значений V_{js} результаты ежедневных повторных измерений содержания аналита в образцах одного и того же КМ должны проверяться на наличие грубых ошибок, для чего может использоваться, например, известный критерий проверки однородности наблюдений, обычно называемый критерием Смирнова [10, см. с. 146 и с. 283].

Значения V_{js} используются для вычислений величины D_{ijs} , которая является количественной характеристикой нестабильности каждой i -той биопробы, исследования которой проводились в течение j -того и s -того дней, и представляет собой изменение содержания аналита в i -той биопробе до и после ее доставки в ЦЛ. Для количественной оценки нестабильности используются относительные (в процентах) значения $D_{ijs},\%$, вычисляемые по формуле:

$$D_{ijs},\% = 100 \times (A_{2is} - A_{1ij} - V_{js}) / A_{1ij} \quad (2)$$

где A_{1ij} – исходное значение аналита в i -ой пробе, измеренное с использованием первой АС в течение j -того дня исследований; A_{2is} - значение аналита в i -ой пробе после ее доставки из ПЛПУ в ЦЛ, измеренное с использованием второй АС в течение s -того дня исследований.

Для случая, когда аналитическая система в ПЛПУ уже не функционирует, в методике предусмотрена возможность использования одной и той же АС, расположенной в ЦЛ. В этом случае:

- либо выполняется имитация условий доставки биопроб в ЦЛ из ПЛПУ (например, путём перевозки биопроб от ЦЛ до пункта, соответствующего «эффективной» середине пути до конкретного ПЛПУ, и обратно), при этом проба пациента исследуется непосредственно после ее взятия, а затем после имитации её доставки в ЦЛ;

- либо создаются условия для сдачи каждым пациентом ПЛПУ биопроб в двух местах (желательно в течение одного или двух дней, но тогда в одно и тоже время суток) – первый раз в ПЛПУ, второй раз - в ЦЛ, при этом первая проба в плановом порядке доставляется из ПЛПУ в ЦЛ и там исследуется, вторая проба исследуется на той же АС непосредственно после её взятия в ЦЛ.

При использовании только одной АС относительное значение величины $D_i, \%$ изменения содержания аналита в пробах i -того пациента, определяется выражением:

$$D_i, \% = 100 \times (A_{2i} - A_{1i}) / A_{1i} \quad (3)$$

где A_{1i} – «исходное» содержание аналита в биопrobe i -того пациента (в биопrobe, сданной в ЦЛ); A_{2i} – содержание аналита в биопrobe i -того пациента, сданной в ПЛПУ, но измеренное после доставки пробы из ПЛПУ в ЦЛ, либо в биопrobe i -того пациента, сданной в ЦЛ, но измеренное после имитации условий ее доставки из ПЛПУ в ЦЛ; полагая, что характеристики АС стабильны, индексы j, s и параметр V_{js} в формулу (3) не включаем.

Результаты измерений аналита в биопробах обязательно проверяются на статистическую значимость их отличий. Это необходимо в связи с тем, что наблюдаемое отличие результатов измерений может быть обусловлено всего лишь аналитической и/или биологической вариациями уровня аналита, а не фактическим их отличием, указывающим на статистически значимые изменения содержания аналита в биопробах, обусловленные их хранением и транспортированием. Алгоритмы проверок на статистическую значимость для случаев наличия или отсутствия АС в ПЛПУ изложены ниже.

1.2.2. Определения величины нестабильности с использованием двух АС

Рассмотрим случай наличия АС в месте исследования биопроб (ЦЛ) и в пункте их взятия (ПЛПУ).

Поскольку АС эксплуатируются в независимых лабораториях, то между результатами измерений, получаемыми с использованием этих АС, будут, как это было указано в предыдущем параграфе, наблюдаться день ото дня флуктуации величины систематического сдвига, даже при реализации в обеих АС одного и того же измерительного метода и ведения для них в полном объеме процедур ВКК. Поэтому так важен учет именно текущих значений систематического сдвига между АС в ПЛПУ и в ЦЛ для вычисления величины нестабильности каждой исследуемой биопробы. Для повышения достоверности результатов определения текущих значений систематического сдвига между АС в ЦЛ и в ПЛПУ в настоящей методике точность ежедневного определения содержания аналита в образцах КМ предусматривается повышенной более чем в 3 раза по сравнению с точностью определения содержания аналита в биопробах.

Для определения текущих значений систематического сдвига между АС в ПЛПУ и в ЦЛ рекомендуется проводить в образцах КМ каждого уровня **ежедневно** в течение всего срока испытаний (а этот срок должен составлять не менее 20 дней) по 10 измерений содержания аналита на каждой из АС, вычислять для каждой АС среднее значение содержания аналита по 10 результатам, после чего определять по формуле (1) текущие значения систематического сдвига отдельно для нормы и одной (при необходимости, двух) патологий.

Примечание: выбор 10 измерений ежедневно обусловлен тем, что коэффициент вариации $CV (N=10)$ при усреднении по 10 результатам в 3,16 раза меньше, чем $CV (N=1)$ для результата однократного измерения.

При выполнении исследований содержания анализа в одних и тех же биопробах в один и тот же день индексы j и s будут совпадать, тогда текущее значение систематического сдвига будет определяться как разница средних значений результатов измерений содержания анализа в образцах КМ в тот день, когда парно исследовались одни и те же биопробы пациентов в ПЛПУ и ЦЛ.

Полученные текущие значения систематического сдвига B_{js} для каждого j -того и s -того дней испытаний, рассчитанные по формуле (1), учитываются далее в расчетах по формуле (2) после проверки на статистическую значимость их отличия от нуля. Для проверки на статистическую значимость отличия результатов измерений или, что тоже самое, отличия от нуля величин B_{js} , используем известную из математической статистики технологию на основе показателей значимого отличия RCV (Reference Change Value), изложенную, например, в [5,11]. Для проверки на статистическую значимость отличия от нуля текущих значений B_{js} эти значения пересчитывают по формуле (6) в относительные (в %) значения, а показатели значимого отличия RCV ($B_{js}, \%$) вычисляют для каждого уровня КМ по формуле:

$$RCV (B_{js}, \%) = Z \times \sqrt{\{[(CV_{1a}), \% / \sqrt{(N_1)_j}]^2 + [(CV_{2a}), \% / \sqrt{(N_2)_s}]^2\}} \quad (4)$$

где $Z=1,65$, $1,96$ или $2,58$ соответственно для 90%, 95% или 99% уровней доверительной вероятности; $(N_1)_j$ и $(N_2)_s$ – число проведенных измерений в течение j -того и соответственно s -того дня исследований содержания анализа в образцах КМ данного уровня соответственно в ПЛПУ и в ЦЛ.

Если выбрать $(N_1)_j = (N_2)_s = 10$, а $Z=1,96$ (уровень доверительной вероятности 95%), тогда формула (4) упростится:

$$RCV (B_{js}, \%) = 0,62 \times \sqrt{\{[(CV_{1a}), \%]^2 + [(CV_{2a}), \%]^2\}} \quad (5)$$

Если окажется, что какое-то относительное текущее значение систематического сдвига $B_{js}, \%$, вычисляемое по формуле:

$$B_{js}, \% = 100 \times [(X_{cp.2})_s - (X_{cp.1})_j] / (X_{cp.1})_j, \quad (6)$$

по своей абсолютной величине превысит показатель $RCV(B_{js}, \%)$, вычисленный по формуле (4) или (5), то такое значение B_{js} будет с 95% вероятностью статистически значимо отличаться от нуля для всех результатов «парных» (то есть в ПЛПУ и в ЦЛ) измерений содержания анализа, и его надо будет учитывать в расчетах соответствующих величин нестабильности. Если текущее значение $B_{js}, \%$ по абсолютной величине не будет превышать величину $RCV(B_{js}, \%)$, то его можно считать пренебрежимо малым, т.е. равным нулю, и не учитывать в расчетах.

После проверки значений B_{js} на статистическую значимость их отличия от нуля проводят по формуле (2) вычисления величин $D_{ijs}, \%$, для которых также требуется проверка на статистическую значимость их отличия от нуля. Для такой проверки используется технология,

ранее изложенная для величин $V_{js},\%$, а соответствующие показатели значимого отличия $RCV(D_{ijs},\%)$ вычисляются отдельно для уровня нормы и уровней патологии по формуле:

$$RCV (D_{ijs}, \%) = Z \times \sqrt{\{(CV_{1a}), \%\}^2 + \{(CV_{2a}), \%\}^2}, \quad (7)$$

где $Z=1,96$, если выбрать 95% уровень доверительной вероятности.

Если при этом окажется, что для каких-то биопроб значения $D_{ijs},\%$ вычисленные по формуле (2), будут по абсолютной величине больше соответствующей величины $RCV(D_{ijs},\%)$, то тогда эти значения $D_{ijs},\%$ будут иметь статистически значимое отличие от нуля, показывая таким образом, что и величины нестабильности содержания исследуемого аналита в соответствующих биопробах будут действительно отличны от нуля. Для биопроб, у которых значения $D_{ijs},\%$ не будут превышать по абсолютной величине соответствующие величины $RCV(D_{ijs},\%)$, следует считать величину нестабильности исследуемого аналита пренебрежимо малой, т.е. равной нулю.

1.2.3. Определение величины нестабильности с использованием одной АС

Рассмотрим ситуацию наличия АС только в ЦЛ.

Сначала рассмотрим случай, когда каждый пациент сдает биопробы в двух местах: первый раз в ПЛПУ, второй - в ЦЛ. Проба пациента, сданная им в ПЛПУ, в реальных условиях хранения и транспортировки доставляется в ЦЛ и там исследуется. Вторая проба, сданная пациентом непосредственно в ЦЛ, исследуется на той же самой АС сразу после взятия. Такой алгоритм, также как и в случае с двумя АС, позволяет оценивать изменения содержания аналитов в биопробах пациентов после их хранения и доставки в ЦЛ относительно их исходных уровней.

При использовании одной АС относительные значения величины $D_i,\%$ изменения содержания аналита в парных пробах каждого i -того пациента, будут вычисляться по нижеприведенной формуле, которая полностью идентична формуле (3):

$$D_i, \% = 100 \times (A_{2i} - A_{1i}) / A_{1i}, \quad (8)$$

где A_{1i} – «исходное» содержание исследуемого аналита в биопробе i -того пациента, то есть в биопробе, сданной непосредственно в ЦЛ; A_{2i} – содержание этого же аналита в биопробе того же пациента, сданной в ПЛПУ, после ее хранения и доставки из ПЛПУ в ЦЛ; оба показателя измеряются с использованием одной АС, характеристики которой полагаем стабильными, поэтому систематические сдвиги между «парными» результатами равны нулю и не учитываются в расчетах $D_i,\%$.

Для проверки на статистическую значимость отличия от нуля величин $D_i,\%$ для данного случая используется технология, ранее изложенная для величин $D_{ijs},\%$ в параграфе 1.2.2., при этом показатели значимого отличия $RCV1 (D_i,\%)$ будут вычисляться по несколько иной формуле, поскольку в данном случае используется единственная АС, а пациент сдает свою пробу дважды, причем в общем случае в разные дни, хотя и приблизительно в одно и то же время суток:

$$RCV1 (D_i, \%) = \sqrt{2} \times Z \times \sqrt{\{(CV_a), \%^2 + [(CV_i), \%^2]\}} . \quad (9)$$

Соответственно для 95% доверительной вероятности $Z=1,96$, тогда:

$$RCV1 (D_i, \%) = \sqrt{2} \times 1,96 \times \sqrt{\{(CV_a), \%^2 + (CV_i), \%^2\}} . \quad (10)$$

Использование в данной формуле $(CV_i), \%$ диктуется тем, что у каждого пациента «парные» пробы в общем случае берутся не в один и тот же момент, а в разные дни, хотя и приблизительно в одно и то же время суток. Значения RCV1 должны рассчитываться как для уровня нормы, так и уровней патологий, если полученные в ходе испытаний рабочие значения $(CV_a), \%$ для уровней нормы и патологий статистически значимо отличаются. Для проверки такого отличия можно использовать критерий Фишера (F-тест) [10, см. с. 131 и с. 278].

Теперь рассмотрим вариант имитации условий доставки биопроб в ЦЛ из каждого ПЛПУ, например, путём перевозки биопроб от ЦЛ до пункта, соответствующего «эффективной» середине пути от ЦЛ до конкретного ПЛПУ, и обратно.

В таком варианте использования одной АС значения величины $D_i, \%$ изменения содержания аналита в «парных» образцах пробы каждого i -того пациента, первый из которых будет исследован сразу же после взятия пробы, а второй – в плановом порядке после имитации условий доставки пробы из ПЛПУ в ЦЛ, будут вычисляться по формуле (3) из параграфа 1.2.1., а именно:

$$D_i, \% = 100 \times (A_{2i} - A_{1i}) / A_{1i} , \quad (11)$$

где A_{1i} – «исходное» содержание данного аналита в биопробе i -того пациента, т.е. в образце биопробы, который был исследован сразу же после взятия пробы в ЦЛ; A_{2i} – содержание аналита в биопробе того же пациента, но уже после того, как она была подвергнута внешним воздействиям в условиях имитации плановой доставки из ПЛПУ в ЦЛ; поскольку оба показателя измеряются с использованием одной той же АС, стабильность аналитических характеристик которой при эксплуатации контролируется процедурами ВКК, систематические сдвиги между «парными» результатами равны нулю и не учитываются в расчетах.

Для проверки на статистическую значимость отличия от нуля величин $D_i, \%$ для данного варианта также используется изложенная выше технология, при этом показатели значимого отличия будут вычисляться по формуле:

$$RCV2 (D_i, \%) = \sqrt{2} \times Z \times \sqrt{\{(CV_a), \%^2\}} = \sqrt{2} \times Z \times (CV_a), \% . \quad (12)$$

Соответственно, для 95% доверительной вероятности:

$$RCV2 (D_i, \%) = \sqrt{2} \times 1,96 \times (CV_a), \% . \quad (13)$$

Необходимости использовать в данной формуле значение (CV_i),% нет, поскольку «парные» образцы биопробы берутся у пациента в один и тот же момент времени.

Если окажется, что какие-то текущие значения Di ,%, вычисленные по формулам (8) или (11), будут по абсолютной величине больше соответствующих показателей $RCV1(Di,%)$ или $RCV2(Di,%)$, тогда эти значения Di ,% будут иметь статистически значимое отличие от нуля, показывая, что и величины нестабильности содержания исследуемого аналита в биопробах будут действительно отличны от нуля. Для биопроб, у которых значения Di ,% не будут превышать по абсолютной величине соответствующие показатели $RCV1(Di,%)$ или $RCV2(Di,%)$, следует считать величину нестабильности аналита пренебрежимо малой, т.е. равной нулю. Как и ранее, значения для показателей $RCV1(Di,%)$ и $RCV2(Di,%)$ должны рассчитываться для уровней нормы и патологий.

1.3. ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ИЗМЕРИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕДУРЫ

1.3.1. Установление или подтверждение рабочих значений характеристик АС

Понятия «аналит», «аналитическая система» (АС) будут использоваться в значениях, определённых ГОСТ 53133.2-2008, а АС лабораторий ПЛПУ и ЦЛ будем называть первой и второй АС соответственно. Эксплуатационные характеристики этих АС для всех методик измерения должны отвечать требованиям ГОСТ Р 53133.2-2008, а их текущая клиническая приемлемость должна подтверждаться ведением ВКК в соответствии с вышеуказанным национальным стандартом и требованиями приказов Минздрава РФ от 01.02.2000 №45 [21] и от 26.05.2003 №220 [22].

Если по каким-то причинам для какой-нибудь АС, использование которой предполагается в исследованиях, процедуры ВКК велись не в полном объеме, то для такой АС обязательно, причем заранее, определяют в установленном порядке (например, по ГОСТ Р 53133.2-2008) рабочие значения ее аналитических характеристик для каждого исследуемого аналита на основе данных, получаемых при проведении установочных серий на образцах КМ одного и того же лота, а именно: систематическое смещение B , стандартное отклонение SD , относительное значение систематического смещения $B, \%$ и коэффициент вариации $CV, \%$. Установочные серии проводят с использованием образцов КМ как с нормальным, так и с патологическим содержанием аналита. Затем запускают и ведут в установленном порядке (например, по ГОСТ Р 53133.2-2008) все процедуры ВКК, включая оперативный контроль с анализом текущих контрольных результатов по принятым контрольным правилам с целью контроля за неизменностью при эксплуатации изначально определенных значений аналитических характеристик.

Во время проведения испытаний в рамках данной методики для всех используемых АС нужно в обязательном порядке продолжать вести все процедуры ВКК, указанные в ГОСТ 53133.2-2008, чтобы иметь регулярное подтверждение того, что изначально (на момент запуска АС в эксплуатацию) определенные значения аналитических характеристик для всех АС остаются статистически неизменными при их эксплуатации и в ПЛПУ, и в ЦЛ. Для запуска вновь технологий

ВКК или для продолжения ведения процедур оперативного контроля организация-испытатель может использовать любые КМ, зарегистрированные в Росздравнадзоре, имеющие остаточный срок годности, гарантирующий неизменность его аналитических характеристик, заявленных изготовителем, в т.ч. соответствие во всех флаконах реального содержания аналитов в КМ указанным в паспорте аттестованным значениям.

Независимо от того, ведутся или нет в полном объеме процедуры ВКК для каждой АС, используемой в испытаниях, для достижения целей исследований необходимо будет в обязательном порядке вновь установить или подтвердить изначальные рабочие значения аналитических характеристик для всех АС. Как ранее упоминалось, в случае использования для оценки величин нестабильности двух АС значения систематических сдвигов между ними должны быть определены для каждого рабочего дня с точностью, по крайней мере, в 3 раза превышающей точность определения содержания аналита в биопробах пациентов.

Для определения с повышенной точностью текущих значений систематического сдвига между используемыми АС рекомендуется проводить в образцах КМ одного и того же лота **ежедневно** по 10 измерений содержания исследуемого аналита на каждой из двух АС в течение всего периода исследований, то есть в течение всех 20 рабочих дней. Это позволит оценивать ежедневные систематические сдвиги в 3,16 раз точнее, чем при однократном измерении в день содержания аналита в образцах КМ. При отсутствии достаточных объёмов КМ, число ежедневных измерений содержания аналита в образцах КМ одного лота можно снизить до 5, при этом оценка ежедневных систематических сдвигов будет только в 2,24 раза точнее, чем при однократном измерении в день.

Такие серии измерений следует провести не только для КМ с нормальным уровнем аналита, но и для КМ с патологическим уровнем (или уровнями). Ежедневные 10 измерений можно проводить как в одной серии, так и накапливать в течение рабочего дня. Если аналитическая серия в течение дня одна, то наиболее оптимально располагать по одному образцу КМ одного и того же лота в начале и в конце серии, а остальные равномерно по длине серии. Полученные в течение дня результаты, после их проверки на отсутствие грубых ошибок, будут использоваться для вычисления ежедневных средних значений содержания аналита в образцах каждого КМ и определения текущих значений систематического сдвига между парными результатами, получаемыми на каждой из двух АС. Кроме того, полученные в течение 20 дней испытаний ежедневные данные по измерениям содержания аналита в КМ будут использованы и для расчета коэффициентов аналитических вариаций для каждой из АС как на уровне нормы, так и на уровне патологии.

При использовании для оценки величин нестабильности одной АС для целей установления текущих рабочих значений ее аналитических характеристик рекомендуется **ежедневно** проводить по 1 измерению содержания исследуемого аналита в образцах КМ для каждого выбранного для исследований уровня в течение всего периода испытаний, т.е. в течение 20 рабочих дней. На базе накопленных за 20 дней данных затем будет рассчитываться рабочее значение коэффициента аналитической вариации согласно требованиям ГОСТ 53133.2-2008.

1.3.2. Определение величин систематических сдвигов между АС

Данная процедура применяется только в случае использования двух АС (в ПЛПУ и в ЦЛ).

Текущие значения систематического сдвига между АС должны быть определены для всех циклов парных исследований содержания аналита в пробах одних и тех же пациентов, причем с точностью, по крайней мере, в 3 раза превышающей точность оценки содержания аналита в биопробах на основе их однократного исследования.

Для определения с такой точностью текущих значений систематического сдвига между АС рекомендуется проводить в образцах КМ одного и того же лота **ежедневно** по 10 измерений содержания исследуемого аналита на каждой из двух АС в течение всего периода испытаний. Таким образом, рекомендуется провести для каждого исследуемого аналита и каждого исследуемого ПЛПУ по 200 измерений в образцах КМ одного и того же лота.

Такие серии измерений необходимо проводить ежедневно для образцов КМ с содержанием аналита двух или трех уровней (для нормы и для одной или двух патологий, если они обе важны для диагностики с использованием этого аналита), поскольку из практики известно, что большинство АС имеют разные величины систематических сдвигов для исследований биопроб с нормальным и патологическим уровнем аналита. Соответственно, и систематические сдвиги между первой и второй АС могут оказаться разными для нормы и патологии, что нужно обязательно учитывать, поскольку биопробы из ПЛПУ могут иметь как нормальные, так и патологические уровни аналитов.

Путём усреднения полученных ежедневно результатов определяют средние значения содержания аналита в образцах КМ для каждой АС и для каждого уровня КМ. Перед вычислением значений ежедневного среднего содержания аналита в образцах КМ $(X_{ср.1})_j$ и $(X_{ср.2})_s$ соответственно для АС в ПЛПУ и в ЦЛ результаты измерений содержания аналита в одном и том же КМ, во избежание искажений при их усреднении, всегда должны проверяться на наличие грубых ошибок, то есть результатов, отклоняющихся за пределы 3 стандартных отклонений от их среднего значения, соответственно от $(X_{ср.1})_j$ и $(X_{ср.2})_s$. Выявлять грубые ошибки среди полученных результатов можно, например, используя известный критерий проверки однородности результатов наблюдений обычно называемый критерием Смирнова [10].

Далее, по полученным значениям $(X_{ср.1})_j$ и $(X_{ср.2})_s$ вычисляют текущие значения B_{js} систематического сдвига между АС, которые соответствуют j -тым и s -тым дням проведения парных измерений в биопробах одних и тех же пациентов, причем отдельно для уровня нормы и одного или двух уровней патологии, используя выражение, аналогичное формуле (1) из параграфа 1.2.1, а именно: $B_{js} = (X_{ср.2})_s - (X_{ср.1})_j$, где $(X_{ср.1})_j$ и $(X_{ср.2})_s$ – средние значения 10 повторных измерений содержания аналита в образцах КМ одного и того же лота, выполненных с использованием соответственно первой (в ПЛПУ) и второй (в ЦЛ) АС в течение соответственно j -того и s -того дней испытаний.

Полученные текущие значения B_{js} систематического сдвига между АС в ЦЛ и ПЛПУ для j -того и s -того дня исследований, которые соответствуют парным измерениям в биопробах одних и тех же пациентов, после проведения проверки на статистическую значимость их отличия от нуля в дальнейшем используются для вычисления отклонений результатов этих парных измерений

содержания аналита в биопробах одних и тех же пациентов сразу после их взятия и после их доставки из ПЛПУ в ЦЛ, отдельно для нормы и для одной или двух патологий.

Все полученные значения V_{js} могут, в общем случае, отличаться от нуля, хотя причиной таких отличий может быть не наличие действительного систематического сдвига между результатами двух АС, а их аналитическая вариация. Поэтому все значения V_{js} , полученные для каждого ПЛПУ, надо проверять на статистическую значимость их отличия от нуля для каждого исследуемого аналита, прежде чем использовать их для расчета величин нестабильности содержания аналита в биопробах. Для проверки на статистическую значимость отличия друг от друга результатов измерений или отличия их разностей от нуля, в т.ч. отличия от нуля величин V_{js} для каждого исследуемого аналита, в данной методике будет использоваться технология на основе показателей значимого отличия RCV, ранее уже описанная в параграфе 1.2.2. Согласно этой технологии показатели RCV ($V_{js},\%$) для проверки на статистическую значимость отличия от нуля величин $V_{js},\%$ для образцов КМ каждого уровня вычисляются по формуле (4), а именно: $RCV(V_{js},\%) = Z \times \sqrt{\{[(CV_{1a}),\% / \sqrt{(N_1)_j}]^2 + [(CV_{2a}),\% / \sqrt{(N_2)_s}]^2\}}$, где показатель $Z=1,96$ или $2,58$ соответственно для 95% или 99% уровня доверительной вероятности, а $(N_1)_j$ и $(N_2)_s$ - количества проведенных повторных измерений содержания аналита в образцах одного того же КМ в течение j -того и s -того дней испытаний соответственно в ПЛПУ и ЦЛ. При этом, если как и ранее положить, что $(N_1)_j = (N_2)_s = 10$, а $Z=1,96$, то тогда формула (4) для вычисления $RCV(V_{js},\%)$ преобразуется, как и ранее, в формулу (5), а именно: $RCV(V_{js},\%) = 0,62 \times \sqrt{\{[(CV_{1a}),\%]^2 + [(CV_{2a}),\%]^2\}}$.

Если окажется, что какое-нибудь текущее значение систематического сдвига $V_{js},\%$ для исследуемого аналита, вычисляемое как и ранее по формуле (6), а именно:

$V_{js},\% = 100 \times [(X_{cp.2})_s - (X_{cp.1})_j] / (X_{cp.1})_j$, будет превышать по абсолютной величине показатель $RCV(V_{js},\%)$, то тогда соответствующее значение V_{js} будет иметь статистически значимое отличие от нуля для всех результатов «парных» (то есть в ПЛПУ и в ЦЛ) измерений аналита в течение j -того и s -того дня испытаний в биопробах одних и тех же пациентов, и его надо будет учитывать в дальнейшем в расчетах текущих величин нестабильности. Если же полученное текущее значение $V_{js},\%$ не будет по абсолютной величине превышать величину $RCV(V_{js},\%)$, то тогда его можно будет считать пренебрежимо малым, т.е. равным нулю, и не учитывать в дальнейших расчетах.

1.4. ПРАКТИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЕЛИЧИН ОТКЛОНЕНИЙ СОДЕРЖАНИЯ АНАЛИТА В БИОПРОБАХ ПОСЛЕ ИХ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

1.4.1. Выполнение измерений содержания аналитов в биопробах

Будем рассматривать два случая для измерений содержания аналитов в биопробах с целью оценки величин их нестабильности: а) с использованием двух АС (в ПЛПУ и в ЦЛ) и б) с использованием единственной АС в ЦЛ.

Эксплуатационные аналитические характеристики используемых АС должны отвечать требованиям ГОСТ Р 53133.2-2008, а их текущая клиническая приемлемость должна подтверждаться ведением статистического ВКК в соответствии с рекомендациями упомянутого

стандарта и требованиями приказов Минздрава РФ [21,22]. Если по каким-либо причинам для какой-нибудь АС, предполагаемой для использования в исследованиях, процедуры ВКК велись не в полном объеме, то для такой АС обязательно, причем заранее, определяют в соответствии с требованиями ГОСТ Р 53133.2-2008 рабочие значения ее аналитических характеристик для исследуемого аналита на основе данных, получаемых при проведении установочной серии на образцах КМ одного и того же лота, а именно: систематическое смещение В, стандартное отклонение SD, относительное значение систематического смещения В,% и коэффициент вариации CV,%. Установочные серии проводят с использованием образцов КМ как с нормальным содержанием аналита, так и с патологическим. Затем запускают и ведут в установленном ГОСТ Р 53133.2-2008 порядке процедуры ВКК, включая оперативный контроль с анализом текущих контрольных результатов по принятым контрольным правилам с целью контроля за неизменностью при эксплуатации изначально определенных значений аналитических характеристик.

Во время проведения исследований в рамках данной методики для всех используемых АС нужно в обязательном порядке продолжать вести все процедуры ВКК, указанные в вышеупомянутом стандарте, чтобы иметь регулярное подтверждение того, что изначально определенные (на момент их запуска в эксплуатацию) значения характеристик для всех АС остаются в пределах допуска неизменными при их эксплуатации и в ПЛПУ, и в ЦЛ. Для случая запуска вновь технологий ВКК по ГОСТ 53133.2 или для продолжения ведения процедур оперативного контроля организация-испытатель может использовать КМ любого изготовителя, зарегистрированные в установленном порядке в Росздравнадзоре и имеющие остаточный срок годности, гарантирующий неизменность его аналитических характеристик, заявленных этим изготовителем, в т.ч. соответствие во всех флаконах реального содержания аналитов в КМ указанным в паспорте аттестованным значениям.

При использовании для исследований **двух АС** алгоритм измерений содержания в образцах КМ и в биопробах конкретного k-того аналита, исследования которого предполагается централизовать, состоит в следующем:

а) в лаборатории каждого m-того ПЛПУ ежедневно или в каждый j-тый день, принятый для исследований аналита в данном ПЛПУ, в течение 20 дней с соблюдением стандартных процедур взятия биопроб, пробоподготовки и условий хранения проводят измерения содержания каждого k-того аналита в 20 биопробах в максимально короткие после их взятия сроки, затем определяют для каждого j-того дня с помощью АС данного m-того ПЛПУ для каждой i-той пробы текущее содержание в ней k-того аналита, получая соответственно результаты $(A_1)_{ijkm}$. Примечание: если перечень предполагаемых для централизации аналитов окажется слишком большим, не позволяющим обеспечить однократным взятием у пациента биопробы проведение всех необходимых исследований, испытания можно проводить в несколько приемов отдельно по каждой выделенной группе аналитов.

б) ежедневно в течение 20 рабочих дней или в сроки, соответствующие плану централизации исследований k-того аналита в биопробах из m-того ПЛПУ, образцы всех биопроб пациентов, взятые и проанализированные в течение j-того дня в m-том ПЛПУ, доставляются в ЦЛ из

каждого m-того ПЛПУ с соблюдением установленных планом централизации правил, сроков и условий хранения и транспортировки проб пациентов;

в) в доставленных в ЦЛ из m-того ПЛПУ биопробах в установленные планом централизации сроки исследуют с соблюдением всех стандартных процедур содержание каждого k-того анализа во всех i-тых биопробах, уже проанализированных в j-тый день испытаний в m-том ПЛПУ, получая в течение s-того дня испытаний для каждой i-той пробы текущее содержание в ней анализа $(A_2)_{iskm}$;

г) на основе полученных парных результатов измерений в каждой i-той биопrobe каждого k-того анализа вычисляют величину нестабильности его содержания в пробах пациентов от момента их взятия в каждом m-том ПЛПУ до момента исследований в ЦЛ, учитывая текущее значение B_{jskm} систематического сдвига между аналитическими системами в ЦЛ и в m-том ПЛПУ, которое имело место для результатов j-того в ПЛПУ и s-того в ЦЛ дня испытаний.

Предварительную количественную оценку величины нестабильности получают с использованием относительных значений $D_{ijskm}, \%$ по формуле:

$$D_{ijskm}, \% = 100 \times [(A_2)_{iskm} - (A_1)_{ijkm} - B_{jskm}] / (A_1)_{ijkm}, \quad (14)$$

которые затем проверяют в обязательном порядке на статистическую значимость их отличия от нуля с использованием показателя значимости отличия, вычисляемого по формуле:

$$RCV(D_{ijskm}, \%) = Z \times \sqrt{[(CV_{1a})_{km}, \%]^2 + [(CV_{2a})_{k}, \%]^2}, \quad (15)$$

или вычисляемого по формуле, если выбирают 95% доверительную вероятность:

$$RCV(D_{ijskm}, \%) = 1,96 \times \sqrt{[(CV_{1a})_{km}, \%]^2 + [(CV_{2a})_{k}, \%]^2}, \quad (16)$$

Где $(CV_{1a})_{km}, \%$ и $(CV_{2a})_{k}, \%$ - коэффициенты аналитической вариации для измерений содержания k-того анализа в биопробах из m-того ПЛПУ соответственно на АС в m-том ПЛПУ и в ЦЛ.

Все значения $D_{ijskm}, \%$ полагают равными нулю, если они не превышают значение показателя $RCV(D_{ijskm}, \%)$. Примечание: следует помнить, что значения $D_{ijskm}, \%$ и соответствующие значения $RCV(D_{ijskm}, \%)$ должны рассчитываться как для уровня нормы, так и уровней патологий, если полученные при проведении испытаний текущие значения B_{jskm} и рабочие значения $(CV_a), \%$ для уровней нормы и патологий статистически значимо отличаются. Для проверки статистически значимого отличия между собой значений $(CV_a), \%$ можно использовать критерий Фишера (F-тест) [10].

Если текущие значения $D_{ijskm}, \%$ в 100% случаев («жесткий» критерий клинической приемлемости) или в не менее 95% случаев («мягкий» критерий клинической приемлемости) всех проб пациентов, проанализированных попарно в ПЛПУ и ЦЛ в течение всего

срока испытаний, **не будут превышать половину относительного значения $GE_k, \%$ общей ошибки определения**, рассчитываемого согласно требованиям ГОСТ Р 53079.4-2008 из суммы биологической и аналитической вариаций для данного k-того анализата по формуле:

$$GE_k, \% = Z \times \sqrt{[(CV_a, \%)_k^2 + (CV_i, \%)_k^2]}, \quad (17)$$

где $(CV_a, \%)_k$ – предельно допустимое значение коэффициента аналитической вариации для определения содержания k-того исследуемого анализата в биопробах, равное половине соответствующего значения $(CV_i, \%)_k$ - значения внутрииндивидуальной биологической вариации для k-того анализата; $Z=1,96$ для случая 95% доверительной вероятности, **то тогда предварительно оцененная величина нестабильности** содержания данного k-того анализата в биопробах от момента их взятия в данном m-том ПЛПУ до начала проведения их исследования в ЦЛ, установленного в качестве крайнего срока проведения исследований в ЦЛ планом централизации, **будет являться статистически незначимо отличающейся от нуля и/или допустимой, что даст основание включить данный исследуемый анализат в план централизации без оговорок согласно положениям статьи 3.5 ГОСТ Р 53079.4-2008.**

Если текущие значения разницы $D_{i,j} k m, \%$ хотя бы в одном случае («жесткий» критерий клинической приемлемости) или в более 5% случаев («мягкий» критерий клинической приемлемости) исследованных в ЦЛ в течение 20 дней проб пациентов из m-того ПЛПУ будут превышать по абсолютной величине половину значения $GE_k, \%$, то тогда предварительно оцененная величина нестабильности содержания k-того анализата в пробах пациентов от момента их взятия в данном ПЛПУ до начала проведения их лабораторного анализа в ЦЛ при установленном плане централизации максимальном времени задержки начала исследования будет являться недопустимой, что не даст основание включить данный k-тый анализат в план централизации исследований биопроб из данного m-того ПЛПУ согласно положениям статьи 3.5 ГОСТ Р 53079.4.

Абсолютно аналогичный критерий клинической приемлемости величин нестабильности будет использоваться и для случая использования одной АС. Отличие для этого случая технологии измерений конкретного k-того анализата в биопробах будет для варианта сдачи пациентами своих биопроб дважды состоять в следующем:

а) каждый пациент ПЛПУ должен будет сдать биопробы в двух местах, причем желательно в одно и то же время суток в течение одного или двух дней – первый раз в своем ПЛПУ, а второй раз - в ЦЛ. Проба пациента, сданная им в ПЛПУ, в запланированных программой централизации условиях доставляется в ЦЛ и там исследуется. Вторая проба, сданная пациентом в ЦЛ, исследуется на той же АС сразу же после ее взятия. Такой алгоритм также будет позволять оценивать количественно величины изменения содержания анализатов в биопробах после их хранения и доставки в ЦЛ относительно их исходных уровней, соответствующих уровням *in vivo*;

б) для данного случая относительные значения показателя $D_{i,j} k m, \%$ изменения содержания k-того анализата в «парных» пробах каждого i-того пациента из m-того ПЛПУ, который будет являться количественной характеристикой нестабильности содержания k-того анализата в

биопробе i -того пациента вследствие ее хранения и транспортирования в ЦЛ из m -того ПЛПУ, будут вычисляться по формуле:

$$D_{ikm},\% = 100 \times (A_{2ikm} - A_{1ikm}) / A_{1ikm}, \quad (18)$$

где A_{1ikm} – «исходное» содержание k -того анализа в биопробе i -того пациента, то есть в биопробе, сданной непосредственно в ЦЛ; A_{2ikm} – содержание k -того анализа в биопробе i -того пациента, которую он сдал в своем m -том ПЛПУ, после ее хранения и доставки из этого ПЛПУ в ЦЛ. Оба показателя измеряются с использованием одной той же АС, поэтому относительные систематические сдвиги между «парными» результатами равны нулю и учитывать их в расчетах значений для показателя $D_{ikm},\%$ нет необходимости;

в) для проверки на статистическую значимость отличия от нуля значений $ikm,\%$ для данного случая используется показатель $RCV(D_{ikm},\%)$, вычисляемый по формуле

$$RCV(D_{ikm},\%) = \sqrt{2} \times Z \sqrt{\{[(CV_2)_{k,\%}]^2 + [(CV_1)_{k,\%}]^2\}} \quad (19)$$

и соответственно для 95% доверительной вероятности при $Z=1,96$, вычисляемый по формуле:

$$RCV(D_{ikm},\%) = \sqrt{2} \times 1,96 \times \sqrt{\{[(CV_2)_{k,\%}]^2 + [(CV_1)_{k,\%}]^2\}}, \quad (20)$$

где $(CV_2)_{k,\%}$ и $(CV_1)_{k,\%}$ – коэффициенты соответственно аналитической и внутрииндивидуальной биологической вариации для k -того анализа. Необходимость использования в данной формуле $(CV_1)_{k,\%}$ следует из-за того, что у каждого пациента «парные» пробы берутся в разные дни, хотя и приблизительно в одно и то же время суток. Значения для $(CV_2)_{k,\%}$ вычисляются на основе контрольных значений, полученных в ходе испытаний при исследовании содержания k -того анализа в КМ с нормальными и патологическими уровнями.

Если при этом окажется, что какие-то текущие значения $D_{ikm},\%$ вычисленные по приведенным выше формулам, будут превышать по абсолютной величине значение $RCV(D_{ikm},\%)$, то тогда все такие значения $D_{ikm},\%$ будут иметь статистически значимое отличие от нуля, показывая, что и величины нестабильности содержания k -того анализа в соответствующих i -тых биопробах из m -того ПЛПУ будут действительно отличны от нуля. Для всех остальных биопроб, для которых значения $D_{ikm},\%$ не будут по абсолютной величине превышать величины $RCV(D_{ikm},\%)$, следует полагать величину нестабильности k -того анализа в них пренебрежимо малой, т.е. равной нулю.

Примечание. Значения $D_{ikm},\%$ и соответствующие значения $RCV(D_{ikm},\%)$ должны рассчитываться для уровней как нормы, так и патологий, если полученные в процессе проведения испытаний рабочие значения $(CV_a)_{k,\%}$, вычисленные для уровней нормы и патологий, статистически значимо отличаются. Для проверки статистически значимого отличия между собой значений $(CV_a)_{k,\%}$ можно использовать критерий Фишера (F-тест) [10].

1.4.2. Оценка статистической значимости отличий результатов измерений

В настоящей методике проверка на статистическую значимость отличия результатов измерений содержания аналита в образцах КМ одного лота или биопробах одного пациента или, что то же самое, проверка на статистическую значимость отличия от нуля их разностей выполняются на основе методов математической статистики и теории вероятностей в предположении, что результаты повторных измерений имеют случайные (хотя и зависящие от эксплуатационных характеристик используемой АС) величины отклонений от ожидаемого (среднего) значения содержания аналита, распределенные нормальным образом.

Степень близости распределения независимых результатов повторных измерений, полученных в одинаковых условиях, характеризуется аналитической вариацией, являющейся количественным показателем прецизионности используемой аналитической системы. Чем лучше прецизионность АС, тем ближе результаты повторных измерений располагаются в целом к ожидаемому значению исследуемой физической величины. Прецизионность любой АС на практике оценивают на базе результатов повторных измерений содержания исследуемого аналита в образцах КМ одного и того же лота в соответствии с рекомендациями международных или национальных стандартов по ведению ВКК.

Чтобы иметь возможность отвечать на вопрос: «Каким образом судить о реальном различии повторных или последовательно полученных результатов теста для одного и того же пациента?», нужно уметь правильно оценивать показатель воспроизводимости разниц этих отдельных результатов между собой, для чего, в свою очередь, надо иметь навыки вычисления полной вариации таких разниц объективным математическим методом. **Существенными** для рассматриваемого вопроса являются следующие общие формулы:

во-первых, если искомая величина вычисляется путем суммирования или вычитания результатов отдельных измерений, то тогда полная дисперсия результатов этой искомой величины есть сумма дисперсий результатов отдельных измерений, то есть, если $C = A + B$ или $C = A - B$, и если результаты измерения A и B имеют аналитические вариации равные SD_A и SD_B соответственно, то тогда полная дисперсия SD_C^2 для искомой величины C будет вычисляться по формуле:

$$SD_C^2 = SD_A^2 + SD_B^2 \quad (21)$$

или, что то же самое,

$$SD_C = (SD_A^2 + SD_B^2)^{1/2} \quad (22)$$

Примечание. Отметим, что результирующее значение стандартного отклонения SD_C численно превышает любое значение из складываемых SD_A и SD_B , но не равно простой арифметической сумме ее компонентов; суммируются только сами дисперсии. Когда все компоненты имеют одно и то же значение для среднего – тогда и только тогда можно подставлять коэффициенты вариации CV вместо стандартных отклонений SD в формулу для SD_C ;

во-вторых, если искомая величина вычисляется умножением или делением результатов отдельных измерений, то тогда полная дисперсия результатов этой искомой величины есть тоже сумма дисперсий результатов отдельных измерений. Но это суммирование должно делаться в терминах коэффициента вариации CV, т.е. если $C = A \times B$ или $C = A / B$, и если результаты измерения A и B имеют коэффициенты аналитической вариации, равные CV_A и CV_B соответственно, то тогда коэффициент полной аналитической вариация CV_C для искомой величины C будет вычисляться по формуле:

$$CV_C^2 = CV_A^2 + CV_B^2 \quad (23)$$

или, что то же самое,

$$CV_C = (CV_A^2 + CV_B^2)^{1/2} . \quad (24)$$

Как уже упоминалось ранее, все результаты измерений содержания аналитов, получаемые в клинической лаборатории, в основном варьируют из-за:

- преаналитической вариации,
- аналитической вариации,
- постаналитической вариации,
- внутрииндивидуальной биологической вариации.

Все эти вариации имеют случайный характер, и можно предполагать, что все они имеют гауссовы (нормальные) распределения. Как известно, дисперсия, а точнее - ширина гауссова распределения, может быть описана в терминах стандартного отклонения SD. На этой стадии, чтобы сохранять рассмотрение вопроса по-возможности простым, будем считать, что преаналитическая и постаналитическая вариации пренебрежимо малы, что является типичным случаем для практики, и проведем дальнейшие оценки без их учета.

Если аналитическую вариацию обозначить SD_A , а внутрииндивидуальную биологическую вариацию обозначить SD_I , то тогда полная вариация SD_T результатов отдельных последовательных измерений содержания аналита в разных биопробах одного и того пациента, которые мы будем далее называть результатами последовательных измерений, в общем случае может быть вычислена следующим образом:

$$SD_T^2 = SD_A^2 + SD_I^2 \quad (25)$$

или, что то же самое,

$$SD_T = (SD_A^2 + SD_I^2)^{1/2} . \quad (26)$$

Если используемый для оценок коэффициент аналитической вариации CV_A , соответствующий дисперсии SD_A^2 , будет близок по величине к коэффициенту

внутрииндивидуальной биологической вариации CV_I , а значения результатов последовательных измерений будут тоже иметь близкие между собой значения, то тогда вычисление полной вариации результатов отдельных последовательных измерений содержания аналита в разных биопробах одного и того пациента можно проводить по формуле:

$$CV_T^2 = CV_A^2 + CV_I^2 \quad (27)$$

или, что то же самое,

$$CV_T = (CV_A^2 + CV_I^2)^{1/2}. \quad (28)$$

Если интересующая нас величина D_i есть разность результатов X_i и X_{i+1} двух последовательных измерений содержания аналита в разных биопробах одного и того же **здорового** пациента, то дисперсия $SD_{D_i}^2$ результатов этой величины будет, согласно формулы (21), равна сумме дисперсий для отдельных результатов этих последовательных измерений, вычисляемых по формуле (25), и, соответственно, коэффициент вариации CV_{D_i} для результатов искомой величины будет, согласно формул (24) и (27), вычисляться следующим образом

$$CV_{D_i}^2 = (CV_A^2 + CV_I^2) + (CV_A^2 + CV_I^2) = 2 \times (CV_A^2 + CV_I^2). \quad (29)$$

Таким образом, вследствие аналитической и внутрииндивидуальной биологической вариаций практически все получаемые значения искомой величины D_i , которая есть разность результатов последовательных измерений содержания аналита в разных биопробах одного и того же **здорового** пациента, будут симметрично отклоняться от своего ожидаемого среднего равного нулю значения, но эти отклонения по абсолютной величине не будут превышать величину:

$$Z_{RCV} \times CV_{D_i} = Z_{RCV} \times \sqrt{2} \times [(CV_A^2 + CV_I^2)]^{1/2}, \quad (30)$$

где Z_{RCV} – показатель, зависящий от уровня доверительной вероятности и рассмотрения только одной или обеих сторон распределения результатов. Для двустороннего распределения $Z=1,96$ при уровне доверительной вероятности 95%; CV_A – эксплуатационное значение коэффициента аналитической вариации для используемой АС, а CV_I – коэффициент внутрииндивидуальной биологической вариации для данного аналита.

Отсюда следует, что любые два последовательно полученных результата X_i и X_{i+1} измерения содержания аналита в разных биопробах одного и того же **больного** пациента будут статистически значимо отличаться друг от друга только в том случае, если их относительная (в %) разница $\Delta (X_i, X_{i+1}) = 100 \times (X_i - X_{i+1})/X_i$ превысит по абсолютной величине так называемый показатель значимого отличия RCV_{AI} (Reference Change Value):

$$RCV_{AI} = \sqrt{2} \times Z_{RCV} \times [(CV_A^2 + CV_I^2)]^{1/2}. \quad (31)$$

Примечание. Показатель значимого отличия RCV (Reference Change Value) представляет собой наименьшую величину разницы между результатами последовательных измерений содержания анализа в образцах биопроб одного и того же пациента, превышение которой указывает на уже статистически значимое различие между ними. Конкретные значения показателя RCV рассчитываются на основе комбинации вариаций каждого из двух сравниваемых результатов, внутренне ему присущих. Перечень составляющих полной вариации каждого результата, внутренне ему присущих, в общем случае включает в себя преаналитическую, аналитическую, постаналитическую и внутрииндивидуальную биологическую вариацию.

Соответственно два результата повторных измерений содержания анализа в одной и той же биопробе пациента или в образцах КМ одного и того же лота будут статистически значимо отличаться друг от друга только в том случае, если их относительная (в %) разница превысит по абсолютной величине показатель RCV_A:

$$RCV_A = \sqrt{2} \times Z_{RCV} \times CV_A \quad (32)$$

Пример. Для измерений содержания глюкозы в сыворотке будем иметь при CV_A=3% и CV_I=6,5% соответственно для RCV_{A1}=19,8% и для RCV_A=8,3%. Т.е. два результата последовательных измерений содержания глюкозы в разных пробах одного и того же пациента, равные 6 ммоль/л и 5 ммоль/л, а также 6 ммоль/л и 7 ммоль/л нельзя считать статистически значимо отличающимися, поскольку их относительная в % разница составляет 16,7%, что не превышает значения RCV_{A1}. Соответственно, нельзя считать статистически значимо отличающимися два результата повторных измерений содержания глюкозы в одной и той же биопробе или в одном и том же образце КМ, равные 6 ммоль/л и 5,5 ммоль/л, а также 6 ммоль/л и 6,5 ммоль/л, поскольку их относительная в % разница составляет 8,3%, что не превышает значения RCV_A.

В то же самое время два результата последовательных измерений содержания глюкозы в разных пробах одного и того же пациента при том же значении CV_A=3% можно считать статистически значимо различными, если они различаются на 20% - например, 6 ммоль/л и 7,2 ммоль/л, или 6 ммоль/л и 4,8 ммоль/л, поскольку их относительная разница превышает RCV_{A1}. Соответственно, два результата повторных измерений содержания глюкозы в одной и той же пробе одного и того же пациента или в одном и том же образце КМ можно считать статистически значимо различными, если они различаются на 10%, например 6 ммоль/л и 6,6 ммоль/л, 6 ммоль/л и 5,4 ммоль/л, поскольку их относительная в % разница превышает значение RCV_A.

В заключение параграфа отметим, что если два результата измерений содержания анализа в образцах одной и той же биопробы или в образцах КМ одного и того же лота были получены с использованием двух разных АС (например, когда одна АС находится в плановой лаборатории, а другая АС - в экспресс-лаборатории одного и того же ЛПУ), то эти результаты будут статистически значимо отличаться друг от друга только в том случае, если их

относительная выраженная в процентах разница превысит по абсолютной величине показатель значимости отличия $RCV_{A1/A2}$, вычисляемый по формуле:

$$RCV_{A1/A2} = Z_{RCV} \times \sqrt{[(CV_1, \%)^2 + (CV_2, \%)^2]}, \quad (33)$$

где $CV_1, \%$ и $CV_2, \%$ - значения коэффициентов аналитической вариации для результатов, получаемых соответственно на первой и на второй АС.

1.4.3. Вычисление ожидаемых величин нестабильности в результате хранения и/или транспортировки биопроб

В настоящей методике величина нестабильности содержания аналита в биопробах вследствие их хранения и/или транспортирования определяется как разница между результатом измерения исходного содержания аналита в биопrobe пациента, то есть сразу же после ее взятия, и результатом измерения его содержания в биопrobe после её доставки в ЦЛ. Технологии вычисления ожидаемых величин нестабильности исследуемого аналита в биопробах для случаев использования в исследованиях двух АС или только одной АС отличаются только тем, что в первом случае учитываются текущие значения систематического сдвига между АС в ПЛПУ и в ЦЛ (только тогда, когда сдвиг статистически значимо отличается от нуля).

В случае использования двух АС для каждого исследуемого ПЛПУ сначала вычисляют относительные (в процентах) значения $D_{ijsk, \%}$ величины нестабильности k-того аналита в i-ой биопrobe, «парные» (в ПЛПУ и в ЦЛ) исследования которой проводились соответственно в j-тый и s-тый день исследований, по формуле:

$$D_{ijsk, \%} = 100 \times (A_{2isk} - A_{1ijk} - B_{jsk}) / A_{1ijk}, \quad (34)$$

где A_{1ijk} – исходное значение k-того аналита в i-ой пробе, измеренное с использованием первой АС (в ПЛПУ) в j-тый день исследований, A_{2isk} - значение k-того аналита в i-ой пробе после ее доставки из ПЛПУ в ЦЛ (то есть после воздействия внешних факторов), измеренное с использованием второй АС (в ЦЛ) в s-тый день исследований, B_{jsk} - текущие значения систематического сдвига между первой и второй АС для k-того аналита соответственно в j-тый и s-тый день исследований, уже проверенные на статистическую значимость их отличия от нуля согласно рекомендациям параграфа 1.3.2.

При использовании значений B_{jsk} для вычислений величин $D_{ijsk, \%}$ по формуле (34) следует иметь ввиду, что если i-тая проба, парно исследуемая в ПЛПУ и ЦЛ соответственно в j-тый и s-тый день испытаний, принадлежит условно здоровому по данному k-тому аналиту пациенту, то есть когда содержание k-того аналита в биопrobe находится в пределах нормального диапазона или близко к его границам, то для такого случая используют в вычислениях то текущее значение B_{jsk} систематического сдвига между аналитическими системами ЦЛ и ПЛПУ, которое определено на основе результатов измерений образцов КМ с нормальным уровнем k-того аналита. В случае же вычисления значения $D_{ijsk, \%}$ для биопробы с содержанием k-того аналита на уровне верхней

или нижней патологии, необходимо использовать в формуле значение V_{jks} , определенное на основе результатов измерений образцов КМ с уровнем k -того анализа, соответствующим верхней или нижней патологии.

Следует также иметь в виду, что если «парные» измерения содержания k -того анализа в одной и той же биопrobe будут проведены в разные дни, то тогда текущее значение систематического сдвига для вычислений соответствующих значений $D_{ijks},\%$ следует определять как разницу средних значений результатов измерения содержания k -того анализа в образцах КМ соответствующего уровня именно в те дни, когда одна и та же биопроба исследовалась соответственно в ПЛПУ и ЦЛ.

Все вычисленные по формуле (34) значения $D_{ijks},\%$ должны быть проверены на статистическую значимость их отличия от нуля. В качестве критерия проверки используется показатель значимого отличия $RCV3(D_{ijks},\%)$, определяемый по формуле:

$$RCV3(D_{ijks},\%) = Z \times \sqrt{\{(CV_{1a})_{k,\%}\}^2 + \{(CV_{2a})_{k,\%}\}^2}, \quad (35)$$

где $Z=1.96$ для 95% уровня доверительной вероятности; $(CV_{1a})_{k,\%}$ и $(CV_{2a})_{k,\%}$ - вычисленные на основе контрольных результатов, полученных в процессе испытаний, рабочие значения коэффициентов аналитической вариации для измерений содержания k -того анализа в образцах биопроб или с нормальным, или с патологическим уровнем анализа соответственно при использовании АС в ПЛПУ и в ЦЛ.

Если окажется, что какие-то текущие значения $D_{ijks},\%$, вычисленные по формуле (34), будут по абсолютной величине больше величины $RCV3(D_{ijks},\%)$, то тогда все такие значения $D_{ijks},\%$ будут иметь статистически значимое отличие от нуля, показывая таким образом, что величины нестабильности содержания k -того анализа в соответствующих биопробах будут действительно отличны от нуля. Для всех остальных биопроб, для которых значения $D_{ijks},\%$ не будут по абсолютной величине превышать величины $RCV3(D_{ijks},\%)$, следует считать величину нестабильности k -того анализа пренебрежимо малой, т.е. равной нулю.

Примечание. Следует помнить, что значения $D_{ijks},\%$ и соответствующие значения $RCV3(D_{ijks},\%)$ должны рассчитываться как для уровня нормы, так и для уровней патологий, если полученные в процессе проведения испытаний рабочие значения показателей $(CV_{1a})_{k,\%}$ и $(CV_{2a})_{k,\%}$, вычисленные соответственно для уровней нормы и патологий, статистически значимо отличаются друг от друга для каждой АС. Для проверки статистически значимого отличия между собой значений $(CV_{1a})_{k,\%}$, вычисленных для уровня нормы и патологии, и значений $(CV_{2a})_{k,\%}$, вычисленных для уровня нормы и патологии, можно использовать критерий Фишера (F-тест) [10].

В случае использования одной АС, либо имитируют условия доставки биопроб из ПЛПУ в ЦЛ, либо каждый участвующий в испытаниях пациент ПЛПУ должен будет сдать свои биопробы дважды – сначала в своем ПЛПУ, а затем в ЦЛ. Во втором варианте проба пациента, сданная им в ПЛПУ, в запланированных условиях доставляется в ЦЛ и там после ее доставки исследуется. Вторая проба, сданная пациентом непосредственно в ЦЛ, исследуется на той же самой АС сразу же после ее взятия. Такой алгоритм также позволяет оценивать количественно величины

изменения содержания аналитов в биопробах после их хранения и доставки в ЦЛ относительно их исходных уровней, которые они имели *in vivo*.

Для случая с одной АС относительные значения $D_{ijk},\%$ изменения содержания k -того аналита в «парных» пробах i -того пациента, которые будут являться количественной характеристикой нестабильности содержания k -того аналита в биопробе i -того пациента, доставленной в ЦЛ, относительно исходного уровня аналита в биопробе i -того же пациента, сданной в ПЛПУ в течение j -того дня испытаний, будут вычисляться по формуле:

$$D_{ijk},\% = 100 \times (A_{2ijk} - A_{1ijk}) / A_{1ijk}, \quad (36)$$

где A_{1ijk} – «исходное» содержание k -того аналита в биопробе i -того пациента, сданной в ЦЛ в течение j -того дня испытаний; A_{2ijk} – содержание k -того аналита в биопробе i -того пациента, сданной в ПЛПУ в течение j -того дня испытаний, после ее доставки из ПЛПУ в ЦЛ. Оба показателя измеряются с использованием одной той же АС, поэтому относительные систематические сдвиги между «парными» результатами равны нулю и учитывать их в расчетах значений $D_{ijk},\%$ нет необходимости.

Примечание. Поскольку в данном случае для испытаний используется только одна АС, индекс j для установления однозначности значений $D_{ijk},\%$ можно не использовать. Для этой цели достаточно использования индексов i и k , если индекс i , как и ранее, будет меняться от 1 до 200.

В качестве критерия проверки на статистическую значимость отличия от нуля значений $D_{ijk},\%$ для данного случая используется показатель значимого отличия $RCV4(D_{ijk},\%)$, вычисляемый по формуле:

$$RCV4 (D_{ijk},\%) = \sqrt{2} \times Z \times \sqrt{\{[(CV_a)_{k,\%}]^2 + [(CV_i)_{k,\%}]^2\}}, \quad (37)$$

где $Z=1,96$ для 95% уровня доверительной вероятности; $(CV_a)_{k,\%}$ и $(CV_i)_{k,\%}$ – коэффициенты соответственно аналитической и внутрииндивидуальной биологической вариации для k -того аналита. Необходимость использования в данной формуле $(CV_i)_{k,\%}$ следует из-за того, что у каждого пациента «парные» пробы берутся не в один и тот же момент времени, но в разные дни, хотя и приблизительно в одно и тоже время суток.

Если при этом окажется, что какие-то текущие значения $D_{ijk},\%$ вычисленные по формуле (36), будут по абсолютной величине больше соответствующей величины $RCV4(D_{ijk},\%)$, вычисленной по формуле (37), то тогда все такие значения $D_{ijk},\%$ будут иметь статистически значимое отличие от нуля, показывая, что и величины нестабильности содержания k -того аналита в соответствующих «парных» биопробах будут действительно отличны от нуля. Для всех остальных биопроб, для которых значения $D_{ijk},\%$ не будут превышать по абсолютной величине $RCV4(D_{ijk},\%)$, следует полагать величину нестабильности k -того аналита пренебрежимо малой, т.е. равной нулю.

Для варианта использования одной АС с имитацией условий доставки биопроб в ЦЛ из каждого ПЛПУ (например, путём перевозки биопроб от ЦЛ до пункта, соответствующего середине

пути до конкретного ПЛПУ, и обратно), относительные значения величины $D_{ik},\%$ изменения содержания k-того анализатора в «парных» образцах пробы каждого i-того пациента, первый из которых исследуется сразу же после взятия пробы, а второй – в плановом порядке после имитации условий ее доставки из ПЛПУ в ЦЛ, будут также вычисляться в соответствии с формулой (3) из параграфа 1.2.1., а именно:

$$D_{ik},\% = 100 \times (A_{2ik} - A_{1ik}) / A_{1ik}, \quad (38)$$

где A_{1ik} – «исходное» содержание k-того анализатора в биопробе i-того пациента, то есть в биопробе, которая была исследована сразу же после ее сдачи в ЦЛ; A_{2ik} – содержание k-того анализатора в биопробе i-того пациента, но уже после того как она была подвержена внешним воздействиям в условиях имитации ее плановой доставки из ПЛПУ в ЦЛ.

Для проверки на статистическую значимость отличия от нуля величин $D_{ik},\%$ в данном варианте используется та же технология, которая была изложена выше для величин $D_{ijk},\%$, при этом показатели значимого отличия будут вычисляться по формуле:

$$RCV5(D_{ik},\%) = \sqrt{2} \times Z \times \sqrt{[(CV_a)_{k,\%}]^2} = \sqrt{2} \times Z \times (CV_a)_{k,\%} \quad (39)$$

и соответственно при $Z=1,96$ для 95% доверительной вероятности

$$RCV5(D_{ik},\%) = \sqrt{2} \times 1,96 \times (CV_a)_{k,\%}, \quad (40)$$

где $(CV_a)_{k,\%}$ – рабочее значение коэффициента аналитической вариации для k-того анализатора. Необходимости использования в данной формуле $(CV_1)_{k,\%}$ нет, поскольку у каждого пациента «парные» пробы берутся в одно и то же время.

Если при этом окажется, что какие-то текущие значения $D_{ik},\%$, вычисленные по формуле (38), будут по абсолютной величине больше величины $RCV5(D_{ik},\%)$, вычисленной по формуле (40), то тогда все эти значения $D_{ik},\%$ будут иметь статистически значимое отличие от нуля, показывая, что и величины нестабильности содержания k-того анализатора в соответствующих биопробах будут действительно отличны от нуля. Для всех остальных биопроб, для которых значения $D_{ik},\%$ не будут превышать по абсолютной величине величины $RCV5(D_{ik},\%)$, следует полагать величину нестабильности k-того анализатора пренебрежимо малой, т.е. равной нулю.

1.5. ОЦЕНКА КЛИНИЧЕСКОЙ ПРИЕМЛЕМОСТИ ВЕЛИЧИН НЕСТАБИЛЬНОСТИ БИОПРОБ

1.5.1. Определение предельно допустимых значений нестабильности биопроб

Опишем алгоритм расчёта предельно допустимых значений величин нестабильности анализаторов на основе данных по аналитической вариации (по рабочим значениям CV при эксплуатации используемых АС, полученным в ходе испытаний), и справочных данных по внутрииндивидуальной вариации.

Предельно допустимые значения для нестабильности определены в ГОСТ Р 53079.4-2008 следующим образом: «...максимально допускаемая нестабильность, выраженная в процентном отклонении от исходного уровня результата исследования биопробы после ее хранения, не должна превышать половины размера общей ошибки определения, рассчитываемой из суммы биологической и аналитической вариаций для данного аналита».

В руководстве Германского общества по Клинической химии [6] изложены требования к качеству диагностируемых биопроб, при этом требование к максимально допустимой величине нестабильности изложено следующим образом: «**The maximum permissible instability** is the deviation of a result that corresponds to the maximum permissible relative imprecision of the measurement. This was defined as 1/12th of the biological reference interval. The deviation should be smaller than half of the total error derived from the sum of biological and technical variability».

Из обоих документов следует, что максимально допускаемая (в её относительном выражении) общая ошибка $GE_k, \%$ определения содержания k -того аналита в биопробах, рассчитываемая из суммы биологической и аналитической вариации для k -того аналита, должна вычисляться по формуле:

$$GE_k, \% = Z \times \sqrt{\{(CV_a, \%)_k\}^2 + \{(CV_i, \%)_k\}^2}, \quad (41)$$

где $(CV_a, \%)_k$ – предельно допускаемое значение коэффициента аналитической вариации при определении содержания k -того аналита; $(CV_i, \%)_k$ – значение внутрииндивидуальной биологической вариации для k -того аналита, $Z=1,96$ для случая 95% доверительной вероятности.

Примечание. Общая ошибка $GE_k, \%$ не имеет ничего общего с предельно допускаемой полной аналитической ошибкой TE_k результата измерения содержания k -того аналита в биопробах, которая вычисляется по формуле:

$$TE_k, \% = (B_a, \%)_k + Z \times (CV_a, \%)_k,$$

где $(CV_a, \%)_k$ и $(B_a, \%)_k$ – предельно допускаемые относительные значения соответственно коэффициента вариации и систематического сдвига для k -того аналита, $Z=1,65$ для 95% доверительной вероятности, поскольку в данном случае доверительный интервал является односторонним.

Соответственно предельно допускаемые значения $(Dmax)_k, \%$ для величины нестабильности k -того аналита в биопробах будут вычисляться по формуле:

$$(Dmax)_k, \% = 0,5 \times GE_k, \% = 0,5 \times Z \times \sqrt{\{(CV_a, \%)_k\}^2 + \{(CV_i, \%)_k\}^2}. \quad (42)$$

Примеры вычисления значений $(Dmax)_k, \%$. В настоящее время в мировой практике применяется следующее требование к коэффициенту аналитической вариации: рабочие значения этого показателя для любой АС, допущенной к эксплуатации в лаборатории, не должны превышать половины внутрииндивидуальной биологической вариации исследуемого аналита.

Отсюда следует, что, например, для **концентрации глюкозы в сыворотке**, для которой внутрииндивидуальная биологическая вариация $CV_1 = 5,6\%$ [7], предельно допустимое значение аналитической вариации будет равно $2,8\%$ [7], а предельно допустимое значение величины нестабильности для глюкозы в сыворотке $D_{max},\%$ (при $Z=1,96$) составит **6,14%**.

Для **концентрации альбумина в сыворотке** внутрииндивидуальная биологическая вариация $CV_1 = 3,2\%$ [7], предельно допустимое значение аналитической вариации будет равно $1,6\%$ [7], а предельно допустимое значение величины нестабильности для альбумина в сыворотке $D_{max},\%$ (при $Z=1,96$) составит **3,51%**.

Для **концентрации креатинина в сыворотке** внутрииндивидуальная биологическая вариация $CV_1 = 5,95\%$ [7], предельно допустимое значение аналитической вариации будет равно $2,98\%$ [7], а предельно допустимое значение величины нестабильности для креатинина в сыворотке $D_{max},\%$ (при $Z=1,96$) составит **6,52%**.

Для **активности АЛТ в сыворотке** внутрииндивидуальная биологическая вариация $CV_1=19,4\%$ [7], предельно допустимое значение аналитической вариации будет равно $9,7\%$ [7], а предельно допустимое значение величины нестабильности для активности АЛТ в сыворотке $D_{max},\%$ (при $Z=1,96$) составит **21,26%**.

1.5.2. Установление клинической приемлемости отклонений лабораторных результатов от исходного содержания аналита в биопробах после их хранения и/или транспортирования

Опишем алгоритм оценки клинической приемлемости величин нестабильности аналитов в биопробах, взятых в конкретном ПЛПУ, вследствие их хранения и/или транспортирования в ЦЛ, и критерии принятия решения о возможности централизации исследований аналитов в биопробах, доставляемых в ЦЛ из того или иного ПЛПУ.

Решение о возможности централизации исследований конкретного аналита в биопробах, доставляемых в ЦЛ из конкретного ПЛПУ, принимается на основе сравнения рабочих значений величин нестабильности содержания этого аналита, полученных в ходе проведения испытаний биопроб из данного ПЛПУ, с их предельно допустимыми значениями. Перед сравнением все рабочие значения D_{ijsk} , вычисленные по формуле (34), или значения $D_{ijk},\%$, вычисленные по формуле (36), или значения $D_{ik},\%$, вычисленные по формуле (38), соответственно для случая проведения испытаний с использованием двух или одной АС, обязательно проверяют на статистическую значимость их отличия от нуля.

Любое полученное в ходе испытаний рабочее значение $D_{ijsk},\%$ (соответственно $D_{ijk},\%$ или $D_{ik},\%$), характеризующее величину нестабильности содержания k -того аналита в i -ой биопробе, исследования которой были проведены в течение j -того дня испытаний, будет считаться клинически приемлемым, если оно не будет по абсолютной величине превышать значения $(D_{max})_k,\%$, равного половине соответствующего значения $GE_k,\%$, рассчитываемого по формуле (41) при $Z=1,96$:

$$(D_{\max})_{k, \%} = 0,5 \times 1,96 \times \sqrt{\{[(CV_{a, \%})_k]^2 + [(CV_{i, \%})_k]^2\}} = 0,98 \times \sqrt{\{[(CV_{a, \%})_k]^2 + [(CV_{i, \%})_k]^2\}}, \quad (43)$$

где $(CV_{a, \%})_k$ – предельно допустимое значение коэффициента аналитической вариации при определении содержания k-того аналита; $(CV_{i, \%})_k$ – значение внутрииндивидуальной биологической вариации для k-того аналита.

При принятии решения о возможности централизации исследований конкретного аналита в биопробах, доставляемых в ЦЛ из конкретного ПЛПУ, возможно использование двух критериев – «жесткого» и «мягкого».

«Жесткий» критерий: если среди всех рабочих значений $D_{ijskm, \%}$ величин нестабильности k-того аналита в биопробах m-того ПЛПУ хотя бы одно значение $D_{ijskm, \%}$, полученное в течение всего срока испытаний, будет по абсолютной величине превышать половину значения $GE_{k, \%}$, рассчитываемого по формуле (41) или формуле (42), то предварительно оцененная величина нестабильности k-того аналита в биопробах данного ПЛПУ вследствие их доставки в ЦЛ в установленных планом централизации условиях хранения и транспортирования будет считаться клинически неприемлемой, что не даст основание включить данный k-тый аналит в план централизации исследований биопроб из данного m-того ПЛПУ согласно положениям статьи 3.5 ГОСТ Р 53079.4 -2008. Если же ни одно из всех рабочих значений $D_{ijskm, \%}$, полученных за время испытаний, не превысит по абсолютной величине половину значения $GE_{k, \%}$, то тогда предварительно оцененная величина нестабильности k-того аналита в биопробах из данного ПЛПУ вследствие их доставки в ЦЛ в установленных планом централизации условиях хранения и транспортирования будет считаться клинически приемлемой, что даст основание включить данный аналит в план централизации согласно положениям статьи 3.5 ГОСТ Р 53079.4-2008.

«Мягкий» критерий: если среди всех рабочих значений $D_{ijskm, \%}$ величин нестабильности k-того аналита в биопробах m-того ПЛПУ более 5% значений $D_{ijk, \%}$, полученных за время испытаний, будут по абсолютной величине превышать половину значения $GE_{k, \%}$, рассчитываемого по формуле (41) или формуле (42), то предварительно оцененная величина нестабильности k-того аналита в биопробах пациентов данного ПЛПУ вследствие их доставки в ЦЛ в установленных планом централизации условиях хранения и транспортирования будет считаться клинически неприемлемой, что не даст основания включить данный k-тый аналит в план централизации исследований биопроб из данного m-того ПЛПУ согласно положениям статьи 3.5 ГОСТ Р 53079.4. Если же среди всех рабочих значений $D_{ijskm, \%}$ величин нестабильности k-того аналита в биопробах m-того ПЛПУ не более 5% значений $D_{ijskm, \%}$, полученных в течение всего срока испытаний, будут по абсолютной величине превышать половину значения $GE_{k, \%}$, то тогда предварительно оцененная величина нестабильности k-того аналита в биопробах из данного ПЛПУ вследствие их доставки в ЦЛ в установленных планом централизации условиях хранения и транспортирования будет считаться клинически приемлемой, что даст основание включить данный k-тый аналит в план централизации исследований биопроб из данного m-того ПЛПУ согласно положениям статьи 3.5 ГОСТ Р 53079.4-2008.

Примечание. ГОСТ Р 53079.4-2008 определяет в качестве предельного срока хранения и транспортирования биопроб при заданных температурных условиях такой срок, при котором для

95% биопроб величины их нестабильности не превышают предельно допустимого значения, вычисляемого по формуле (42). Следуя этому подходу и предполагая, что все значения $D_{ijsk},\%$, вычисляемые по формулам (34) или (36) или (38), являются случайными величинами одной генеральной совокупности, можно проводить оценку клинической приемлемости ожидаемой величины нестабильности на базе среднего $D_{cp},\%$ всех значений $D_{ijsk},\%$, полученных для конкретного m -того ПЛПУ. Тогда ожидаемая величина нестабильности содержания k -того анализа в биопробах из m -того ПЛПУ будет считаться клинически приемлемой, если:

$$D_{cp},\% + 1,65 \times CV_{D_{ijsk},\%} < (D_{max})_k,\% , \quad (44)$$

где $(D_{max})_k,\%$ рассчитывается по формуле (43); $CV_{D_{ijsk},\%}$ – коэффициент вариации для всей совокупности значений $D_{ijsk},\%$; множитель при $CV_{D_{ijsk},\%}$ берется равным 1,65, поскольку распределение значений $D_{ijsk},\%$ является односторонним.

При данном подходе допускается, что для 5% биопроб пациентов значения $D_{ijsk},\%$ могут превышать предельно допустимое значение $(D_{max})_k,\%$. Этот подход может быть одним из вариантов «мягкого» критерия принятия решения о возможности централизации исследований по конкретному k -тому анализу для биопроб из конкретного m -того ПЛПУ.

РАЗДЕЛ 2. ОПЕРАТИВНЫЙ КОНТРОЛЬ КЛИНИЧЕСКОЙ ПРИЕМЛЕМОСТИ ВЕЛИЧИН НЕСТАБИЛЬНОСТИ БИОПРОБ

2.1. ОПЕРАТИВНЫЙ КОНТРОЛЬ ЗА СОХРАНЕНИЕМ В ДОПУСТИМЫХ ПРЕДЕЛАХ ТЕКУЩЕЙ НЕСТАБИЛЬНОСТИ БИОПРОБ, ДОСТАВЛЯЕМЫХ В ЦЛ

Оперативный контроль за сохранением в допустимых пределах текущей величины нестабильности биопроб, регулярно доставляемых в ЦЛ из конкретного ПЛПУ, необходим для выявления нарушений в проведении процедур преаналитического этапа, связанных или с взятием проб пациентов, или с их хранением, или с их доставкой в ЦЛ. Уровень нестабильности любого анализа в биопробах, поступающих изо дня в день из ПЛПУ в ЦЛ, со временем может меняться в результате неконтролируемых флуктуаций в процессах взятия биопроб, их пробоподготовки, хранения и транспортирования. Такие флуктуации могут приводить к выходу за максимально допустимые пределы величин нестабильности содержания анализов в биопробах. Поэтому сразу же после того, как исследования будут централизованы, в ЦЛ необходимо вести оперативный контроль за сохранением в допустимых пределах определённой типовой величины нестабильности каждого анализа в биопробах, поступающих из конкретного ПЛПУ, причём этот контроль должен вестись в условиях, когда исследования биопроб в ПЛПУ уже невозможны.

2.1.1. Основные принципы ведения оперативного контроля для выявления значимых изменений величин нестабильности

После проведения испытаний, установления для аналита клинической приемлемости типовой величины нестабильности и принятия решения о централизации его исследований, в ЦЛ, помимо статистического оперативного контроля по КМ, одновременно начинают вести статистический оперативный контроль по ежедневным средним по результатам пациентов для каждого конкретного ПЛПУ. Текущие данные контроля по «ежедневным средним» по пациентам каждого ПЛПУ и текущие данные контроля по КМ используются для оценки степени неизменности изначально определённого уровня нестабильности для биопроб, доставленных в ЦЛ из конкретного ПЛПУ. При этом параметры контрольных карт для ведения контроля по ежедневным средним определяют по результатам исследований биопроб пациентов, накопленным за всё время проведения испытаний по установлению клинической приемлемости типового уровня нестабильности. При сравнении текущих результатов контроля по КМ и по «ежедневным средним» могут иметь место следующие исходы:

1) если АС в ЦЛ будет находиться под контролем и по данным ежедневных средних результатов пациентов, и по данным результатов анализа КМ, то это будет свидетельствовать об эксплуатационной стабильности аналитических характеристик и неизменности изначально определённой типовой величины нестабильности. Соответственно весь измерительный процесс, включая аналитические измерения и преаналитические процедуры, связанные с централизацией, будет оставаться под контролем, обеспечивая клиническую приемлемость текущих результатов определения содержания данного аналита в биопробах, доставленных из ПЛПУ и происследованных в ЦЛ в течение текущего дня;

2) если выход из-под контроля проявится только для текущих ежедневных средних по пациентам из данного ПЛПУ, то это будет свидетельствовать об изменении изначально определённого уровня нестабильности содержания данного аналита в биопробах из этого ПЛПУ. В этом случае результаты измерений аналита в биопробах, доставленных из данного ПЛПУ и происследованных в ЦЛ в течение текущего дня, не подлежат выдаче в клинику, а взятие проб пациентов в ПЛПУ и их доставку в ЦЛ следует повторить;

3) если выход из-под контроля проявится и для текущих ежедневных средних по пациентам, и для текущих результатов по КМ, то в большинстве случаев это будет свидетельством изменения эксплуатационных значений характеристик АС в ЦЛ. В этом случае все текущие результаты измерений содержания аналита во всех биопробах, происследованных в течение текущего дня, в том числе полученных из данного ПЛПУ, не подлежат выдаче в клинику до выявления причины срабатывания контрольных правил. После выявления и устранения причины выхода АС из под контроля, анализ текущих проб, в том числе полученных из данного ПЛПУ, следует повторить;

4) если выход из-под контроля проявится только для текущих результатов по КМ (что маловероятно, хотя и возможно на стадии накопления данных по ежедневным средним), это будет говорить об изменении рабочих значений характеристик АС в ЦЛ. В этом случае до

выявления причины срабатывания контрольных правил все текущие результаты измерений анализа в биопробах, полученных в том числе и из данного ПЛПУ, не подлежат выдаче в клинику.

2.1.2. Основные принципы метода контроля по «ежедневным средним»

Контрольные карты по «ежедневным средним» по биопробам пациентов строятся, ведутся и анализируются практически по тем же правилам, что и контрольные карты по КМ [21]. Но в контроле по «ежедневным средним» есть свои специфические процедуры – например, определение диапазона усреднения для получаемых ежедневно результатов.

Для оперативного контроля за клинической приемлемостью величин нестабильности содержания анализа в биопробах, поступающих из данного ПЛПУ в ЦЛ и происследованных в течение текущего дня, для каждого анализа строят контрольные карты по «ежедневным средним» (карту Леви-Дженнинга и/или карту кумулятивных сумм) [9], параметры которых определяют на основе результатов измерений, полученных ранее в ходе проведения испытаний в течение 20 дней.

Для вычислений параметров карты используют усредненные за день результаты по пациентам - так называемые «ежедневные средние». Ежедневному усреднению должно подлежать статистически значимое число результатов по пациентам. При этом усредняются только результаты, попадающие в диапазон усреднения. Рекомендуется сначала в качестве диапазона усреднения использовать нормальный (референсный) диапазон или диапазон шире его в 1,2-2,0 раза.

После определения границ диапазона усреднения по ранее полученным в ЦЛ в ходе испытаний результатам измерения содержания анализа в биопробах из данного ПЛПУ вычисляют для каждого j -того дня ежедневные средние значения $(\bar{X}_{cp})_{jkm}$ по результатам анализа k -того анализа в j -тых пробах пациентов из m -того ПЛПУ. Затем вычисляют значения стандартного отклонения $(SD_{cp})_{km}$ и коэффициента вариации $(CV_{cp},\%)_{km}$ для этих ежедневных средних, а также их среднее $(\bar{X}_{cp})_{km} = \sum (\bar{X}_{cp})_{jkm} / N_{km}$, где N_{km} – число дней, в течение которых проводились испытания.

Если вычисленное значение коэффициента вариации $(CV_{cp},\%)_{km}$ для ежедневных средних окажется существенно больше, чем значение $CV_{20,\%}$, полученное для контрольной карты по КМ с нормальным содержанием анализа, то это будет означать, что число усредняемых в день результатов недостаточно (при условии однородности контингента обследуемых, см. ниже). В этом случае надо увеличить число усредняемых результатов за счет, например, расширения диапазона усреднения.

Если вычисленное значение $(CV_{cp},\%)_{km}$ для ежедневных средних сравнимо со значением $CV_{20,\%}$ для КМ с нормальным уровнем анализа, то тогда по вычисленным значениям $(\bar{X}_{cp})_{km}$ и $(SD_{cp})_{km}$ строят контрольные карты для ежедневных средних - карту Леви-Дженнинга и карту кумулятивных сумм.

При ведении карты по ежедневным средним нужно учитывать следующее:

- обследуемый изо дня в день контингент должен быть достаточно однородным, т.е. не должно быть сильных количественных и качественных изменений среди обследуемых пациентов,

- если в ПЛПУ в определенные дни происходит смена обследуемого контингента, например, в один из дней обследуются только новорожденные или только больные диабетом, то средние значения по этим дням в расчет принимать не следует,

- при усреднении всех полученных в течение дня результатов даже один сильно патологический результат может существенно изменить среднее значение, поэтому в расчет должны приниматься только результаты, укладывающиеся в диапазон усреднения,

- число усредняемых ежедневно результатов должно быть не менее 15, лучше 50-70,

- большая часть ежедневных результатов должна быть близка к диапазону усреднения, поскольку контроль по ежедневным средним при сильно патологических результатах (например, результаты исследования лейкоцитов в гематологическом отделении) не имеет смысла,

- ввиду необходимости обработки больших массивов данных желательна автоматизация расчетов.

Карты по ежедневным средним анализируются по тем же правилам, что и карты по КМ. Например, при ведении карты Леви-Дженнинга анализ ее текущих контрольных точек с целью выявления случаев выхода измерительного процесса из под контроля следует проводить по правилам, рекомендованным ГОСТ Р 53133.2-2008 [2].

Хотя контрольные карты Леви-Дженнинга удобны для построения и интерпретации, у них есть недостаток - небольшие изменения в правильности (что может оказаться важным при контроле неизменности нестабильности) видны на них плохо. Для решения этой проблемы используют карты кумулятивных (от латинского «кумулятэ» – накапливать) сумм.

В случаях существенной вариабельности исследуемого в данном ПЛПУ контингента предпочтительнее вести карту кумулятивных сумм, т.к. разброс точек на карте Леви-Дженнинга по ежедневным средним практически всегда больше, чем на такой же карте по КМ, поэтому выявить на ней небольшие изменения правильности будет еще сложнее.

Для построения и ведения карты кумулятивных сумм используются те же результаты, что и для карты Леви-Дженнинга [9]. Отличие карты кумулятивных сумм состоит в том, что в ее середине проводят ось X, соответствующую нулевому значению кумулятивной суммы, а по оси Y откладывают текущие значения кумулятивной суммы. Значения кумулятивных сумм, которые последовательно наносят на карту, рассчитываются так: каждый день, начиная с первого дня ведения карты, из текущего ежедневного среднего вычитается изначально определенное среднее для ежедневных средних, эта разность с учетом знака прибавляется к сумме разностей, рассчитанной для предыдущего дня, и наносится на карту. Таким образом, каждая точка представляет собой сумму отклонения текущего значения ежедневного среднего от его среднего значения и всех предыдущих отклонений, т.е. отклонения от среднего накапливаются от точки к точке.

При анализе этой карты нужно следить за наклоном к оси X воображаемой линии, проведенной через точки карты, т.к. именно этот наклон говорит о том, насколько текущие значения для ежедневного среднего близки к их среднему значению, рассчитанному при запуске карты. Если текущие значения для ежедневного среднего значения в среднем меньше их среднего значения - карта кумулятивных сумм «ползет» вниз, если больше - вверх. Чем больше

становится разница между изначально рассчитанным средним и реальным, получаемым по текущим значениям ежедневных средних, тем круче спад или подъем карты кумулятивных сумм.

Интерпретация карты кумулятивных сумм представлена ниже.

1) Если точки колеблются относительно оси X или относительно линии, параллельной оси X, это означает, что реальное среднее для текущих ежедневных средних в эти дни практически совпадает с рассчитанным ранее и использовавшимся при расчете ежедневных разностей для определения кумулятивных сумм. То есть среднее значение не изменяется со временем, и правильность поддерживается на постоянном уровне.

2) Если точки монотонно смещаются вверх или вниз под небольшим, но постоянным углом к оси X, это означает, что реальное среднее по текущим значениям для ежедневных средних в эти дни немного отличается от рассчитанного ранее и использовавшегося при расчете кумулятивных сумм. Если точки смещаются вверх, это означает, что среднее значение в эти дни немного выше, а если вниз, то немного ниже расчетного среднего. Такая ситуация допустима.

3) Если точки смещаются вверх или вниз под постоянным, но большим углом к оси X, это означает, что реальное среднее для текущих ежедневных средних в эти дни существенно отличается от использовавшегося при расчете кумулятивных сумм. В этом случае, хотя правильность исследований не меняется, поскольку угол наклона остается постоянным, следует проанализировать причины того, почему получаемое среднее отличается от рассчитанного ранее.

4) Если произошла смена направления, т.е. поменялся угол наклона прямой, проходящей через контрольные точки, это означает, что реальное среднее для текущих ежедневных средних поменяло значение. Момент смены направления - это момент, когда изменилось реальное среднее. Получаемые текущие ежедневные средние могут при этом стать даже ближе к изначально рассчитанному среднему, но факт изменения наклона говорит о том, что реальное среднее для текущих ежедневных средних **изменилось**, причина этого изменения требует анализа.

2.1.3. Критерий установления клинической приемлемости текущих величин нестабильности

Если АС в ЦЛ будет находиться под контролем и по данным ежедневных средних по пациентам, и по результатам анализа КМ, это будет свидетельствовать об эксплуатационной стабильности аналитических характеристик и неизменности изначально определённой «типовой» нестабильности. Соответственно, весь измерительный процесс, включая аналитические измерения и преаналитические процедуры, связанные с централизацией, будет оставаться под контролем, обеспечивая клиническую приемлемость текущих результатов определения содержания аналита в биопробах, доставленных из ПЛПУ и проанализированных в ЦЛ в течение текущего дня.

Постоянное ведение оперативного контроля неизменности изначально определённого «типового» уровня нестабильности не потребует от ЦЛ существенных дополнительных материальных затрат, за исключением, возможно, приобретения компьютерной программы для автоматизации расчетов.

РАЗДЕЛ 3. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ВЫБОРУ АНАЛИТОВ И ПЕРИФЕРИЙНЫХ ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ УЧРЕЖДЕНИЙ НА НАЧАЛЬНОМ ЭТАПЕ ВНЕДРЕНИЯ МЕТОДИКИ

3.1. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ВЫБОРА ПЛПУ ДЛЯ ОТРАБОТКИ НАВЫКОВ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДИКИ

Перед тем как приступить к практическому внедрению в конкретном регионе настоящей методики, рекомендуется в ограниченном масштабе отработать практические навыки реализации основных этапов исследований, направленных на накопление необходимых данных для определения величин нестабильности биопроб в данном регионе с учетом демографических, этнических, климатических факторов, административно-территориальных особенностей организации здравоохранения и лабораторной службы. Такой опыт необходим и для уточнения региональной версии методических указаний по определению величин нестабильности содержания анализа в биопробах, доставляемых в ЦЛ из ПЛПУ, и ведению оперативного контроля за их клинической приемлемостью в условиях централизации исследований, в полном объеме описанных в разделах 1 и 2 настоящих МУ.

Для отработки навыков использования методики оценки величин нестабильности биопроб рекомендуется выбрать несколько наиболее типичных представителей из списка ПЛПУ и из списка аналитов в рамках планируемой программы централизации таким образом, чтобы учесть специфику региона и особенности взаимодействия ПЛПУ с ЦЛ.

Непременным условием выбора КДЛ ПЛПУ для отработки методики является их соответствие требованиям национальных стандартов и приказов Минздрава РФ в части организации работы по управлению качеством в КДЛ. Систематическое ведение всех процедур ВКК и регулярное участие в программах внешней оценки качества (например, в ФСВОК), являются важнейшими критериями при отборе лабораторий для отработки навыков использования методики. Если лаборатория регулярно участвует и в международных программах внешней оценки качества лабораторных исследований, то этот факт с большой вероятностью указывает на существование в КДЛ высоких стандартов применительно к контролю качества и системного подхода к этой проблеме.

Существенно сократить время подготовки к проведению измерений и гарантировать качество получаемых результатов может поспособствовать практика использования КДЛ основных положений системы менеджмента качества, изложенных в ГОСТ Р ИСО 15189–2012 [17], а также опыт работы специалистов лаборатории по верификации и валидации методик измерений в соответствии с процедурами, рекомендованными признанными лидерами в области стандартизации процедур лабораторных исследований - такими, как институт клинических и лабораторных стандартов CLSI (ранее именовавшийся NCCLS).

Опыт использования в КДЛ системы индикаторов качества выполнения преаналитического этапа (оценка степени гемолиза, иктеричности, липемии) будет полезен для сокращения числа ошибочных результатов, получаемых в ходе проведения исследований биопроб в рамках реализации настоящей методики.

3.1.1. Характеристики аналитических систем

Эксплуатационные значения основных метрологических характеристик АС (правильность и прецизионность), используемых ПЛПУ и ЦЛ, должны соответствовать требованиям ГОСТ Р 53133.2-2008 [2] и приказов Минздрава РФ [21,22], в том числе для этих систем должны вестись в полном объеме все процедуры оперативного контроля их стабильности. Особенно это важно отслеживать для тех случаев, когда в ПЛПУ исследования выполняются с использованием полуавтоматических анализаторов и ручных процедур, а в ЦЛ применяются автоматизированные комплексы. Эксплуатационные значения общей аналитической ошибки и ее составляющих для результатов, получаемых в ПЛПУ, могут оказаться не только близки к предельно допускаемым для них значениям, но и значимо флуктуировать в течение всего срока исследований, проводимых в рамках настоящей методики.

Предпочтительно выбирать лаборатории ПЛПУ, которые бы использовали реагенты, калибраторы и КМ одного производителя, так как в этом случае можно оптимизировать объем исследований по верификации аналитических характеристик сравниваемых АС и впоследствии значительно снизить объем проводимых в рамках реализации методики расчетов.

В качестве идеального случая можно рассматривать закрытые АС одного производителя. При их правильной эксплуатации аналитические характеристики таких систем имеют достаточно близкие эксплуатационные значения, в том числе отсутствие с высокой вероятностью систематического сдвига между используемыми системами, что позволит с более высокой достоверностью выявлять минимальные различия в результатах, обусловленные именно нестабильностью проб.

3.1.2. Поток исследований и перечень анализов, наличие стационара или экспресс-лаборатории

При ограниченном перечне исследований, выполняемых в ПЛПУ, будет затруднительно сформировать группу аналитов, которая позволила бы оптимизировать работу и соответствовала описанным ниже критериям. По величине потока исследований в ПЛПУ можно косвенно судить о степени автоматизации исследований в данной лаборатории и, тем самым, предварительно оценить сопоставимость АС. Лаборатории ПЛПУ с небольшим потоком исследований, расположенные вблизи от ЦЛ, как правило, в первую очередь подлежат централизации вследствие очевидной экономической целесообразности. Поэтому не имеет смысла рассматривать их в качестве типовой модели регионального масштаба.

В достаточно больших ПЛПУ, где имеется отделение со стационаром, должно быть обеспечено выполнение срочных анализов по неотложным показателям, что подразумевает наличие постоянно функционирующей и оборудованной должным образом экспресс-лаборатории. Эта особенность позволяет с минимальными финансовыми затратами организовать исследование аналитов, стабильность которых не может быть обеспечена при транспортировке в ЦЛ. Таким ПЛПУ может быть передана функция исследования нестабильных аналитов в биопробах, получаемых от более мелких ПЛПУ, централизация для которых не может быть

обеспечена путем передачи абсолютно всего перечня исследований в единственную (и, как правило, удаленную) ЦЛ.

Таким образом, одним из оптимальных вариантов для отработки методики следует рассматривать лабораторию, где ежедневно выполняется широкий спектр исследований на автоматических анализаторах, и которая обеспечивает потребности как амбулаторного звена, так и стационара.

3.1.3. Удаленность ПЛПУ от ЦЛ

Фактор удаленности фактически является определяющим критерием при принятии решения о централизации исследований, так как именно он определяет время, необходимое для доставки проб в ЦЛ. Как отмечается в руководстве рабочей группы по преаналитическим вариациям немецких обществ по клинической химии и по лабораторной медицине [6], фактор времени имеет почти всегда преимущественное влияние на стабильность состава биопроб при их хранении. Особенно важно отметить, что вопросы стабильности состава биопроб при их транспортировании остаются до сих пор практически неизученными.

Поэтому слишком большая удаленность и ограниченные возможности логистических схем, удлиняют время хранения проб после взятия биоматериала у пациента и существенным образом могут повлиять на стабильность. Обоснование целесообразности участия в централизации именно удаленных ПЛПУ с позиций влияния преаналитического этапа исследований на стабильность биопроб и решается с помощью настоящей методики. Принимая во внимание административно-территориальный принцип разграничения региональных органов управления здравоохранением, можно предположить, что для большинства регионов будет невозможно создать единую ЦЛ и, вероятнее всего, будут созданы несколько ЦЛ. А один из принципов построения такой сети ЦЛ и должен состоять именно в рациональном выборе мест расположения ЦЛ, оптимальных с позиции логистических схем доставки биопроб, разработанных на основании данных о типовой стабильности аналитов. Именно принцип гарантированной сохранности биопроб, и, в конечном счете, качество лабораторных исследований должны иметь решающее значение при централизации.

3.1.4. Оборудование пунктов взятия биопроб

Перед тем как приступить к практической реализации настоящей методики, необходимо решить вопрос стандартизации процедуры взятия биопроб и их первичной обработки [13, 15]. Для взятия биопроб настоятельно рекомендуется использовать одноразовые (в частности, вакуумные) системы с различными наполнителями (при выполнении широкого спектра исследований) [16].

Первичная подготовка проб крови к транспортировке включает соблюдение необходимого времени инкубации, обеспечение необходимых температурных условий и времени их хранения, а также центрифугирование. Только те лаборатории (пункты взятия биопроб), в которых стандартизованы, отработаны на практике и обеспечены всеми необходимыми материалами и оборудованием все этапы пробоподготовки, можно рассматривать в качестве первоочередных объектов для апробации данной методики. Если в регионе пока не решен вопрос стандартизации

преаналитического этапа исследований, то результаты выполненной работы по внедрению настоящей методики можно будет рассматривать как исходные данные для планирования и осуществления таких мероприятий.

3.2. ПРИНЦИПЫ ВЫБОРА БАЗОВОГО ПЕРЕЧНЯ АНАЛИТОВ

Как известно, сразу после взятия биопроб их состав начинает меняться и с течением времени содержание и биологическая активность отдельных компонентов уже не могут адекватно отражать их содержание и активность *in vivo*. Наиболее важные причины изменения изначального состава и свойств биопроб следующие [12]:

- метаболизм клеток,
- испарение/сублимация,
- химические реакции,
- разрушение микроорганизмами,
- осмотические процессы,
- воздействие света,
- диффузия газов.

Каждый из этих факторов в разной степени влияет на стабильность содержания или активность того или иного аналита. В настоящее время можно констатировать, что лишь для отдельных аналитов в составе биопроб экспериментальным путем были получены более или менее надежные количественные оценки влияния на них тех или иных факторов окружающей среды. Большинство оценок носит общий и ограниченный характер, так как не учитывает особенности исходного состава пробы и всего многообразия внешних воздействий, особенно возможные эффекты влияния механического или иного воздействия при транспортировании биопроб.

Типовые значения для величин нестабильности содержания аналитов в биопробах в реальных условиях централизации их исследований, в том числе сроках и условиях доставки биопроб из ПЛПУ в ЦЛ, должны быть определены экспериментально в реальных условиях преаналитического этапа и с достаточной статистической надежностью, так как именно они, в конечном итоге, определяют возможность принятия решения о централизации исследований в регионе.

3.2.1. Температура и время хранения

Систематизированные данные о стабильности аналитов в пробах крови, мочи и СМЖ представлены в соответствующих приложениях к ГОСТ Р 53079.4-2008 [3]. Однако важно отметить, что они учитывают лишь два фактора воздействия внешней среды – время и стабильную температуру их стационарного хранения.

Поэтому отправным и формальным критерием для предварительного отбора аналитов, чья стабильность будет проверяться с использованием данной методики, является возможность реализации на практике условий стабильности, указанных в вышеупомянутом стандарте. Если при доставке биопроб из ПЛПУ в ЦЛ невозможно обеспечить допустимое время или температуру

хранения, а также нельзя гарантировать отсутствие влияния других внешних физических факторов, возникающих, например, при транспортировании, то это является основанием для экспериментальной проверки стабильности биопроб.

3.2.2. Чувствительность к ненормируемым внешним воздействиям (свет и вибрация)

Если рассматривать реальные условия транспортировки биопроб из ПЛПУ в ЦЛ, то необходимо, как минимум, учитывать периодическое воздействие вибрации, света и возможную нестабильность температурного режима.

Известно, что ряд аналитов имеет повышенную чувствительность к воздействию светового излучения. Например, снижается концентрация билирубина (*порфиринов*), витамина С, фолиевой кислоты, подавляется активность креатинкиназы, усиливается активность альдолазы и каталазы. Предохранить пробы от воздействия света достаточно просто, однако не всегда на преаналитических этапах этому фактору придается должное значение.

Вибрация, неизбежно возникающая при транспортировке, а также неправильное и неосторожное перемешивание пробы, взятие венозной крови шприцем оказывают самое непосредственное воздействие на состав и свойства биопроб. Например, приводят к разрушению клеточных элементов в пробе, что вызывает активацию тромбоцитов, агрегацию и фрагментацию этих клеток. Такие изменения в тромбоцитах могут оказывать существенное влияние при исследовании эритроцитов и лейкоцитов, особенно при подсчете лимфоцитарной фракции лейкоцитов.

К сожалению, требование бережного обращения с пробой, особенно при выполнении гематологических исследований, является трудновыполнимым на практике при массовой транспортировке проб в ЦЛ.

3.2.3. Чувствительность к гемолизу

Причинами гемолиза могут быть разнообразные патологические состояния пациента (гемолиз *in vivo*) или нарушения, связанные с взятием, хранением и транспортировкой образца биопробы (гемолиз *in vitro*). Однако, вне зависимости от причин, гемолиз является очевидной преаналитической проблемой и частой причиной отказа от проведения исследования.

Механизмы влияния гемолиза на состав и свойства проб крови состоят в увеличении содержания внутриклеточных компонентов во внеклеточном пространстве (калий, неорганические фосфаты, ЛДГ, АСТ и др.). Также имеет место спектральная интерференция (если спектр поглощения хромогена близок к спектру гемоглобина) и химическая интерференция, например, увеличение активности креатинкиназы и креатинкиназы МВ за счет аденилаткиназы, высвобождающейся из эритроцитов [12].

В настоящее время индекс гемолиза даже рекомендуется использовать в качестве интегральной оценки качества преаналитического этапа [14].

Таким образом, аналиты, содержание и свойства которых зависят от степени гемолиза, следует рассматривать в качестве первоочередных показателей при отработке типовых шагов данной методики количественной оценки стабильности состава биопроб.

Чтобы уменьшить риск появления гемолиза на этапе взятия образцов крови, следует **исключить:**

- длительное наложение жгута,
- оставление на поверхности кожи в месте венепункции следов дезинфицирующего раствора,
- взятие крови шприцем и переливание ее в вакуумные системы,
- интенсивное перемешивание пробирок,
- несоблюдение правил центрифугирования.

Все процедуры должны быть изложены в инструкции по взятию проб крови на лабораторные исследования. Каждая централизованная КДЛ должна разработать свою инструкцию и обеспечить ею всех процедурных медицинских сестер всех ЛПУ, которые она обслуживает.

3.2.4. Внутрииндивидуальная и межиндивидуальная вариабельность

Для того, чтобы минимизировать влияние внутрииндивидуальной вариабельности аналита на расчетные статистические показатели, которые используются при определении максимально допустимых значений для величин нестабильности, для отработки методики следует выбирать показатели с небольшим значением внутрииндивидуальной биологической вариации CV_I .

Так как на этапе оперативного контроля приемлемости величин нестабильности биопроб будет использоваться метод оценки ежедневных средних по всему пулу пациентов, поступающих из конкретного ПЛПУ, то для отработки методики желательно использовать аналиты, имеющие умеренную межиндивидуальную биологическую вариацию CV_G .

Уточненные данные для показателей CV_I и CV_G можно найти на сайте [7].

3.2.5. Принцип неоднородности

Для ряда аналитов экспериментальным путем были получены количественные оценки сроков стабильности *in vitro* и определены оптимальные условия и допустимые сроки хранения, информация по которым приведена в том числе в национальном стандарте [3]. По данному критерию аналиты можно условно разделить на 3 группы: 1) относительно стабильные и малочувствительные к воздействию факторов внешней среды, 2) стабильные при определенных условиях и 3) нестабильные, крайне чувствительные к внешним воздействиям. Первая группа аналитов, по-видимому, не должна представлять сложности для централизации исследований, вторая группа требует строгого соблюдения процедур взятия проб, подбора специальных систем хранения и условий транспортировки, третья группа может рассматриваться как объект централизации в исключительных случаях, когда взятие проб и проведение исследований невозможно выполнить в одном ПЛПУ. В группе аналитов, выбранных для отработки методики, желательно иметь как относительно стабильные, так и низкостабильные аналиты. В этом случае, эффект влияния транспортировки и других факторов преаналитического этапа становится более очевидным, а также появляется возможность выявления последствий грубых и непредсказуемых случайных воздействий, которым могут подвергнуться образцы биопроб. Это влияние, в

некоторых случаях, можно установить по смещению абсолютных значений в группе стабильных анализов. И после определения причин, которые вызвали нехарактерное изменение типовой стабильности, можно либо усовершенствовать процедуру доставки проб, либо прийти к заключению, что воздействие носило случайный характер, и отбраковать результаты, полученные в данной серии измерений.

3.3. ПРИНЦИПЫ ВЫБОРА КОНТРОЛЬНЫХ МАТЕРИАЛОВ И ПРОБ ПАЦИЕНТОВ

3.3.1. Контрольные материалы

КМ, используемые для ведения процедур ВКК, должны соответствовать требованиям ГОСТ 53133.3–2008, в частности иметь аттестованные значения и неопределенность измерения для всех анализов, исследуемых в ЦЛ и ПЛПУ. Неопределенность измерения должна быть выражена или как комбинированная стандартная неопределенность, или как интервал, рассчитанный из расширенной неопределенности с установленным уровнем доверительной вероятности [18].

КМ должен быть представлен как минимум двумя уровнями для исследуемых анализов (нормальным и патологическим). Для гематологических исследований рекомендуется использовать КМ трёх уровней.

Уровни аттестованных значений исследуемых анализов должны быть максимально близки к уровням принятия клинических решений, так как выявленные в этом диапазоне отклонения могут иметь критическое значение в постановке диагноза.

Желательно, чтобы КМ и реагенты были одного производителя, в этом случае неопределенность измерений, как правило, ниже, а вероятность обнаружить значимую величину смещения между двумя АС минимальна, что создает более благоприятные условия для выявления случаев неприемлемости типовых величин нестабильности биопроб на преаналитическом этапе. Данное пожелание становится необходимостью при коагулологических исследованиях, ввиду отсутствия стандартизованных по составу реагентов, универсальных калибраторов и КМ. Существенная зависимость результатов коагулологических исследований от АС, а также крайне высокая чувствительность тестов данного типа ко всем этапам преаналитики (тип пробирок, температура и время хранения, условия центрифугирования) однозначно приводят к заключению о целесообразности проведения исследований стабильности биопроб на закрытых АС. В этом случае на подготовительном этапе апробации методики можно ограничиться строгой стандартизацией и контролем только этапов пробоподготовки.

Примечание. Для проведения исследований в рамках данной методики необходимо использовать КМ одного и того же лота и в ПЛПУ, и в ЦЛ. **ЗАО «Аналитика, как разработчик методики, оставляет за собой право выбора КМ при проведении исследований для определения текущих значений систематического сдвига между используемыми АС и для уточнения эксплуатационных значений их аналитических характеристик.**

3.3.2. Пробы пациентов

Величина нестабильности состава биопроб должна быть исследована во всём рабочем диапазоне выбранного метода измерений. Для сравнительного анализа данных, полученных с использованием двух АС, необходимо иметь статистически представительную выборку как в нормальном диапазоне, так и в области патологии.

Для лучшего понимания возможной причины нестабильности биопроб и оценки степени влияния на стабильность таких показателей как пол, возраст, диагноз, принимаемые препараты и т.д. описание пробы должно быть как можно более подробным, а пациент перед взятием проб проинформирован о необходимости соблюдения рекомендаций, предшествующих процедуре сдаче анализов.

Отдельные этапы выполнения исследований в рамках данной методики предполагают двукратное взятие проб, поэтому следует предупредить пациента об этом заранее и узнать его готовность к повторному анализу.

4. ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ДЛЯ АПРОБАЦИИ МЕТОДИКИ

Если условно разделить все лабораторные исследования на следующие большие группы: гематология, гемостаз, биохимия, иммунохимия, цитология и молекулярная генетика, то лишь первые три можно отнести к массовым рутинным тестам, в отношении которых, как правило, и будут решаться вопросы возможности централизации исследований. Лабораторные исследования, требующие наличия высокотехнологичного и дорогостоящего оборудования, а также высококвалифицированных узкопрофильных специалистов, обычно выполняются только в специализированных КДЛ, поэтому централизация таких исследований неактуальна. В этом случае, пробы берутся непосредственно в лаборатории или в определенных пунктах взятия биопроб, условия доставки из которых в лабораторию строго контролируются.

Коагулологические исследования обычно относятся к срочным, поскольку часто позволяют определять состояния, несущие угрозу жизни пациентов. От результатов этих исследований зависит своевременность и правильность назначения сильнодействующих препаратов, и ошибки анализов способны стать прямой причиной ухудшения состояния пациентов. Поэтому лабораторные исследования системы гемостаза, как никакие другие, нуждаются в стандартизации как аналитического, так и преаналитического этапа, поскольку результаты тестов во многом зависят от подготовки пациента, условий взятия крови, транспортировки пробы в лабораторию и пробоподготовки [19]. Однако апробацию предлагаемой методики лучше отложить до положительного решения в регионе вопросов стандартизации преаналитического этапа, и в частности при исследовании показателей гемостаза, так как без этого трудно будет оценить величину нестабильности данных показателей в результате транспортировки и хранения проб на фоне непредсказуемого влияния других плохо контролируемых факторов. Кроме того, время выполнения скрининговых тестов плазменного звена гемостаза ограничено 1–4 часами после взятия крови, что существенно сужает круг периферийных лабораторий, доставка проб из которых может быть выполнена в такие сжатые сроки.

В соответствии с требованиями международного комитета по стандартизации в гематологии (ICSH) [20], гематологические исследования на автоматических анализаторах рекомендуется проводить через 40–60 мин после взятия венозной крови (кроме исследований на проточных цитохимических анализаторах). Это связано с образованием обратимых тромбоцитарных агрегатов в пробе при их контактной активации в первые 30 минут и соответствующим влиянием на результаты подсчета форменных элементов крови. Более чем через 60 минут после взятия в пробе крови начинаются необратимые изменения, которые отражаются на результатах гематологических исследований. Образцы крови, взятые для гематологического исследования нельзя хранить более 4 часов при +20°C. Таким образом, централизация гематологических исследований должна проводиться с большой осторожностью и с учетом ограниченной стабильности проб крови. С другой стороны, за последние несколько лет в рамках модернизации технической оснащенности учреждений здравоохранения и реализации национального проекта «Здоровье» многие лаборатории были оборудованы современными гематологическими анализаторами, поэтому с позиции экономической целесообразности имеет смысл для отдаленных ЛПУ выполнять исследования на имеющихся приборах, а не отсылать пробы с риском потери качества в ЦЛ.

Таким образом, принимая во внимание изложенные в данном разделе критерии выбора ПЛПУ и аналитов, для отработки навыков использования методики оценки величин нестабильности биопроб рекомендуется на первом этапе практической работы ограничить перечень лабораторных исследований биохимическими тестами и подобрать лабораторию, оборудованную современными автоанализаторами, длительность доставки проб из которой будет составлять от 4 до 8 часов.

В Приложении 1 представлен примерный перечень аналитов, рекомендованных для апробации методики, а также условия их стабильности в пробах крови. Более полные данные о стабильности аналитов в пробах крови, мочи и СМЖ представлены в приложениях к ГОСТ Р 53079.4-2008 [3].

В Приложении 2 приводится перечень, краткое содержание и последовательность выполнения основных этапов практической реализации методики оценки клинической приемлемости величин нестабильности биопроб.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1.

Перечень биохимических тестов, рекомендованных для апробации методики

Нестабильные аналиты и аналиты, требующие особых условий хранения		Относительно стабильные аналиты	
Аммиак Билирубин Глюкоза Калий, Кальций Лактат, Магний Фосфаты	Креатинкиназа ЛДГ АЛТ, АСТ Щелочная фосфатаза ГГТ	Липопротеин(а) ЛПВП / ЛПНП С3, С4 компонент комплемента	Общий белок Альбумин Креатинин Мочевина Холестерин

Влияние факторов пробоподготовки и стабильность некоторых аналитов в пробах крови

Аналит	Чувствительность к гемолизу	Чувствительность к свету	Условия хранения
Аммиак	Низкая	Низкая	2 часа при 4...8°C Плазма
Билирубин	Средняя	Высокая	2 суток при 20...25°C
Глюкоза	Низкая	Низкая	2 суток при 20...25°C. Ингибитор гликолиза: фторид натрия, моноиодацетат, манноза
Калий	Высокая	Низкая	6 недель при 20...25°C. Быстрое получение сыворотки (плазмы)
С3, С4 компонент комплемента	Низкая	Низкая	2 суток при 20...25°C Нестабильны при хранении
Гомоцистеин	Низкая	Низкая	Хранить при 0...4°C. Ингибитор - фторид натрия
Креатинкиназа	Высокая	Высокая	4 часа при 20...25°C
Лактат	Средняя	Низкая	3 суток при 20...25°C. Быстрое получение плазмы. Ингибитор гликолиза
ЛДГ	Высокая	Низкая	7 суток при 20...25°C. Быстрое получение плазмы (с гепарином). В сыворотке нестабильна
Липопротеин(а)	Низкая	Низкая	2 суток при 4°C
Магний	Высокая	Низкая	7 суток при 20...25°C. Быстрое получение сыворотки (плазмы)
Неорг. фосфат	Высокая	Низкая	1 суток при 20...25°C. Быстрое получение сыворотки (плазмы)
Трансаминазы (АЛТ, АСТ)	Высокая	Низкая	3 суток при 20...25°C
ЛПВП / ЛПНП	Средняя	Низкая	1 сутки при 20...25°C
Инсулин, Проинсулин, С-пептид	Низкая	Низкая	Нестабильны, хранение только на льду
Нестабильные гормоны	Низкая	Низкая	К ₃ ЭДТА 7 часов с аprotинином (ингибитор протеолиза)

ПРИЛОЖЕНИЕ 2.

Краткий алгоритм подготовки и начального этапа внедрения методики в регионе

1) Определение перечня участвующих в программе централизации ПЛПУ и перечня анализов (для каждого ПЛПУ), которые планируется централизовать.

2) Расчёт для каждой пары ПЛПУ-ЦЛ необходимых объёмов КМ каждого уровня (норма и одна или две патологии) для каждого анализа из вошедших в перечень. При расчёте исходить из следующего:

а) содержание каждого анализа в образцах КМ каждого уровня должно быть измерено 10 раз ежедневно в течение 20 дней испытаний в каждом ПЛПУ - всего 200 измерений содержания анализа в образцах КМ каждого уровня в каждом ПЛПУ;

б) содержание каждого анализа в образцах КМ каждого уровня также должно быть измерено 10 раз ежедневно в течение 20 дней испытаний в ЦЛ – всего 200 измерений содержания анализа в ЦЛ.

3) Расчёт суммарного объёма КМ каждого уровня (норма и одна или две патологии), необходимого для проведения испытаний по каждому анализу.

4) Расчёт суммарного числа парных измерений содержания каждого исследуемого анализа в биопробах пациентов в ПЛПУ и в ЦЛ, исходя из стандартной загрузки лаборатории каждого ПЛПУ.

5) Расчёт суммарного объёма реагентов, необходимого для измерений каждого анализа в КМ каждого уровня и в биопробах пациентов с учётом того, что анализ биопроб в ПЛПУ является плановой нагрузкой, а в ЦЛ – дополнительной, а также того, что в разных ПЛПУ и в ЦЛ могут использоваться разные, в том числе закрытые АС.

6) Закупка необходимых объёмов КМ и реагентов и передача соответствующих их количеств в ЦЛ и ПЛПУ.

7) Проведение в каждом ПЛПУ и ЦЛ в течение 20 рабочих дней всех необходимых измерений содержания исследуемых анализов в образцах КМ всех уровней и в биопробах пациентов, при этом в каждом ПЛПУ выполнять определение исходных уровней анализов в биопробах, а в ЦЛ – уровней анализов в этих же биопробах после их плановой доставки в ЦЛ.

8) Кодирование (по заранее разработанному принципу) данных обо всех ежедневно получаемых результатах измерений для обеспечения однозначной их идентификации, и ежедневная передача данных в центр проведения испытаний (далее ЦПИ).

9) Выполнение в ЦПИ статистической обработки данных согласно настоящим методическим указаниям.

10) Расчёт согласно настоящим методическим указаниям для всех исследуемых анализов предельно допустимых значений величин нестабильности с использованием базы данных по внутрииндивидуальным вариациям, имеющейся на сайте Вестгарда [7].

11) По окончании испытаний расчёт всех типовых величин нестабильности для каждого анализа и каждого ПЛПУ согласно настоящим методическим указаниям.

12) Выполнение оценки возможности централизации исследований каждого анализа для каждого ПЛПУ по двум критериям - «жёсткому» и «мягкому».

13) Расчёт параметров контрольных карт для ведения в ЦЛ оперативного контроля по ежедневным средним согласно настоящим методическим указаниям.

ЛИТЕРАТУРА

1. Заявка на изобретение. Способ оценки величины нестабильности биопроб / Петров С.П., Прищепа М.И. (Россия) – № 2015137987; заявлено 08.09.15.
2. 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. – М.: Стандартинформ, 2009. – 20 с.
3. ГОСТ Р 53079.4-2008 Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа. – М.: Стандартинформ, 2009. – 66 с.
4. Прищепа, М.И. Технологии оценки качества преаналитического этапа лабораторных исследований: современное состояние и специфика их применения при централизации / М.И.Прищепа // Лаборатория. – 2015. – N 4. - С.14-17.
5. Fraser, Callum G. Biological Variation: From Principles to Practice // AACCC-Press. - 2001.
6. The Quality of Diagnostic Samples. Recommendations of the working group on preanalytical variables of the German Society for Clinical Chemistry and the German Society for Laboratory Medicine. Darmstadt, Germany. 3d Edition // GIT - 2009.
7. www.westgard.com/biodatabase1.htm
8. ГОСТ Р 53133.1-2008 Технологии лабораторные клинические. Контроль качества клинических лабораторных исследований. Часть 1. Пределы допускаемых погрешностей результатов измерения аналитов в клинико-диагностических лабораториях. – М.: Стандартинформ, 2009. – 28 с.
9. Основы статистики и методы ведения внутрилабораторного контроля качества. Часть 2. Методические рекомендации № 27. – М.: Комитет здравоохранения Прав-ва Москвы, 2002. – 25 с.
10. Пустыльник, Е.И. Статистические методы анализа и обработки наблюдений / Е.И.Пустыльник. – М.: Наука, 1968. – 288 с.
11. Use Delta Checks in the Medical Laboratory. Approved Guideline. 1d Edition. CLSI Document C33-Ed1. CLSI catalog // CLSI. - March 2016. - Vol.36, N3.
12. Гудер, В.Г. Диагностические пробы: от пациента до лаборатории. Влияние преаналитических факторов на качество результатов лабораторных исследований / В.Г.Гудер, Ш.Нарайанан, Г.Виссер, Б.Цавта; пер. с англ. В.В. Меньшикова. – 4-е изд., дораб. - М.: Лабора, 2010. – 118 с.
13. Обеспечение качества лабораторных исследований: Преаналитический этап: Справ. Пособие; под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Лабинформ, 1999. – 315 с.
14. Клименкова, О.А. Индекс гемолиза: от обсуждения к решению проблем преаналитического качества / О.А.Клименкова, В.С.Берестовская, Е.С.Ларичева // Медицинский алфавит. Современная лаборатория. – 2013. – № 3. – С.38-40.
15. Кишкун, А.А. Централизация клинических лабораторных исследований. Методические рекомендации / А.А.Кишкун, М.А.Годков. - М.: 2013. – 35 с.
16. Кишкун, А.А. Организация преаналитического этапа при централизации лабораторных исследований. Методические рекомендации / А.А.Кишкун и др. // Поликлиника. Спецвыпуск Лаборатория. – 2013. – № 2.
17. ГОСТ Р ИСО 15189-2015 Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности. ISO 15189:2012 Medical laboratories - Requirements for quality and competence. – М.: Стандартинформ, 2015. – 46 с.
18. ГОСТ Р 53133.3-2008 Технологии лабораторные клинические. Контроль качества клинических лабораторных исследований. Часть 3. Описание материалов для контроля качества клинических лабораторных исследований. – М.: Стандартинформ, 2009. – 19 с.
19. Гильманов, А.Ж. О преаналитических требованиях к исследованию гемостаза при централизации лабораторных исследований. Взаимодействие клиники и лаборатории при централизации лабораторных исследований / А.Ж.Гильманов // Клиническая лабораторная диагностика. – 2012. - № 9. – С.52.
20. Tatsumi, N. Specimen collection, storage and transmission to the laboratory for hematological tests / N.Tatsumi, S.Miwa, S.M.Lewis // International Journal of Hematology. – 2002. – Vol.75. – N3(April). – pp.261-268.
21. О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации. Приказ Минздрава РФ от 7 февраля 2000 г. № 45.
22. Об утверждении отраслевого стандарта «Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов». Приказ Минздрава РФ от 26 мая 2003 г. № 220.

РОССИЙСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ ПОСЛЕДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ

**Медико-биологический факультет
Кафедра клинической лабораторной диагностики**

Рецензия

на методические указания «Оценка клинической приемлемости величин нестабильности биопроб» (авторы Багаев А.В, Петров С.П., Прищепа М.И.)

Актуальность. Методические указания ставят перед собой задачу – формализовать, стандартизовать и оценить этап преаналитического лабораторного анализа. В общем контексте данная задача вытекает из необходимости обеспечения качества лабораторных исследований. На протяжении нескольких десятилетий основной упор в обеспечении качества лабораторных исследований был сконцентрирован на аналитическом этапе. Внедренные в лабораторную практику автоматизация, стандартизация, компьютеризация, внутрилабораторный контроль качества, специализация и повышение профессиональных знаний и умений лабораторного персонала позволили практически исключить ошибки на этапе аналитики. Однако применение высокопроизводительной лабораторной техники, оптимизация лабораторных услуг способствовали внедрению повсеместно централизованных лабораторных исследований. При этой технологии актуальным стал вопрос о сохранении исходных параметров биопроб при хранении, доставке и обработке материала между лечебными и диагностическими подразделениями и оценка возможных изменений для решения вопроса о приемлемости или отказе от исследования при нарушениях транспортировки. Данные методические указания решают принципиальный вопрос об оценке нестабильности биопроб, поступающих из периферийных лечебно-профилактических учреждений в централизованные лаборатории, при этом дается алгоритм учета специфики, обусловленной разнообразием территориальных и климатических условий регионов.

Методические указания состоят из следующих разделов:

1. Определение величин нестабильности биопроб и клинической приемлемости этих величин;
2. Оперативный контроль клинической приемлемости величин нестабильности биопроб;
3. Рекомендации по выбору аналитов и периферийных лечебно-профилактических учреждений на начальном этапе внедрения методики.

Работа также содержит приложение, содержащее краткий практический алгоритм подготовки и начального этапа внедрения методики в регионе.

В разделе 1 показано, что клиническая приемлемость (возможность использования для решения клинических задач) получаемых в централизованных

лабораториях результатов будет определяться не только характеристиками аналитических систем, но и нестабильностью аналитов в доставляемых биопробах из периферийного ЛПУ. Максимально допустимые величины нестабильности указаны в ГОСТ Р 53079.4-2008, однако в приложении к этому стандарту приведены данные о стабильности аналитов, которые: а) не являются исчерпывающими по перечню аналитов и видов биопроб и б) относятся к условиям стационарного хранения биопроб при фиксированных температурах, что не позволяет экстраполировать эти данные к реальным условиям централизации исследований. Кроме того, имеет место вариабельность условий взятия биопроб и пробоподготовки в периферийном ЛПУ. Из этого следует, что решение вопроса о возможности централизации исследований какого-либо аналита невозможно без предварительной экспериментальной работы по определению величины нестабильности данного аналита в конкретных условиях поступления биопроб из конкретного ЛПУ в централизованную лабораторию. Кроме того, в централизованной лаборатории должен быть организован непрерывный контроль того, что изначально определенный уровень нестабильности биопроб остаётся в допустимых пределах. Кратко изложены недостатки существующих подходов к оценке нестабильности биопроб.

Изложена методика, позволяющая количественно определять уровни нестабильности биопроб по отклонениям содержания аналитов в биопробах от их исходного значения и оценивать клиническую приемлемость уровня нестабильности для решения клинических задач согласно требованиям ГОСТ Р 53079.4-2008. Методика позволяет вести оперативный контроль за тем, что в биопробах, регулярно поступающих в централизованную лабораторию из конкретного ЛПУ, сохраняется допустимый уровень нестабильности. Сущность предложенной методики заключается в следующем: для измерения содержания аналитов в биопробах до и после их хранения и транспортирования используют либо две аналитические системы, первая из которых располагается в ЛПУ, а вторая в централизованной лаборатории, либо только одну аналитическую систему, которая расположена в централизованной лаборатории. Для учета возможных систематических сдвигов между результатами, получаемыми с использованием первой и второй аналитической системой, дополнительно определяют значения систематического сдвига между первой и второй аналитической системой путём ежедневных измерений содержания аналита в образцах одного и того же контрольного материала. Для случая только одной аналитической системы предлагается, либо имитация условий доставки биопроб в централизованную лабораторию из каждого периферийного ЛПУ, либо взятие у пациентов проб дважды: в местах расположения периферийного ЛПУ и централизованной лаборатории. Все результаты проверяются на статистическую значимость отличия с использованием известных методов математической статистики. Подчёркивается, что методика может использоваться только тогда, когда эксплуатационные аналитические характеристики аналитической системы для всех методик измерения отвечают требованиям ГОСТ Р 53133.2-2008; а их текущая клиническая приемлемость подтверждается ведением статистического контроля качества в соответствии с указанным стандартом. Используемые в методике алгоритмы расчётов и методы получения оценок клинической приемлемости основаны на извест-

ных методах математической статистики, широко применяемых, в том числе при ведении внутрилабораторного контроля качества. Следует подчеркнуть приоритетность предложенной методики в для получения количественной оценки нестабильности биопроб (фактически – оценки интегрального качества процедур преаналитического этапа лабораторных исследований) в условиях централизации.

В разделе 2 описывается принцип ведения оперативного контроля за тем, что в биопробах, регулярно поступающих в централизованную лабораторию из конкретного ЛПУ, сохраняется допустимый уровень нестабильности аналита. Такой контроль необходим ввиду возможных флуктуаций в процессах взятия биопроб, пробоподготовки, хранения и транспортирования. Предлагается использовать известный метод «по ежедневным средним», т.е. по ежедневно вычисляемым средним значениям результатов пациентов для каждого аналита, поступающего из конкретного ЛПУ. Одновременно в централизованной лаборатории ведётся и оперативный статистический контроль по контрольным материалам. Такое сочетание позволяет, во-первых, дифференцировать ситуации, допускающие выдачу в клинику выполненных анализов от ситуаций, не допускающих такой выдачи, а среди последних ситуаций определять ситуации, связанные: а) с изменением характеристик аналитической системы в централизованной лаборатории и б) с изменением нестабильности биопроб, доставляемых из периферийного ЛПУ. В разделе подробно описан метод «по ежедневным средним», что восполняет недостаточную полноту описания метода в большинстве доступных источников, особенно при использовании карты кумулятивных сумм. В последней части раздела кратко излагается простой и понятный алгоритм установления клинической приемлемости текущих величин нестабильности биопроб, поступающих в централизованную лабораторию из конкретного ЛПУ.

В разделе 3 показано, что одним из результатов практической отработки методики будут рекомендации по выбору оптимальных вариантов программ централизации для конкретного региона, с учётом специфики вовлекаемых в процесс централизации ЛПУ и особенностей их взаимодействия с централизованной лабораторией. Методика позволит объективно оценивать целесообразность участия в программе централизации прежде всего удалённых ЛПУ. На основе анализа организационной структуры здравоохранения в регионах предполагается, что в большинстве регионов будет невозможно создание единой централизованной лаборатории, будут созданы сети из нескольких централизованных лабораторий. Одним из принципов построения таких сетей должен быть выбор мест расположения централизованной лаборатории, позволяющий оптимизировать логистические схемы доставки биопроб, разработанные на основании данных о стабильности биопроб. Убедительно обосновано, что в качестве первоочередных объектов для внедрения методики могут рассматриваться только те лаборатории, в которых стандартизованы все этапы пробоподготовки. Если этот вопрос в регионе ещё не полностью решен, то полученные на первом этапе внедрения методики данные помогут разработать мероприятия по стандартизации преаналитического этапа.

В качестве основного критерия для предварительного отбора аналитов, стабильность которых будет определяться с использованием методики, является

возможность реализации на практике условий сохранности биопроб, указанных в ГОСТ Р 53079.4-2008. Если при доставке биопроб из ЛПУ невозможно обеспечить требуемые время/температуру хранения и гарантировать отсутствие влияния других факторов, это будет являться предпосылкой для экспериментальной проверки стабильности.

В разделе содержатся подробные рекомендации по выбору контрольных материалов, составу выборки проб пациентов и объему исследований для обеспечения необходимой статистической значимости выводов. Приводится предварительный расчет затрат для внедрения методики, при этом показано, что в лабораториях, систематически ведущих внутренний контроль качества и участвующих в федеральной системе внешней оценки качества, существенных дополнительных затрат не потребуется. На этапе оперативного контроля нестабильности биопроб будет достаточно мониторинга статистических параметров, поступающих в централизованную лабораторию биопроб и параметров аналитической системы, эти задачи могут быть автоматизированы с помощью специального компьютерного программного обеспечения (ПО). Это ПО будет выполнено в виде Web-приложения, с которым сможет работать любой имеющий доступ к интернету пользователь. ПО будет позволять выбирать централизованную лабораторию и неограниченное число периферийных ЛПУ, выбирать аналиты, стабильность которых подлежит оценке, описывать и связывать аналитические системы выбранных ЛПУ, чтобы в дальнейшем вести работу в автоматическом режиме. ПО будет содержать информацию по биологическим вариациям аналитов, необходимую для определения допустимых величин нестабильности, алгоритмы расчетов, необходимых для проведения оценок клинической приемлемости величин нестабильности. Кроме того, ПО будет позволять находить и маркировать подлежащие удалению из расчетов выбросы, определять и сравнивать характеристики аналитических систем за выбранный пользователем период. В ПО, наряду с ручным вводом результатов измерений контрольных проб и биопроб, будет предусмотрена возможность автоматической передачи результатов из лабораторных информационных систем конкретных ЛПУ.

Заключение. Все разделы методических указаний имеют четкое логическое построение, все положения подкреплены материалами авторитетных современных источников и математическим аппаратом. В методических указаниях используется современная специальная терминология, содержатся ссылки на современные правовые акты и результаты собственных разработок. Методические указания «Оценка клинической приемлемости величин нестабильности биопроб» (авторы Багаев А.В, Петров С.П., Прищепа М.И.) могут быть рекомендованы к утверждению и публикации и приняты за основу (с учётом региональной специфики) при составлении документов, регламентирующих мероприятия по централизации лабораторных исследований в регионах.

Заведующий кафедрой клинической лабораторной
диагностики ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава РФ,
доктор медицинских наук, профессор

Подпись *Долгов В.В.*
удостоверенно:
Специалист по контролю качества
РМАПО Минздрава России
Подпись *Прищепа М.И.*



В.В. Долгов

ДЛЯ ЗАМЕТОК

ДЛЯ ЗАМЕТОК

