

подтвержденным диагнозом «инфекционная эритема» тестированных в 4 повторах каждый. В ходе испытаний разброс определяемых значений логарифма концентрации ДНК парвовируса В19 нормализованных на концентрации внутреннего контроля составил не более 0,3 lg.

Заключение.

Набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК *Parvovirus B19* в клиническом материале методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией пригоден для использования в клинической лабораторной диагностике.

Набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК *Parvovirus B19* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Parvovirus B19* – FL» (ТУ 9398–084–01897593–2009) зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере здравоохранения и социального развития, Регистрационное удостоверение № ФСР 2009/05502 от 14 августа 2009 года.

ОПЫТ ОРГАНИЗАЦИИ И ПРОВЕДЕНИЯ ВНУТРИЛАБОРАТОРНОГО КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА В ЛАБОРАТОРИИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕТОДОВ ЦЕНТРА МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ФГУН ЦНИИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ

Сафонова А.П., Шипулина О.Ю.

ФГУН «Центральный НИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Качество медицинской услуги рассматривается как степень соответствия потребностям пациента в точной оценке его состояния, установлении диагноза болезни и эффективном лечении. Основными характеристиками качества клинических лабораторных исследований служат аналитическая надежность, клиническая информативность и своевременность предоставления результатов исследования аналитов (врачу или пациенту), соответствующие потребностям клинической диагностики и мониторинга результатов лечения. При осуществлении каждого из этапов и каждой из фаз клинического лабораторного исследования могут проявить свое действие и оказать влияние на конечный результат исследования большой ряд разных факторов – начиная от изменчивости содержания компонентов в

биоматериале в зависимости от подготовки пациента к лабораторному тесту, от условий взятия, хранения и транспортировки образцов биоматериала в лабораторию и заканчивая особенностями методов и средств анализа (пробоподготовка, измерительные приборы и др.).

Для предотвращения влияния различных факторов на этапы клинического лабораторного исследования управление качеством лабораторных исследований предусматривает установление системы общих требований и правил их применения ко всем составляющим качества клинических лабораторных исследований:

- применяемым технологиям (способам взятия биоматериала, методам исследования, методикам выполнения измерений, лабораторным тестам),

- ресурсам, используемым для выполнения (реагентам, калибровочным материалам, оборудованию),

- критериям и способам оценки аналитической надежности, клинической эффективности и соответствия результатов потребностям ведения пациентов.

Качество выполняемых лабораторий исследований отражает конечный результат мер принятых по управлению качеством. Оценка соответствия качества исследований потребностям клинической диагностики, мониторинга и анализа причин несоответствий и источников ошибок является основой для совершенствования деятельности на тех уровнях и этапах управления качеством, где они возникли (использование невалидированных методик, приборов не отвечающих установленным требованиям; некачественные контрольные материалы; недостаточная профессиональная подготовка персонала). Контроль качества должен проводиться оперативно с установленной периодичностью; при изменении аналитических принципов измерения (приборов, реактивов, калибраторов, контрольных материалов и при внедрении новой методики.

Целью процесса проведения внутрилабораторного контроля качества является:

- предупреждение, выявление и устранение недопустимых отклонений от стабильного выполнения исследования в лаборатории, то есть выявление и устранение недопустимых аналитических ошибок (проверка соответствия сходимости и воспроизводимости результатов измерения установленным нормам);

- повышение качества выполняемых исследований, точности их результатов, их диагностической надежности, а также уменьшение потребности в повторных исследованиях проб пациентов. Предотвращение выдачи ложноотрицательных и ложноположительных результатов ПЦР-анализа;



– разработка системы мер по каждому аналиту с целью предупреждения недопустимых отклонений и повышения качества выполняемых исследований.

Материалы и методы. Внутрिलाбораторный контроль можно условно разделить на текущий (ежедневный) и периодический (еженедельный). Ежедневный текущий контроль проведения молекулярно-генетических исследований проводится на всех этапах ПЦР-анализа в каждой постановке для всех видов исследований с обязательным применением следующих контрольных образцов:

– внутренний контрольный образец ПЦР-анализа (ВКО).

ВКО – это препарат ДНК/РНК (экзогенный внутренний контроль), добавленный к каждому исследуемому образцу на этапе пробоподготовки биологического материала или изначально содержащийся в биологическом материале (эндогенный внутренний контроль), который проходит через все стадии ПЦР-анализа. На этапе детекции результат амплификации ВКО позволяет судить о качестве проведения ПЦР-анализа в целом.

– отрицательный контрольный образец этапа экстракции ДНК/РНК (ОКО).

ОКО используется для контроля качества (чистоты) работы лаборантов и реактивов в каждую постановку для всех видов исследований на этапе экстракции ДНК/РНК.

– положительный контрольный образец этапа экстракции ДНК/РНК (ПКО).

ПКО используется для контроля стабильности используемых реагентов и качества работы лаборантов в каждую постановку на этапе экстракции ДНК/РНК.

Для контроля качества (чистоты) работы лаборантов и реактивов в каждую постановку на этапе постановки ПЦР (амплификация) используются отрицательные контрольные образцы (К-).

– Для количественных методов исследований в ПЦР с гибридно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» используются калибраторы (стандарты), количественно охарактеризованные для внутреннего и положительного контроля этапа обратной транскрипции и/или ПЦР-амплификации. Составляются контрольные карты. Контрольная карта – графическое изображение полученных в установочной серии статистических характеристик вариаций аналитической системы, соответствующих требованиям к ее точности. В контрольной карте должен быть указан анализируемый временной период, серия тест-системы и обозначены контрольные пределы для анализируемых образцов.

Для общего контроля работы лаборатории еженедельно через

процедурный кабинет направляются зашифрованные контрольные образцы, которые исследуются как пробы пациентов. Пробы маркируются и аликвотируются, проходя через все стадии внутрилабораторного преаналитического этапа.

Основные требования к организации процесса:

- анализ контрольного материала включается в обычный ход работы лаборатории;
- анализ контрольного материала проводится тем же персоналом, который выполняет лабораторные исследования ежедневно;
- при исследовании контрольного материала используются те же методы исследования, которые лаборатория применяет ежедневно. В нашей работе мы используем панели контрольных образцов «Вирус гепатита С» и «Вирус гепатита В» производства ФГУН ЦНИИ Эпидемиологии.

Для контроля над качественными тестами для диагностики гепатита В и С, а так же для исследования вируса папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска, тестов серии «Флороценоз» («Бактериальный вагиноз», «Микоплазмы», «*Candida albicans/glabrata/krusei*») контрольные материалы готовили самостоятельно из положительных клинических образцов, разведенных до заявленных границ аналитической чувствительности тест-систем. Полученные контрольные образцы промерялись в пятикратных повторях в количественном тесте и выводилась средняя концентрация. Далее образцы аликвотировали по 100 мкл и помещали в пробирки или флаконы соответствующего объема с герметичными крышками, которые хранятся при -20°C для дальнейшего использования. Готовились так же образцы из негативной плазмы, которые использовались для контроля за контаминацией на этапе экстракции при работе с вирусными гепатитами. Эти образцы можно использовать так же и в ежедневном контроле качества.

Для всех контрольных образцов, применяемых в ПЦР-анализе, предъявляются общие требования к стабильности (контрольный образец не должен разрушаться на протяжении срока хранения при надлежащих условиях хранения). Контрольные образцы не должны быть загрязнены продуктами амплификации и препятствовать выделению, амплификации ВКО.

Для контроля за отсутствием контаминации, приводящей к возникновению ложноположительных результатов в лаборатории ежедневно проводится мониторинг загрязнения продуктами амплификации поверхностей в помещениях лаборатории.

Результаты. Проведение внутрилабораторного контроля качества количественных исследований.

Из полученных результатов измерений по контрольным точкам определяемого показателя для каждого значения КМ рассчитывают: среднюю арифметическую величину X_{cp} , среднеквадратическое отклонение S , контрольные пределы (задаются по инструкции к используемой серии реагентов или в качестве контрольного предела использовался интервал 0,3 Lg). Как правило, отклонение от контрольных пределов (более 0,5 Lg) было связано с неправильно заданными значениями калибраторов и, следовательно, общим сбоем во всей постановке; использованием ВКО из других серий тест-систем без введения при оценке результатов поправочного коэффициента и неисправностью в работе амплификатора. Показатель среднеквадратического отклонения S зависит от используемого метода экстракции и качества работы лаборанта.

Отчетные формы проведения ВКК по количественным методам исследований оформляются в виде контрольных карт и хранятся в течение 1 года в электронном виде.

Контроль качества неколичественных исследований проводится путем сопоставления полученного результата исследования контрольного материала результату, заявленному для исследуемого контрольного материала. Для качественных исследований мы оценивали воспроизводимость прохождения контрольных точек в каждом исследовании.

При получении несоответствующих результатов исследований зашифрованных проб и при оценке ежедневного контроля руководство лаборатории разрабатывает корректирующие действия.

Заключение. В лаборатории разработана система внутрилабораторного контроля качества, которая обеспечивает поддержку требуемого качества результатов. Особое внимание уделяется исключению ошибок в процессе регистрации и обработки проб, обработки отчетов о результатах. Система позволяет вычислить (установить) фактическую и возможную неопределенность результатов. Причиной неопределенных результатов могут быть взятие проб, неправильная маркировка, нарушения в процедуре пробоподготовки, некачественные реагенты, невалидированная методика, используемое оборудование, смена оператора, условия окружающей среды.

Список литературы

1. ISO 15189:2007 «Medical laboratories – Particular requirements for quality and competence».
2. ГОСТ Р ИСО 9000-2001 «Системы менеджмента качества. Основные положения и словарь».
3. ГОСТ Р ИСО 15189-2006 «Медицинские лаборатории. Частные требования к качеству и компетентности».

4. Приказ МЗ РФ № 45 от 07.02.2000г. «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации».

5. Приказ МЗ РФ № 220 от 26.05.2003г. «Об утверждении отраслевого стандарта «Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов».

6. Приказ МЗ РФ №380 от 25.12.1997. «О состоянии и мерах по совершенствованию лабораторного обеспечения диагностики и лечения пациентов в учреждениях здравоохранения Российской Федерации».

РАЗРАБОТКА ПАНЕЛИ КОНТРОЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ «ВЫЯВЛЕНИЕ ДНК-ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА» ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ИССЛЕДОВАНИЙ НА НАЛИЧИЕ ДНК-ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА ВЫСОКОГО ОНКОГЕННОГО РИСКА

Сильвейстрова О.Ю., Шипулина О.Ю., Скачкова Т.С.

ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора

Введение. В настоящее время тестирование цервикальных соскобов на вирусы папилломы человека (ВПЧ) высокого онкогенного риска широко применяется в скрининговых программах по профилактике и ранней диагностике рака шейки матки (РШМ). Для этой цели используются ВПЧ-тесты. ВПЧ-тестом называется любой лабораторный тест, предназначенный для выявления ДНК или РНК ВПЧ высокого онкогенного риска, определения концентрации вирусной ДНК или генотипа ВПЧ.

Основная цель ВПЧ-теста как метода скрининга – не пропустить ВПЧ-инфекцию, которая ассоциирована с наличием цервикальной интраэпителиальной неоплазии высокой степени тяжести (ЦИН 2+).

На сегодняшний день два теста – одобренный FDA «Hybrid Capture 2 HPV test» (hc2, Qiagen) и GP5+/6+ EIA test – при проведении рандомизированных контролируемых испытаний на больших когортах, демонстрируют воспроизводимую чувствительность в выявлении ЦИН 2+, которая составляет 90-95%.

В настоящее время сформулированы четкие требования к ВПЧ-тестам, предназначенным для первичного скрининга. Эти требования опубликованы в журнале «International Journal of Cancer» (С. Meijer, J.Berkhof, P. Castle, et al, 2009). Основные пункты требований: