МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР

ПРИКАЗ

23 апреля 1985 г.

N 545

О ДАЛЬНЕЙШЕМ СОВЕРШЕНСТВОВАНИИ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА КЛИНИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

(в ред. Приказа Минздравмедпрома РФ от 19.02.1996 N 60)

В соответствии с приказом Министерства здравоохранения СССР N 380 от 16 апреля 1975 г. в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений внедрен контроль качества клинических лабораторных исследований.

Изучение состояния внедрения контроля качества в практику показало, что в значительной части клинико-диагностических лабораторий систематический контроль качества привел к повышению точности результатов наиболее распространенных биохимических исследований, к повышению их диагностической надежности, к уменьшению потребности в повторных обследованиях больных.

Осуществление Всесоюзным научно-методическим и контрольным центром по лабораторному делу, республиканскими, краевыми и областными организационно-методическими и контрольными центрами по лабораторному делу межлабораторного контроля качества показало действенность его внедрения и способствовало общему подъему уровня деятельности клинико-диагностических лабораторий, о чем свидетельствуют также и результаты, полученные при проведении межлабораторного контроля качества биохимических исследований, осуществляемого ВОЗ и странами - членами СЭВ.

Особенно актуальным является осуществление контроля качества при внедрении методов медицинского микроанализа в практику работы клинико-диагностических лабораторий.

Активно осуществляется контроль качества клинических лабораторных исследований в лечебно-профилактических учреждениях Украинской, Белорусской, Литовской и Молдавской ССР.

Вместе с тем, в ряде областей Российской Федерации, в Азербайджанской ССР внедрение контроля качества лабораторных исследований в клинико-диагностических лабораториях не соответствует должному уровню. Во многих республиканских, краевых и областных организационно-методических и контрольных центрах по лабораторному делу не выделены специалисты, ответственные за осуществление контроля качества лабораторных исследований. Контролю подвергаются преимущественно только результаты биохимических исследований. Отмечается также недостаточное снабжение контрольными материалами.

В целях дальнейшего совершенствования контроля качества клинических лабораторных исследований

Утверждаю:

1. Методические указания по осуществлению межлабораторного контроля качества клинических лабораторных исследований (приложение 1).

2. Методические указания по осуществлению контроля качества гематологических исследований (приложение 2).

3. Методические указания по осуществлению контроля качества исследований мочи (приложение 3).

4. Методические указания по оценке аналитической надежности клинических лабораторных методов исследования (приложение 4).

5. Перечни лабораторных исследований, результаты которых подлежат обязательному контролю качества (приложение 5).

6. Задание на разработку и производство контрольных материалов для клинико-диагностических лабораторий (приложение 6).

Приказываю:

1. Министрам здравоохранения союзных и автономных республик, АМН СССР, заведующим краевыми, областными отделами здравоохранения, начальникам главных управлений здравоохранения Московского, Ленинградского, Киевского и Ташкентского горисполкомов и Московского облисполкома:

1.1. Обеспечить внедрение методических указаний, утвержденных настоящим приказом (приложения 1, 2, 3, 4).

1.2. Принять меры к совершенствованию работы республиканских, краевых и областных организационно-методических и контрольных центров по лабораторному делу, предусмотрев при этом:

- выделение врача-лаборанта, ответственного за работу по контролю качества лабораторных исследований;

- разработку и утверждение в установленном порядке его должностной инструкции, исходя из конкретного содержания, объема и порядка выполнения работ;

- укрепление материально-технической базы республиканских, краевых и областных организационно-методических и контрольных центров по лабораторному делу, улучшение снабжения их аппаратурой с высокой точностью измерения, множительной и вычислительной техникой, реактивами, лабораторными стеклоизделиями, а также необходимыми контрольными материалами.

2. Начальнику Главного управления учебных заведений Минздрава СССР тов. Лакину К.М. в унифицированной программе последипломного обучения врачей по клинической лабораторной диагностике предусмотреть преподавание контроля качества лабораторных исследований в соответствии с приложениями.

3. Главному управлению по производству бактерийных и вирусных препаратов Минздрава СССР (тов. Хлябич Г.Н.) расширить номенклатуру и увеличить объем производимых контрольных материалов для нужд клинико-диагностических лабораторий и организационно-методических и контрольных центров страны в соответствии с приложением 6, обеспечив их аттестацию.

4. Ректору Первого московского ордена Ленина и ордена Трудового Красного Знамени медицинского института им. И.М.Сеченова Минздрава СССР тов. Петрову В.И. представить к 1.06.85 г. в Главное управление лечебно-профилактической помощи Минздрава СССР предложения по созданию референтной лаборатории при Всесоюзном научно-методическом и контрольном центре по лабораторному делу.

4.1. Ученому медицинскому совету Минздрава СССР (тов. Гаврилов О.К.) войти с ходатайством в Государственный комитет СССР по науке и технике о выделении дополнительной численности и необходимого объема ассигнований на создание референтной лаборатории по аттестации лабораторных методов исследования и отечественных контрольных материалов при Всесоюзном научно-методическом и контрольном центре по лабораторному делу Первого московского медицинского института им. И.М.Сеченова.

4.2. Начальнику Планово-финансового управления Минздрава СССР тов. Головтееву В.В. в проекте плана на 1986 г. предусмотреть соответствующее увеличение лимита численности для референтной лаборатории Всесоюзного научно-методического и контрольного центра по лабораторному делу Первого московского медицинского института им. И.М.Сеченова.

5. Всесоюзному научно-методическому и контрольному центру по лабораторному делу (тов. Меньшиков В.В.) расширить разработку методов и средств по контролю качества гематологических, коагулологических и микробиологических исследований.

6. Считать утратившими силу п.п. 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8 и 9 приказа Минздрава СССР N 380 от 16 апреля 1975 г. "О состоянии и перспективах развития лабораторной клинико-диагностической службы в стране" и п. 4 приложения 5.

7. Контроль за исполнением приказа возложить на начальника Главного управления лечебно-профилактической помощи Минздрава СССР тов. Москвичева А.М.

Разрешается размножить приказ в необходимом количестве.

Министр
С.П.БУРЕНКОВ

Приложение N 1
к приказу Минздрава СССР
от 23 апреля 1985 г. N 545

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
ПО ОСУЩЕСТВЛЕНИЮ МЕЖЛАБОРАТОРНОГО КОНТРОЛЯ
КАЧЕСТВА КЛИНИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Утратили силу. - Приказ Минздравмедпрома РФ от 19.02.1996 N 60.

Приложение N 2
к приказу Минздрава СССР
от 23 апреля 1985 г. N 545

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
ПО ОСУЩЕСТВЛЕНИЮ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА
ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

I. Общие положения

Одним из важных условий получения достоверных результатов гематологических исследований является внедрение в практику работы клинико-диагностических лабораторий контроля качества гематологических исследований, который представляет собой эффективную систему повышения качества определений.

При осуществлении контроля качества гематологических исследований следует руководствоваться методическими указаниями по осуществлению контроля качества работы клинико-диагностических лабораторий, которые даны в приложении к приказу МЗ СССР N 380 от 16 апреля 1975 года "О состоянии и перспективах развития лабораторной клинико-диагностической службы в стране".

В связи со спецификой гематологических исследований контроля качества их предполагает наличие определенных контрольных средств и материалов, которые не используются в других видах лабораторных исследований.

Внутри- и межлабораторный контроль качества гематологических исследований осуществляется под методическим руководством Всесоюзного научно-методического и контрольного центра по лабораторному делу, а также республиканских, краевых и областных организационно-методических и контрольных центров по лабораторному делу.

Врачи-лаборанты, выделенные для работы по контролю качества лабораторных исследований, внедряют внутри- и межлабораторный контроль качества в практику работы всех клинико-диагностических лабораторий на установленной территории.

II. Внутрилабораторный контроль качества

Внутрилабораторный контроль качества гематологических исследований может осуществляться с помощью методов, использующих специальные контрольные материалы или средства, и ряда методов, не требующих контрольных материалов:

1. Исследование параллельных проб.
2. Исследование случайных проб.
3. Исследование повторных проб.
4. Исследование смешанной пробы.

5. Метод средней нормальных величин (по данным больных).

6. Межлабораторный контроль качества.

Методы, основанные на использовании специальных контрольных материалов. Методы, использующие специальные контрольные материалы, дают возможность проводить контроль правильности и воспроизводимости результатов гематологических исследований. Основным требованием к контрольным материалам является их стабильность во времени. Приготовление контрольных материалов для гематологических исследований связано с трудностями, обусловленными кратким сроком жизнедеятельности клеток крови вне организма и быстрым нарушением их функциональных и физико-химических свойств в течение времени. По этой объективной причине срок годности контрольного материала ограничен.

В настоящее время рекомендуются следующие контрольные материалы:

1. Стандартный раствор гемиглобинцианида (производство ВНР).
2. Донорская кровь.
3. Раствор гемолизированной крови.
4. Консервированная кровь.
5. Фиксированные клетки крови (суспензия).
6. Клетки синтетических и других материалов, имитирующие клетки крови.
7. Контрольные мазки (окрашенные и неокрашенные, нормальные и патологические).

Контроль воспроизводимости

Контроль воспроизводимости (или сходимости) результатов гематологических исследований осуществляют с помощью контрольных материалов и расчета статистических параметров для оценки качества работы: средней арифметической величины ($\bar{X}$), среднеквадратического отклонения (S) и коэффициента вариации (V). Для этого в течение 20 рабочих дней в контрольном материале исследуют выбранный компонент методом, применяемым в данной лаборатории. Если какой-либо из результатов резко отличается от остальных, то его оценивают с помощью критерия Т.

После установления статистических критериев строится карта контроля качества, представляющая собой систему координат, на оси абсцисс которой откладывают дни исследований, а на оси ординат - концентрацию компонента в соответствующих единицах. Через середину оси ординат параллельно абсциссе проводят прямую (обозначает среднюю арифметическую) и вверх и вниз от средней и параллельно ей проводят в соответствии с выбранным масштабом прямые, которые обозначают контрольные пределы $\bar{X} + 2S$ и $\bar{X} - 2S$.

Контрольная карта строится на каждый компонент и на одну серию контрольного материала. При перемене серии контрольного материала нужно провести 20-дневные исследования и построить новую контрольную карту.

Каждый результат, полученный в дальнейшем при исследовании контрольного материала той же серии в последующие дни, отмечается на карте в виде точки и служит для оценки воспроизводимости результатов данного компонента.

Пример 1. Построение контрольной карты для гемоглобина. В течение 20 дней определения содержания гемоглобина в контрольном растворе получены следующие результаты:

120	122	121	123	120
121	122	123	121	121
123	119	120	118	119
120	119	122	118	119

$n = 20$

$\bar{X} = 120{,}5;\ S = 1{,}6;\ V = 1{,}33\%$

$$X + S = 120,5 + 1,6 = 122,1$$

$$\overline{X} + 2S = 120,5 + 3,2 = 123,7$$

$$\overline{X} - S = 120,5 - 1,6 = 118,9$$

$$X - 2S = 120,5 - 3,2 = 117,3$$

При использовании контрольных карт целесообразно пользоваться предупредительными и контрольными критериями, ориентируясь на которые можно обнаружить недостатки в работе лаборатории.

Контроль правильности

Контроль правильности результатов гематологических исследований осуществляют с помощью контрольных материалов с исследованным содержанием компонентов, расчета статистических параметров и определения достоверности различий между полученным и паспортным значением.

При этом следует сделать 10 параллельных исследований компонента в контрольном материале, рассчитать из полученных результатов среднюю арифметическую величину и сравнить с паспортными данными этого компонента. Если полученный результат укладывается в пределы допустимых отклонений, имеющихся в паспорте контрольного материала, то правильность исследований - удовлетворительная. В противном случае следует оценить достоверность различий результатов с помощью статистических критериев (например, по тесту Стьюдента).

Методы, не требующие контрольных материалов

Исследование параллельных проб позволяет оценить воспроизводимость результатов исследований с помощью образцов крови больных. Для этого отбирают 10 случайных проб и каждую пробу исследуют дважды. Результаты таких дублированных анализов используются для характеристики качества исследований.

Пример 2. Для оценки воспроизводимости результатов подсчета лейкоцитов исследовали параллельно 10 образцов цельной крови с антикоагулянтом. Результаты представлены в табл. 5.

Таблица 5

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОСПРОИЗВОДИМОСТИ С ПОМОЩЬЮ ДУБЛИРОВАННОГО ПОДСЧЕТА КОЛИЧЕСТВА ЛЕЙКОЦИТОВ (10 ПРОБ)

N образца	A	B	A-B	$(A-B)^2$
1	2	3	4	5
1	7.970	7.400	570	324.900
2	9.470	9.230	240	57.600
3	7.410	7.230	180	32.400
4	14.820	15.410	590	345.100
5	3.610	4.690	1.080	1.166.400
6	4.590	6.280	1.690	2.856.100
7	4.490	3.700	790	624.100
8	9.980	10.870	890	792.100
9	14.890	14.260	630	396.900
10	5.240	5.540	300	90.000
				$\text{Сумма } (A-B)^2 = 6.688.600$

S = 578,3

Сначала находят разницу между значениями каждой пары, опуская знаки; затем разницу возводят в квадрат, все складывают и делят на 2n (где n - число пар), так как каждая пара представляет собой индивидуальную переменную и каждый член пары имеет свою собственную вариабельность.

Затем рассчитывают среднеквадратическое отклонение различий и строят контрольную карту для оценки воспроизводимости, аналогичную описанной выше для контрольных проб. Разницу между двумя анализами, сделанными для одной и той же пробы, отмечают каждый день на карте. Контрольные пределы карты - 0 +/- 2S (в примере для подсчета лейкоцитов - от -1,157 до +1,157). Результаты, попадающие вне контрольных пределов, с 95% вероятностью покажут существование каких-то нарушений в аналитической системе. В этом случае выявляют возможную причину большого разброса результатов и исследование повторяют более тщательно.

Исследование случайной пробы. Метод этот аналогичен предыдущему методу параллельных проб. Разница заключается в том, что вместо анализа всех проб лаборант выборочно исследует повторно пробы (одну или две пробы). Эти пробы могут также случайно выбираться заведующим лабораторией без ведома лаборанта. Таким путем зав. лабораторией оценивает воспроизводимость результатов, получаемых лаборантами.

Исследование повторных проб. Принцип метода состоит в повторном исследовании нескольких случайно выбранных проб, число которых пропорционально количеству проводимых исследований.

Сравнивая соответствующие пары результатов, получают объективные данные о качестве проведенных исследований. Повторные исследования проб должны проводиться после выполнения анализов текущего дня.

При применении этого метода 5% образцов должны исследоваться повторно.

Метод повторных определений дает возможность оценить качество работы аппаратуры и лаборанта во время исследований. Метод может использоваться в любой лаборатории вне зависимости от количества производимых анализов. Недостатком его является невозможность контроля правильности полученных результатов.

Пробы, выбранные для повторных исследований, могут исследоваться и на следующий день с целью калибровки аппаратуры. Для консервации клеток крови добавляют ЭДТА из расчета 1-2 мг на 1 мл крови. Хранить пробы необходимо при 4 град. С.

Исследование смешанной пробы. При оценке воспроизводимости методом дублированных проб получают более близкие значения, чем обычно получают при наличии случайных ошибок. В методе смешанной пробы это исключено. Метод состоит в следующем: из группы образцов случайно выбирают два (A и B); из каждого образца A и B берут равные объемы и смешивают (образец C); исследуют все три образца.

Таблица 6

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОСПРОИЗВОДИМОСТИ ПО СМЕШАННЫМ ПРОБАМ

Компонент	A	B	C	$\frac{A + B}{2}$	Различие<*>
Гемоглобин	125	142	130	133,5	3,5
Гематокрит	47	52	50	49,5	0,5

<*> Различие между величиной, полученной в смешанной пробе (C), и теоретической величиной $\frac{A + B}{2}$

Для построения контрольной карты по этому методу рекомендуют проводить исследования смешанных проб в течение 40 дней.

МЕТОД СРЕДНЕЙ НОРМАЛЬНЫХ ВЕЛИЧИН (ПО ДАННЫМ БОЛЬНЫХ)

Метод основан на статистическом анализе результатов проб больных. Предполагается, что средняя величина, полученная по данной методике за один день или за определенное время, при большом объеме работы лаборатории (не менее 30 определений) приблизительно постоянна изо дня в день. Если в выполнении анализа вкрадывается систематическая ошибка, то это выразится в сдвиге средней величины результатов.

Для построения контрольной карты необходимо в течение 20 дней ежедневно рассчитывать среднюю нормальных величин данного компонента, где нормальную область рассматривают в пределах $\overline{X}$+/-2S. Величины, выходящие за эти пределы, отбрасывают. Затем следует рассчитать среднюю и среднеквадратическое отклонение средних за 20 дней и ошибку средних для группы нормальных величин.

Затем рассчитывают контрольные пределы $\overline{X}$ +/- 2m. Выбор пределов 2m, а не 3m, делает метод более чувствительным и увеличивает частоту выявления внеконтрольных величин.

После построения контрольной карты ежедневно находят среднюю нормальных результатов данного компонента и откладывают на карте. Чем больше результат входит в расчет средней, тем более эффективной становится средняя в определении действительной области.

Метод средней нормальных величин дает возможность обнаруживать ошибки, не выявленные другими методами контроля, и является действительным контролем на всех этапах исследования проб больных.

Межлабораторный контроль качества

Лаборатории, систематически участвующие в межлабораторном контроле качества гематологических исследований, могут использовать результаты контроля для оценки качества своей работы. Особенно ценными являются долгосрочные контрольные опыты.

Рассчитанное статически среднеквадратическое отклонение результатов данной лаборатории можно рассматривать как оценку точности в выполнении отдельного теста, а индекс среднеквадратического отклонения (IS) - как отражение способности лаборанта правильно выполнять анализы.

Осуществление контроля качества отдельных гематологических параметров

Контроль качества исследований содержания гемоглобина. Для контроля качества определения гемоглобина используют стандартные растворы гемиглобинцианида с известным содержанием гемоглобина и специальные контрольные растворы (донорская кровь, гемолизированная кровь и консервированная кровь).

Стандартный раствор гемиглобинцианида (производство фирмы "Reanal", ВНР) используют для контроля правильности работы фотометров и построения калибровочной кривой при использовании гемиглобинцианидного метода определения гемоглобина в крови. Определение гемоглобина проводится фотометрическим методом путем определения содержания Hb по калибровочной кривой, выведенной для каждого прибора по серии стандартных растворов гемиглобинцианида с известной концентрацией гемоглобина.

Раствор гемолизированной крови. Для контроля воспроизводимости определения гемоглобина применяют растворы гемолизированной крови. Гемолизаты готовят из донорской крови (цитратной), можно с истекшим сроком годности, человеческой или лошадиной. Гемолизаты являются контролем на весь процесс исследования и используются при определении гемоглобина гемиглобинцианидным методом.

Основными требованиями к гемолизирующим веществам и растворителям являются следующие:

1) они должны быть бесцветными и прозрачными и не вступать в реакцию с красящими веществами крови;

2) величина разведения должна быть под контролем (рекомендуют 1% раствор крови).

Оптически прозрачные растворы готовят при помощи центрифугирования или используя некоторые растворы веществ: 0,1%, 0,25%, 0,4% растворы щелочи, 50% растворы мочевины, раствор сапонина и др. (ГОСТ 4212-76).

Раствор гемолизированной крови стабилен не менее года при условии хранения в холодильнике в темной посуде.

Для оценки воспроизводимости определений гемоглобина гемолизат исследуют в течение 20 дней, из полученных данных рассчитывают $\bar{X}$, S, V, контрольные пределы ($\bar{X}$ +/- 2S) и строят контрольную карту. Коэффициент вариации не должен превышать 5%.

Для использования гемолизата в целях контроля правильности следует установить точную концентрацию гемоглобина в данном гемолизате.

Ограничения применения гемолизата:

1) дефицитность крови,

2) трудоемкость приготовления стерильного и гомогенного раствора в условиях лаборатории.

Для определения количества гемоглобина пользуются также колориметром простейшего устройства - гемометром Сали.

Доводку и коррекцию гемометров Сали производят, определяя одновременно содержание гемоглобина в данной пробе крови спектрофотометрически циангемиглобиновым методом. При этом производят 6 определений: в неразведенной крови и в разведениях 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 и 1:6. Это необходимо потому, что результаты, полученные по методу Сали, не подчиняются закону Ламберта-Бера. Полученные данные наносят на систему координат (на листе миллиметровой бумаги), обозначая на ней также результаты, полученные циангемиглобиновым методом. Построенную кривую используют для вычисления результатов при последующих определениях до новой проверки гемометра. Если нет спектрофотометра, то измерение можно провести и на обычном фотометре, но с меньшей точностью.

Гемометр Сали является аналитически недостаточно надежным, и из-за своего несовершенства является источником многих ошибок.

Контроль качества подсчета клеток крови

К контрольным материалам, применяемым для контроля качества подсчета клеток крови, предъявляется ряд дополнительных требований:

1. Материал должен легко приводиться в гомогенное состояние, не агглютинироваться.

2. Физиологические константы и реологические свойства материала, находящегося в растворе жидкости (вязкость, плотность, индекс рефракции, электропроводность), должны соответствовать этим параметрам в крови, а форма и размер частиц - аналогичным клеткам крови.

3. Контрольный материал должен быть химически инертным.

Методики приготовления контрольных материалов изложены ниже.

Контроль качества подсчета количества эритроцитов

Контроль качества определения эритроцитов с помощью контрольных материалов

осуществляется по принципу опосредованного контроля методом контрольных карт (табл. 7).

В течение 2 дней проводят 20 определений количества эритроцитов в консервированной крови, рассчитывают контрольные пределы и строят контрольную карту. Неудовлетворительная воспроизводимость результатов может быть обусловлена тем, что существуют объективные причины неточностей при определении количества эритроцитов в крови:

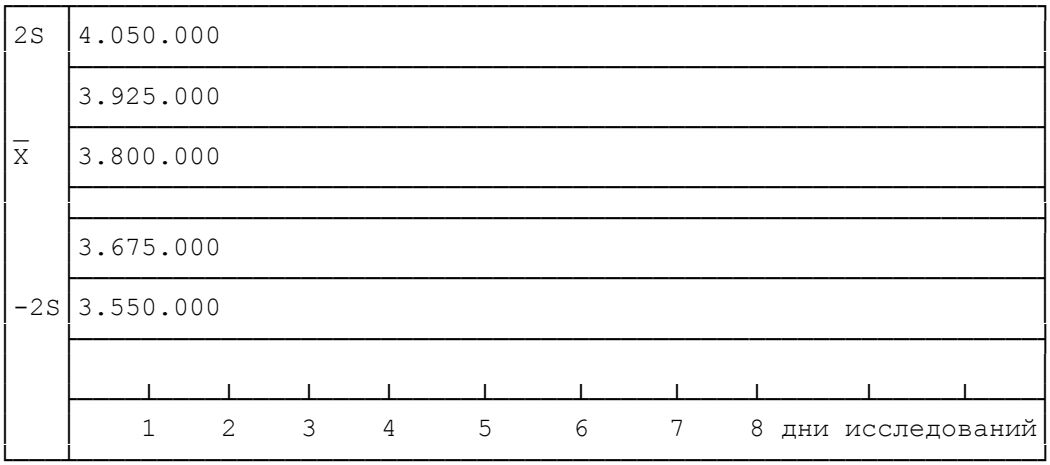
а) статистическая ошибка, обусловленная подсчетом малого количества клеток в крови;

б) распределительная ошибка, обусловленная неравномерным распределением клеток в камере;

в) механическая ошибка, обусловленная техническим несовершенством в устройстве счетной камеры.

Таблица 7

ПРИМЕР РАСЧЕТА
И ПОСТРОЕНИЯ КОНТРОЛЬНОЙ КАРТЫ
ДЛЯ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ПОДСЧЕТА ЭРИТРОЦИТОВ В КРОВИ



$\overline{X}$ = 3.800.000; S = 125.000

$\overline{X}$ + 2S = 3.800.000 + 250.000 = 4.050.000

$\overline{X}$ - 2S = 3.800.000 - 250.000 = 3.550.000

Контроль качества подсчета лейкоцитарной формулы в мазках крови

Необходимой предпосылкой для правильного учета морфологических особенностей клеток крови является удачно сделанный и хорошо окрашенный мазок крови. Невыполнение одного из этих условий ведет к неправильному распределению клеток крови или плохому выявлению их морфологических особенностей, а вместе с тем и к ошибкам в определении. Хорошо сделанный мазок крови должен отвечать следующим условиям:

1. Мазок должен начинаться на 1-1,5 см от узкого края предметного стекла и кончаться в 2-3 см от его другого края. Общая длина мазка должна охватывать 0,5-0,75 площади стекла.

2. Мазок должен быть равномерной толщины, а не волнообразным. Хороший мазок крови толще всего в начале, постепенно утончается и заканчивается в виде следа, как бы оставленного тонкой щеткой.

3. Мазок должен быть "свободным с края". Другими словами, слой крови не должен достигать длинного края стекла, а между ним и краем должно оставаться расстояние в несколько миллиметров.

Мазки, превышающие 3/4 общей длины предметного стекла, очень толсты. Эритроциты в

большей части такого препарата прижаты один к другому или ложатся монетными столбиками. Это мешает правильно исследовать их морфологию. Мазки, короче 1/2 предметного стекла, очень тонки. Лейкоциты отделены друг от друга, сильно деформированы и неправильно распределяются. Отсутствие свободных от крови краев означает, что использованное при приготовлении мазка шлифовальное стекло касалось края предметного стекла. В таких случаях большие клетки перемещаются к краю мазка, и это вызывает неправильное распределение клеток. В неравномерном (волнообразном) мазке распределение клеток крайне неудовлетворительно. Толстые участки содержат больше лимфоцитов, тонкие - больше моноцитов и сегментоядерных клеток.

Для доброкачественного исследования морфологии клеток большое значение имеет правильная его фиксация и окраска.

Источники ошибок

Правильная фиксация мазка придает стойкость форменным элементам крови по отношению к содержащейся в красках воде, которая без фиксации мазка гемолизует эритроциты и изменяет строение лейкоцитов. Фиксация мазка, вызывая коагуляцию белка, прикрепляет препарат к стеклу.

В качестве фиксаторов предложены: метиловый спирт, этиловый спирт, смесь Никифорова, состоящая из равных частей этилового спирта и серного эфира. Лучшим фиксатором является метиловый спирт.

Недостаточная фиксация мазка дает слабую окраску нейтрофильной зернистости лейкоцитов и ведет к некачественной окраске клеток.

Качественная окраска мазка позволяет правильно дифференцировать клетки крови и их структуру при микроскопическом исследовании.

При применении любой методики окрашивания мазка крови важно точно соблюдать методические правила приготовления растворов и временные промежутки в течение процесса окрашивания. При приготовлении растворов необходимо учитывать pH воды; она должна быть нейтральной.

Партии красителя, существующие в продаже, имеют различную интенсивность окраски. Это обязывает опытным путем установить оптимальные концентрацию (разведение) и время окрашивания для каждого флакона красителя, которые устанавливаются путем окрашивания серии препаратов растворами с различной концентрацией красителя, меняя длительность его воздействия.

Для контроля качества подсчета лейкоцитарной формулы в мазках крови используют контрольные мазки. Контрольные мазки готовятся из капиллярной крови доноров и больных обычным способом на предметных стеклах, выполняя требования к правильному приготовлению мазков, фиксируются и окрашиваются. Затем контрольные мазки многократно просчитываются (не менее 20 раз) по 200 клеток квалифицированными специалистами (не менее 5 человек). Из полученных данных статистически рассчитываются критерии определения правильности

подсчета мазка путем расчета $\bar{X}$ и S. Для удлинения срока хранения мазка используют свойства клея БФ-6 образовывать тонкую прозрачную пленку, герметически приклеивающуюся к поверхности мазка и стекла и предохраняющую мазок от воздействия окружающей среды.

Кроме специально приготовленных мазков в качестве контрольных образцов используют мазки, исследованные в данной лаборатории и оказавшиеся наиболее трудными для диагностики. Контрольные образцы, нормальные и патологические, регулярно вводятся в поток клинических образцов, и с их помощью проверяют качество работы каждого сотрудника лаборатории. Подсчет лейкоцитарной формулы считается правильным, если результаты подсчета клеток входят в

рассчитанные контрольные границы $\bar{X}$ +/- 2S для каждого вида клеток крови.

III. Межлабораторный контроль качества гематологических исследований

Межлабораторный контроль качества гематологических исследований осуществляется в соответствии с методическими указаниями (см. приложение 1 к настоящему приказу МЗ СССР).

Межлабораторный контроль качества гематологических исследований осуществляется периодически, не реже одного раза в квартал, под методическим руководством контрольного центра по лабораторному делу республики, края, области.

При межлабораторных экспериментах по контролю качества гематологических исследований можно рекомендовать для контроля следующие параметры:

1) содержание гемоглобина (в нормальной и патологической области концентрации);
2) число эритроцитов;
3) число лейкоцитов;
4) скорость оседания эритроцитов;
5) гематокритная величина;
6) цветовой показатель;
7) подсчет лейкоцитарной формулы.

В качестве контрольного материала при осуществлении межлабораторного контроля качества используют консервированную кровь, фиксированные клетки крови, контрольные образцы мазков крови. Методы их получения и приготовления изложены ниже.

Контрольные пробы рассылают в пузырьках или в запаянных ампулах. Количество материала рассчитывают, исходя из числа участвующих лабораторий и количества контролируемых показателей. Для удобства пересылки мазков по почте мазки готовят на рентгеновской пленке и пересылают в конвертах.

Контрольные мазки, фиксированные, но неокрашенные, рассылают с целью выяснения правильности окраски мазков крови. Окраска мазков производится в лаборатории - участнице межлабораторного эксперимента, а результаты подсчета лейкоцитарной формулы возвращаются в контрольный центр, где оцениваются правильность окраски и подсчета лейкоцитарной формулы.

Оценка результатов участников контроля. После получения результатов контрольных исследований контрольный центр определяет критерии оценки качества исследований и проводит статистическую обработку результатов. Критериями для оценки результатов участников могут служить: статистически обработанные усредненные данные всех участников контрольного эксперимента (при достаточно большом количестве лабораторий - не менее 20).

Количественные параметры (концентрация гемоглобина, величина гематокрита, клетки крови) оценивают статистически. Если результат укладывается в $\bar{X}$ +/- 1,5S, то его считают хорошим, в $\bar{X}$ +/- 2S - удовлетворительным и > $\bar{X}$ +/- 2S - неудовлетворительным.

Для оценки результатов исследования мазков крови пользуются двумя критериями - удовлетворительно и неудовлетворительно. Удовлетворительно следует оценивать правильно подсчитанную лейкоцитарную формулу с описанием измененной морфологии эритроцитов и лейкоцитов.

При исследовании контрольных мазков патологической крови лаборатория должна дать краткое заключение о предполагаемой патологии.

Неудовлетворительным считают исследование при отсутствии описания измененной морфологии эритроцитов, а также если не обнаружен какой-либо вид патологии (палочкоядерный сдвиг, эозинофилия, лимфоцитарная и моноцитарная реакция, сдвиг формулы до миелобластов, наличие бластных форм, плазматических клеток и т.д.).

ФОРМУЛЫ РАСЧЕТА АНАЛИТИЧЕСКОЙ НАДЕЖНОСТИ МЕТОДА

n

$$1)\quad \bar{X} = \frac{\sum_{i=1} X}{n};$$

$$2)\quad S1 = \sqrt{\frac{\sum_{i=1} (X - \bar{X})^2}{n - 1}};$$

$$3)\quad S2 = \sqrt{\frac{\sum_{i=1} d^2}{n}};$$

$$4)\quad V = \frac{S}{\bar{X}} 100\%;$$

$$5)\quad T = \frac{Xi\ max - \bar{X}}{S};$$

$$6)\quad T = \frac{\bar{X} - Xi\ min}{S};$$

$$7)\quad F = \frac{S_1^2}{S_2^2};$$

Xi - результат отдельного определения;

$\bar{X}$ - средняя арифметическая;

Xi max - наибольшее значение ряда результатов;

Xi min - наименьшее значение ряда результатов;

$\sum_{i=1}^{n}$ - знак суммирования;

d - разница между параллельными определениями;

n - число определений;

S - среднее квадратическое отклонение;

V - коэффициент вариации;

T - тест на грубые ошибки;

F - тест оценки вариации методов.

$$8)\quad t = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{\sqrt{m_x^2 + m_y^2}},$$

$\bar{x}$ и $\bar{y}$ - средние арифметические результатов сравниваемых методов;

m - ошибка средней арифметической.

$$9)\quad r = \frac{\sum_{i=1}^{n} (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^{n} (x - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^{n} (y - \bar{y})^2}},$$

x и y - результаты отдельных определений;

$\bar{x}$ $\bar{y}$

x и y - средние арифметические каждого ряда определений;

$(x - \bar{x})$, $(y - \bar{y})$ - отклонения каждого из определений от средней арифметической.

$$10)\ po = 1 - \frac{6 \times \sum_{i=1}^{n} (r_x - r_y)^2}{n(n^2 - 1)};$$

r_x и r_y - ранги ряда "x", "y";

n - число пар сравниваемых величин;

$\sum_{i=1}^{n}$ - знак суммирования.

11) y = a + bx,

x - результаты сравнительного метода;

y - результаты метода-кандидата;

a - значение y при x, равном 0;

b - коэффициент пропорциональности или регрессии.

$$b = \frac{\sum_{i=1}^{n} (xy) - \bar{x} \sum_{i=1}^{n} (y)}{\sum_{i=1}^{n} (x^2) - \bar{x} \sum_{i=1}^{n} (x)},$$

$$Sxy = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (y^2) - [a \sum_{i=1}^{n} (y) + b \sum_{i=1}^{n} (xy)]}{n}}.$$

Методика приготовления контрольных материалов

Контрольный материал, приготовленный по одной из описанных ниже методик, обрабатывают и исследуют так же, как и пробы больных. Ошибки самого исследования нужно отличать от ошибок, присущих материалу. Для этого нужно быть в полной уверенности, что в результате хранения не произошло таких изменений материала, которые превысили бы воспроизводимость самого метода исследования.

Внутрилабораторный контроль воспроизводимости результатов гематологических параметров осуществляется по общепринятому методу контрольных проб с построением контрольных карт и последующим ежедневным откладыванием значений контрольных проб.

Для определения истинных значений числа клеток в контрольных материалах используют прямой подсчет разведенного материала в камере для подсчета клеток. Этот метод является достаточно точным при применении проверенных (откалиброванных) камер и проведении довольно большого числа подсчетов для снижения случайных ошибок исследования. Средняя арифметическая из числа подсчетов является критерием для оценки правильности исследований.

1. Контрольные материалы для исследований гемоглобина

Приготовление раствора гемолизата. Для приготовления гемолизата используют:

1) консервированную человеческую кровь (цитратную), можно с истекшим сроком годности;

2) консервированную лошадиную кровь;

3) донорскую человеческую кровь, свежую, собранную в сосуд с 0,6 моль/л раствором лимоннокислого натрия из расчета 1:5.

200 мл полученной цитратной крови центрифугируют при 3.000 об/мин. в течение 30 мин. Плазму сливают. К эритроцитам добавляют 100 мл стерильной дистиллированной воды и тщательно перемешивают на магнитной мешалке в течение 30 мин. Раствор помещают в холодильник при -20 град.С на 24 часа. На следующий день раствор размораживают и вновь тщательно перемешивают в течение 30 мин.

Затем раствор фильтруют в асептических условиях через стеклянный фильтр millipore (соответствует N 4 - с величиной пор 4-10 мкм - отечественного производства) и разливают в стерильные бутылочки по 1 мл. Хранят раствор в холодильнике, оптимальная температура -20 град.С. Стабилен в течение года.

Гемолизат используется для контроля воспроизводимости результатов определения гемоглобина с помощью контрольных карт. При наличии в лаборатории контрольного материала с известным содержанием гемоглобина в растворе гемолизата можно определить точную величину гемоглобина и использовать для контроля правильности.

При определении концентрации гемоглобина в крови необходимо избегать следующих ошибок.

1. При взятии крови:

а) использование неточно откалиброванных пипеток (0,02 мл),

б) неточное заполнение капилляра кровью,

в) неточное пипетирование физиологического раствора и крови.

2. При разведении:

а) использование неточно откалиброванной пипетки (5,0 мл),

б) недостаточно чистая посуда (следы крови),

в) недостаточное прополаскивание реактивом,

г) неточное пипетирование реактивов,

д) использование старых, неправильно приготовленных реактивов.

3. При измерении:

а) использование неоткалиброванного прибора,

б) использование грязных или непарных кювет,

в) мутность растворенной пробы.

II. Контрольные материалы для подсчета числа эритроцитов

1. Консервированная кровь. Консервированную кровь сохраняют вне организма в течение длительного срока с поддержанием всех биологических и функциональных свойств. Консервированная кровь должна сохраняться без явлений деструкции эритроцитов.

Для приготовления консервированной крови в качестве стабилизаторов используются антикоагулянты, и на основе этих веществ предложены следующие консервирующие растворы (pH растворов доводят до требуемого значения 0,1 моль/л NaOH):

I. 1) Натрий лимоннокислый (цитрат натрия) - 2 г ч, чда.

2) D (+) - Глюкоза - 3,0 г, безводная, ч, чда.

3) Левомицетин - 0,075 г фарм.

4) Бидистиллированная вода - до 100 мл.

pH раствора доводится до 4,5-5,1. Консервированная кровь готовится путем добавления к крови консервирующего раствора в отношении 4:1.

II. 1) Лимонная кислота - 1,0 г, чда, хч.

2) D (+) - Глюкоза - 3,0 г, безводная, ч, чда.

3) Натрий фосфорнокислый трехзамещенный - 0,75 г, ч, чда.

4) Бидистиллированная вода - до 100 мл.

pH раствора доводят до 5,7 (5,5-6,0). Консервированную кровь готовят путем добавления к крови консервирующего раствора в отношении 4:1.

III. 1) Глюкоза - 25 г, безводная, ч, чда.

2) Натрий лимоннокислый - 22 г, чда.

3) Лимонная кислота - 8 г, ч, чда, хч.

4) Бидистиллированная вода - до 1000 мл.

pH раствора доводится до 6,4. Консервированная кровь готовится путем добавления к крови консервирующего раствора в отношении 3:1.

IV. 1) D (+) - Глюкоза - 2,0 г, безводная, ч, чда.

2) Натрий лимоннокислый - 300,0 г., ч, чда.

3) Натрий фосфорнокислый безводный однозамещенный - 0,15 г, ч,

чда.

4) Бидистиллированная вода - до 1000 мл.

pH раствора доводится до 6,9. Консервированная кровь готовится путем добавления к крови консервирующего раствора в отношении 2:1.

V. 1) D (+) - Глюкоза - 20,5 г, безводная, ч, чда.

2) Натрий лимоннокислый - 8,0 г, ч, чда.

3) Лимонная кислота - 0,55 г, ч, чда, хч.

4) Натрий хлористый - 4,2 г, ч, чда, хч.

5. Бидистиллированная вода - до 1000 мл.

pH раствора доводится до 6,1. Консервированная кровь готовится путем добавления к крови консервирующего раствора в отношении 4:1.

В консервированных растворах эритроциты сохраняют свои функциональные и биологические свойства в течение нескольких дней при 20 град.С, а в условиях холодильника - до 20-30 дней.

Суспензия фиксированных эритроцитов. При фиксации эритроцитов происходят физико-химические изменения в мембране эритроцитов, что предохраняет клетки от лизиса. В качестве фиксирующего материала предложены формальдегид, танин, глутаральдегид, ледяная уксусная кислота.

Наибольшее распространение получила методика фиксации эритроцитов глутаральдегидом. После фиксации размер клеток изменяется в течение первых 3-4 дней, затем остается стабильным от нескольких месяцев до нескольких лет.

Методика приготовления. Кровь собирают в сосуд с антикоагулянтом ЭДТА (5 мг сухого ЭДТА на 1 мл крови). Затем трижды промывают изоосмотическим фосфатным буфером. Для этого к собранной крови добавляют раствор буфера в 2 раза больше объема крови и полученную суспензию центрифугируют в течение 10 мин. при 3000 об/мин. Промытые эритроциты фиксируют 0,25% раствором глутаральдегида в фосфатном буфере, который постепенно добавляют к эритроцитам в отношении 1:10 (кровь: фиксирующий раствор). Фиксация производится при комнатной температуре в течение часа. Фиксированные эритроциты трижды промывают дистиллированной водой и доводят до окончательного объема водой или 12,5% раствором глицина. Затем добавляют 3 мл 1% раствора азида натрия. Тщательно перемешивают на магнитной мешалке в течение 30 минут и разливают в стерильные стеклянные пузырьки по 2-5 мл. Хранение проводят при 4 град.С. Перед использованием материал перемешивают на магнитной мешалке в течение 10 мин.

Приготовленную суспензию хранят в темных склянках в холодильнике при 4 град.С. Срок хранения - от 6 месяцев до 1 года. Суспензию используют для контроля качества подсчета эритроцитов автоматическим и камерным методами.

Приготовление изоосмотического фосфатного буфера 154 ммоль/л, pH 7,4:

0,246 г однозамещенного фосфорнокислого калия и 3,187 г двузамещенного фосфорнокислого калия трехводного растворяют дистиллированной водой в мерной колбе на 100 мл.

Ограничения применения консервированной крови и фиксированных клеток крови

1. Дефицитность крови.

2. Фиксированные эритроциты обладают большей вязкостью по сравнению с кровью (прилипают к стенкам и не переходят в состояние суспензии).

3. При фиксировании клеток изменяется их электрический заряд, что влияет на правильность результатов при автоматическом подсчете клеток.

4. Фиксированные клетки более регидны, что затрудняет их прохождение через отверстия анализатора и меняет амплитуды пульсовой волны (при автоматическом подсчете).

5. В первые 3-5 дней происходит уменьшение объема фиксированных эритроцитов, затем их размеры остаются стабильными в течение 6-ти месяцев.

6. Дефицитность реактивов (глутаральдегида и азида натрия).

При подсчете количества клеток крови следует избегать следующих ошибок.

1. При взятии крови:

а) использование неточно откалиброванных пипеток;

б) неточное пипетирование и разведение крови,

в) недостаточно быстрый забор крови и размешивание ее с реактивом для разведения.

2. При разведении:

а) неточное пипетирование реактива для разведения,

б) использование грязной посуды и пипеток,

в) использование неточно откалиброванных пипеток,

г) использование некачественного реактива для разведения, вызывающего гемолиз эритроцитов.

3. При измерении:

а) несоблюдение правил подготовки счетной камеры,

б) несоблюдение временных промежутков при подсчете количества эритроцитов в камере, необходимых для оседания клеток на сетку,

в) нетщательное перемешивание крови перед заполнением камеры,

г) подсчет клеток в недостаточном количестве квадратов и несоблюдение правил подсчета,

д) использование неоткалиброванного прибора при автоматическом подсчете клеток.

Метод сохранения мазков для многократного микроскопирования

К 0,5 мл клея БФ-6 прибавляют 3 мл абсолютного спирта, 3 мл бутилового спирта и тщательно перемешивают до получения прозрачной жидкости с желтоватым оттенком. Хранят в склянке с хорошо притертой пробкой.

На предметное стекло с мазком наносят пипеткой большую каплю пленкообразующей смеси и, покачивая стекло, дают ей равномерно растечься по его поверхности. Избыток смеси с края стекла удаляют и препарат кладут на горизонтальную поверхность для высушивания. При комнатной температуре пленка высыхает за 15-20 мин. Для ускорения сушки мазок можно поместить в термостат при 60 град.С.

Начальник
Главного управления
лечебно-профилактической помощи
А.М.МОСКВИЧЕВ

Приложение N 3
к приказу Минздрава СССР
от 23 апреля 1985 г. N 545

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
ПО ОСУЩЕСТВЛЕНИЮ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ИССЛЕДОВАНИЙ МОЧИ

I. Общие положения

При осуществлении контроля качества исследований мочи следует руководствоваться "Методическими указаниями по осуществлению контроля качества работы клинико-диагностических лабораторий" (приложение к приказу МЗ СССР N 380 от 16 апреля 1975 г. "О состоянии и перспективах развития лабораторной клинико-диагностической службы в стране").

Степень точности получаемых результатов исследований мочи, в основном, зависит от квалификации лаборанта, используемого оборудования, реактивов и метода исследования.

Для получения правильных и воспроизводимых результатов исследования химического состава мочи используют контрольные материалы, близкие по возможности к образцам мочи пациентов, и контрольные мазки для контроля качества микроскопических исследований осадка мочи.

Концентрация исследуемых веществ в контрольном материале должна соответствовать практической чувствительности используемого метода исследования.

Контрольные материалы с высокими концентрациями веществ могут давать положительные реакции даже с испорченными реактивами или полосками с экспресс-тестами, а одной из важных задач контроля исследования мочи как раз и является выявление даже незначительной потери в чувствительности исследуемого метода (особенно при качественных пробах).

В качестве контрольных материалов для контроля химического состава мочи используют:

1. Водные растворы веществ.
2. Слитую мочу с консервантами.
3. Искусственные растворы мочи с добавками веществ, исследуемых в моче.

Методики приготовления контрольных материалов даны ниже.

Контрольные препараты для микроскопии осадков мочи должны содержать встречающиеся в моче соли, полиморфные эпителиальные клетки, различные виды цилиндров, лейкоциты, эритроциты, болезнетворные и неболезнетворные бактерии, грибы, паразиты животных. Кроме того, целесообразно иметь препараты с осадками мочи, характерными при некоторых наиболее распространенных заболеваниях.

Кроме использования контрольных материалов применяют методы контроля, приведенные в приложении 2 к настоящему приказу.

II. Методика приготовления контрольных материалов

1. Приготовление водных растворов веществ.

1.1. Назначение.

Водные растворы веществ с известным содержанием используются для контроля качества исследований (определения или обнаружения) химического состава мочи (например, раствор глюкозы, мочевины, альбумина).

1.2. Реактивы.

Используют реактивы квалификации хч и чда.

Для приготовления растворов реактивов используют дистиллированную воду, соответствующую ГОСТ 6709-72.

1.3. Методы исследования.

Используют методы, обычно применяемые в лаборатории (качественные и количественные) для определения соответствующих веществ.

1.4. Способ приготовления.

Правила приготовления водных растворов веществ приведены в руководствах по технике лабораторных работ и в методических указаниях по применению унифицированных клинических лабораторных методов исследования.

1.5. Условия хранения, срок годности.

Водные растворы хранят в холодильнике. Для увеличения срока годности к некоторым

растворам добавляют азид натрия.

2. Приготовление слитой мочи.

2.1. Назначение.

Слитая моча используется в качестве контрольного материала для контроля качества исследований химического состава мочи.

2.2. Реактивы.

1. Слитая человеческая моча, 1 л.

2. ЭДТА, хч, 2,0 г.

3. Изопропиловый спирт, хч, 1 л.

4. Раствор тимола, 5 мл (100 г тимола растворяют в 1 л изопропилового спирта).

2.3. Методы исследования.

Используются обычно применяемые в лаборатории методы для качественного и количественного исследования химического состава мочи.

2.4. Способ приготовления

К 1 л свежей человеческой мочи добавляют 2 г этилендиаминтетраацетата натрия (ЭДТА) и при энергичном встряхивании и перемешивании флакона приливают 5 мл раствора тимола. Через 2 недели мочу центрифугируют для удаления слизи и незначительного количества мочевой кислоты. После такой обработки моча становится прозрачной и почти не имеет запаха.

2.5. Условия хранения, срок годности.

Контрольный материал хранят при комнатной температуре. Срок годности - несколько лет.

3. Приготовление контрольных растворов, имитирующих мочу.

3.1. Контрольный раствор N 1.

3.1.1. Назначение.

Применяется в качестве контрольного материала для контроля качества исследований химического состава мочи.

3.1.2. Реактивы

1. Натрий хлористый ч, чда, хч.

2. D (+) - Глюкоза, безводная, ч, чда.

3. Мочевина ч, чда.

4. Ацетон ч, чда.

5. Цельная кровь с величиной гематокрита 40-45.

6. Белок сыворотки крови. Используют сыворотку пациента с исследованным содержанием общего белка или контрольную сыворотку.

7. Хлороформ, фарм.

3.1.3. Методы исследования.

Используются методы качественного исследования химического состава мочи.

3.1.4. Способ приготовления.

В круглодонную колбу вместимостью 2 л вносят 10 г хлористого натрия, 10 г мочевины, 1 г глюкозы и 4 мл ацетона (табл. 8). Приливают 500 мл воды и перемешивают до полного растворения солей. Микропипеткой вносят 0,2 мл цельной крови, 0,8 г белка сыворотки крови. Для расчета необходимого количества сыворотки используют формулу:

$$\text{объем сыворотки} = \frac{100 \times 0,8}{\text{содержание белка в используемой сыворотке}}$$

Например, если используемая сыворотка содержит 7,5 г/л общего белка, то объем сыворотки, содержащей 0,8 г белка, будет равен:

$$\frac{100 \times 0,8}{7,5} = 10,7 \text{ мл.}$$

Затем доводят объем дистиллированной водой до 2 л и хорошо перемешивают. Для консервации в полученный раствор добавляют 5 мл хлороформа.

3.1.5. Условия хранения, срок годности.

Раствор хранят при комнатной температуре в посуде с притертой пробкой.

Срок годности - около года.

Таблица 8

ПЕРЕЧЕНЬ
ДОБАВЛЯЕМЫХ ВЕЩЕСТВ И ИХ КОНЦЕНТРАЦИЯ
В КОНЕЧНОМ РАСТВОРЕ

Вещество	Добавляемое количество вещества	Концентрация вещества в контрольном растворе
NaCl	10,0 г	-
Мочевина	10,0 г	83 ммоль/л
Глюкоза	1,0 г	2,775 ммоль/л
Белок	0,8 г	0,4 г/л
Гемоглобин (скрытая кровь)	200 мкл	полож.
Ацетон	4 мл	полож.

3.2. Контрольный раствор N 2.

3.2.1. Назначение.

Применяется в качестве контрольного материала для контроля качества исследований химического состава и микроскопического исследования осадка мочи.

3.2.2. Реактивы.

1. Калий фосфорнокислый однозамещенный (KH2PO4), хч, 0,37 моль/л.

2. Натрий фосфорнокислый двузамещенный (Na2HPO4 x 7H2O), чда, 0,19 моль/л.

3. Сыворотка крови с нормальным содержанием белка.

4. D (+) - Глюкоза, безводная, ч, чда.

5. Ацетон, ч, чда.

6. Гемолизат. К эритроцитарной массе добавляют равный объем дистиллированной воды и тщательно перемешивают.

7. Фиксированные эритроциты.

8. Фиксированные лейкоциты светлого слоя кровяного сгустка.

9. Фиксированные непатогенные E. coli.

10. Фиксированные клетки дрожжей.

11. Фиксированные сперматозоиды.

12. Кристаллы цистина. Получают путем перекристаллизации из химически чистого порошка L-цистина.

13. Кристаллы триппельфосфатов. Получают из осадков проб мочи больных.

14. Кристаллы оксалата кальция. Получают из осадков проб мочи больных.

15. Натрий хлористый, ч, чда, хч, 145 ммоль/л.

16. Формалин, фарм.

3.2.3. Методы исследования.

Используют методы исследования химического и микроскопического состава мочи.

3.2.4. Способы приготовления.

В мерную колбу на 100 мл вносят: 12,2 мл KH2PO4, 11,6 мл Na2HPO4 x 7H2O, 5 мл сыворотки крови с нормальным содержанием белка, 1,0 г глюкозы, 0,5 мл ацетона, 0,1 мл гемолизата и доливают дистиллированной водой до метки. Перемешивают до полного растворения и замораживают.

Для получения осадка в контрольный раствор добавляют соответствующие компоненты, которые предварительно фиксируют.

Метод фиксации.

Каждый компонент, добавляемый для образования осадка, промывают в холодном физиологическом растворе и смешивают с раствором водного формалина с физиологическим раствором (10,0 мл формалина + 0,85 г NaCl и доливают дистиллированной водой до 100,0 мл). Фиксацию проводят в течение 12 час.

В контрольный раствор добавляют от 1,0 мл до 5,0 мл фиксированного материала.

3.2.5. Условия хранения, срок годности.

Контрольный раствор хранят при -20 град.С.

Срок хранения - до 3 месяцев.

3.3. Контрольный материал N 3.

3.3.1. Назначение.

Используют для контроля качества диагностических полосок.

3.3.2. Реактивы.

1. Глюкоза (для инъекций в/в).

2. Ацетон, ч, чда.

3. Слитая человеческая сыворотка.

4. Цельная кровь. К 0,1 мл цельной крови добавляют 0,1 мл дистиллированной воды для лизиса эритроцитов.

5. Соляная кислота 0,1 моль/л.

6. Натрий хлористый, ч, чда, хч, 152 ммоль/л.

3.3.3. Методы исследования.

Используются диагностические полоски и качественные пробы.

3.3.4. Способ приготовления.

В мерную колбу на 500 мл с 200 мл дистиллированной воды добавляют 5 мл глюкозы, 2 мл ацетона, 25 мл слитой человеческой сыворотки и 0,1 мл лизированной крови. Тщательно перемешивают и доводят объем до метки физиологическим раствором. Используя 0,1 моль/л HCl, величину pH доводят до желаемой величины (6,0).

3.3.5. Условия хранения, срок годности.

Контрольный раствор хранят в холодильнике.

Срок годности - более одного месяца.

4. Приготовление сливной мочи для токсикологических исследований.

4.1. Назначение.

Применяется в качестве контрольного материала для контроля качества токсикологических исследований в моче.

4.2. Реактивы.

1. Сливная моча. Отбирают пробы мочи пациентов (не курящих и не принимающих лекарств) и собирают слив, объемом до 10 л. Для исключения посторонних примесей сливную мочу фильтруют через стеклянную вату. Хранят при 4 град.С - 7 град.С.

2. Морфин гидрохлорид, фарм.

3. Кодеин сульфат, фарм.

4. Хинин гидрохлорид, фарм.

5. Метадон гидрохлорид, фарм.

6. Фенобарбитал натрия, фарм.

7. Глютетимид, фарм.

8. Амфетамин, фарм.

9. Абсолютный спирт.

4.3. Методы исследования.

Используются обычно применяемые в лаборатории методы исследования токсикологических веществ в моче.

4.4. Способы приготовления.

Часть собранной сливной мочи исследуют на содержание наиболее часто употребляемых лекарств. Сливную мочу используют только в случае отрицательной реакции. Затем к моче добавляют по 20,0 мг морфина гидрохлорида, кодеина сульфата, хинина гидрохлорида, метадона гидрохлорида, фенобарбитала натрия и глютетимида, а также 30,0 мг амфетамина. Перед

добавлением в слив глютетимид нужно растворить в 3 мл абсолютного спирта. Хорошо перемешать и разлить по 10-15 мл в пузырьки.

4.5. Условия хранения, срок годности.

Сливную мочу хранят при -20 град.С.

Срок годности - около 8 месяцев.

Для использования в качестве контрольного материала сливную мочу оттаивают и исследуют вместе с пробами больных.

III. Некоторые источники ошибок при исследовании мочи

1. При определении относительной плотности урометром:

1.1. Сосуд, содержащий мочу, должен быть достаточного размера, чтобы урометр свободно плавал в нем. В противном случае результат будет неправильным.

1.2. Пока идет считывание результатов, урометр не должен прикасаться к стенкам или дну сосуда. Если мочи недостаточно для свободного перемещения урометра, ее разводят дистиллированной водой в 2-3 раза, определяют относительную плотность и умножают на степень разведения.

1.3. При определении относительной плотности большое значение имеет температура окружающей среды и исследуемой пробы, так как урометры приспособлены для измерения при определенной температуре (15 град.С, 20 град.С, 22,5 град.С), обозначенной на приборе. Любое отклонение температуры окружающей среды от обозначенной приводит к изменению объема мочи, а также ее концентрации и относительной плотности.

Это обстоятельство нужно иметь в виду и в случае надобности вносить соответствующую коррекцию на температуру.

Точность этого метода для клинических целей достаточна, если только пользоваться проверенными урометрами.

2. При определении относительной плотности на рефрактометре:

2.1. Так как показатель преломления измеряется оптически, то призма и камера должны быть совершенно чистыми и без царапин. После каждого использования обе части промывают дистиллированной водой и протирают досуха мягкой неворсистой тканью. Нельзя использовать газ для сушки. Для предохранения от пыли прибор нужно держать под чехлом.

2.2. Измерить показатель преломления 5 +/- 0,01% раствором хлористого натрия. Показатель должен быть равен 1,3415 +/- 0,0005 или по шкале относительной плотности - 1,022 +/- 0,001.

3. При обнаружении белка методами, основанными на осаждении белков, необходимо соблюдать правила, нарушение которых приводит к значительным ошибкам при исследовании.

3.1. Исследуемая моча должна иметь кислую реакцию. При щелочной реакции мочу слегка подкисляют уксусной кислотой. Исследование пробы со щелочной мочой в тех случаях, когда в качестве реактива используется кислота, может привести к нейтрализации кислоты и к отрицательному результату при положительной реакции.

3.2. Исследуемая моча должна быть прозрачной. Мутность необходимо предварительно удалить каким-нибудь способом, не вызывая осаждения белка. При исследовании пробы с мутной мочой нет возможности ясно разграничить ранее имевшуюся мутность от получившейся при осаждении белков.

4. При исследовании скрытой крови.

Подобный гемоглобину эффект дают хлорофилл, миоглобин, препараты железа и другие случайные примеси, в особенности соли тяжелых металлов (хрома, меди и т.д.). Поэтому необходимо при работе употреблять абсолютно чистую посуду и реактивы. Ложноположительная проба получается после приема солей иодистого и бромистого калия. Наличие этих солей в моче можно узнать по синей окраске, появляющейся при смешивании мочи с уксусной кислотой, перекисью водорода и с раствором крахмала. В моче, содержащей много лейкоцитов, можно получить ложноположительную реакцию, поэтому такую пробу исследуют после предварительного нагревания мочи для инактивации ферментов гнойных клеток. Моча, которую исследуют на кровь, должна быть свежей. При стоянии гемоглобин превращается в метгемоглобин, который не имеет псевдопероксидазного действия и дает отрицательные пробы.

5. Влияние консервантов на результаты исследования мочи.

Перед использованием какого-либо консерванта следует иметь ввиду следующие их особенности:

Хлороформ осаждается на дно пробирки и мешает исследованию осадка, кроме того он может восстанавливать медь и, тем самым, искажать результат определения сахара.

Тимол в количестве 0,1 г на 100 мл мочи не обладает такими отрицательными качествами и, вместе с тем, сохраняет мочу на несколько дней, но прибавленный в большом количестве, он может помешать кольцевой реакции на белок и реакции на индикан.

Прибавление борной кислоты отражается на определении сахара. Формальдегид в количестве 2-3 капель очень удобен как консервант для изучения осадка, но в большем количестве сам дает осадок, и, кроме того, мешает определению белка, сахара и индикана.

Карболовая кислота затрудняет определение ацетона.

Толуол - самое удобное средство для предохранения мочи - прибавляют в таком количестве, чтобы на всей поверхности мочи плавал тонкий его слой.

Начальник
Главного управления
лечебно-профилактической помощи
А.М.МОСКВИЧЕВ

Приложение N 4
к приказу Минздрава СССР
от 23 апреля 1985 г. N 545

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОЦЕНКЕ АНАЛИТИЧЕСКОЙ НАДЕЖНОСТИ КЛИНИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРНЫХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ (ДЛЯ РЕСПУБЛИКАНСКИХ, КРАЕВЫХ И ОБЛАСТНЫХ ОРГАНИЗАЦИОННО-МЕТОДИЧЕСКИХ И КОНТРОЛЬНЫХ ЦЕНТРОВ ПО ЛАБОРАТОРНОМУ ДЕЛУ)

Одним из важнейших направлений развития клинической лабораторной диагностики как научной дисциплины является расширение методических возможностей путем совершенствования аналитических методов, препаративных и измерительных приборов.

Качество результата лабораторного исследования зависит от многих факторов, среди которых важное значение имеет качество метода.

Для объективной оценки аналитических качеств метода рекомендуется оценка его аналитической надежности.

В отличие от системы контроля качества работы лабораторий, которая должна давать ежедневную информацию о качестве получаемых в лаборатории результатов, оценка аналитической надежности метода - продолжительный процесс, во время которого постепенно накапливается информация об аналитических качествах метода.

При оценке надежности метода задача состоит в выявлении погрешностей, зависящих от метода; поэтому важно оценку надежности метода проводить не в одной, а в нескольких точно работающих (референтных) лабораториях с соблюдением всех указаний по применению метода.

Количественные аналитические методы клинических лабораторных исследований разнообразны, поэтому описываемые способы оценки надежности метода могут быть пригодны не для всех методов. Оценке аналитической надежности должны подвергаться методы, которые рекомендуются для официального утверждения, новые методы и методы, существенно модифицированные.

КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ АНАЛИТИЧЕСКОЙ НАДЕЖНОСТИ МЕТОДА

Основными критериями, по которым оценивается метод, являются следующие: воспроизводимость, правильность, специфичность, чувствительность.

I. Воспроизводимость

Воспроизводимость результатов - соответствие результатов повторных определений в одном и том же материале. Воспроизводимость не имеет числовой величины, она определяется степенью разброса результатов.

Воспроизводимость аналитического метода - определяется воспроизводимостью результатов, полученных этим методом, с учетом воспроизводимости в серии, во времени и межлабораторной воспроизводимости.

Понятие, обратное воспроизводимости, - разброс результатов, или аналитическая вариация, - зависит от наличия случайных погрешностей и может быть охарактеризовано количественно. Воспроизводимость рассчитывается либо по двум параллельным результатам при исследовании различных образцов, либо по результатам повторных определений на одном и том же контрольном материале. Контрольный материал должен быть стабильным в течение всего периода проверки.

Статистическим показателем разброса результатов является среднеквадратическое отклонение S и относительный показатель разброса результатов - коэффициент вариации V. Сравнивают аналитическую вариацию метода с помощью F-теста. (Формулы 1-7).

Воспроизводимость метода может зависеть от концентрации исследуемого компонента; поэтому S определяется на разных уровнях концентрации - нормальном и патологическом. Это позволяет более полно охарактеризовать воспроизводимость метода на всем диапазоне определяемых концентраций.

Чем меньше коэффициент вариации, тем выше воспроизводимость результатов, получаемых тем или иным методом.

Такой способ оценки воспроизводимости позволяет объективно оценивать и сравнивать воспроизводимость различных методов. Воспроизводимость метода обычно зависит от случайных погрешностей, обусловленных количеством процедур метода - осаждение, центрифугирование, пипетирование, а также стабильностью окрашенного комплекса и другими причинами. Для более правильной оценки воспроизводимости метода количество параллельных исследований не должно быть меньше 20. С увеличением количества исследований (n) точность расчета среднеквадратического отклонения возрастает. При этом погрешности, связанные с работой, должны быть сведены к минимуму и, по возможности, условия работы не должны меняться в течение всего периода исследования.

II. Правильность

Правильность результатов - соответствие среднего значения результатов повторных определений одного и того же материала с должной величиной. Правильность не имеет числовой величины, она определяется неправильностью.

Правильность метода определяется правильностью результатов, полученных этим методом.

Правильность зависит от наличия систематических погрешностей метода.

Систематическая погрешность метода может быть обусловлена рядом причин: неспецифичностью метода, и тогда она определяется как постоянная систематическая погрешность; или неправильным способом построения калибровочной кривой, использованием калибровочного материала недостаточной степени чистоты, неправильной постановкой холостой пробы, и тогда она определяется как пропорциональная систематическая погрешность метода.

Постоянная и пропорциональная погрешности составляют общую систематическую погрешность метода.

Статистическим критерием правильности является средняя

арифметическая ($\bar{X}$) и степень ее отклонения от истинного (номинального) значения мю. Способами определения правильности могут быть:

способ добавки - внесение в биологическую жидкость точно взвешенного количества анализируемого вещества и определение его с помощью исследуемого метода;

способ смешивания проб - биологическая жидкость с низкой и с высокой концентрацией исследуемого вещества смешивается в различных соотношениях.

Способ добавки и смешивания проб (последний может быть применим в методах определения активности ферментов, где невозможно использовать способ добавки) позволяют определить только пропорциональную систематическую погрешность метода. Например, добавленное количество креатинина, определенное по реакции Яффе, может дать хороший процент выявления, однако методы, основанные на реакции Яффе, дают неправильные результаты за счет низкой специфичности метода. Процент выявления вещества, равный 90-110%, считается удовлетворительным для клинических лабораторных методов исследования.

Исследование контрольного материала с известным содержанием компонентов - наиболее простой способ оценки правильности. Однако, он может быть использован только для быстрой ориентировочной оценки правильности метода. Обязательным условием, ограничивающим возможности этого способа является использование метода, который указан в аннотации к контрольному материалу. Процедура изготовления контрольного материала, хранение его, вид используемой сыворотки могут в значительной степени изменить истинное содержание компонента. Особенно большим изменениям могут подвергнуться ферменты.

Сравнение методов. Наиболее информативным способом является способ сравнения методов. Данный способ позволяет определять общую систематическую погрешность метода. Смысл сравнения методов состоит в сравнении результатов, которые получены методом - кандидатом (т.е. методом, правильность которого исследуется) и сравнительным методом, который должен давать правильные результаты. Поэтому крайне важным является правильность сравнительного метода.

Международной федерацией клинической химии и Рабочей группой экспертов стран - членов СЭВ (Компендиум методорум по лабораторной диагностике) введено понятие - референтный метод.

Референтный метод - это метод, обладающий максимальной специфичностью, правильностью и воспроизводимостью результатов измерения. Он служит главным образом для сравнения методов при оценке аналитической надежности унифицированных и других методов.

Однако, референтные методы могут быть недоступны лабораториям, и для ряда компонентов они еще не разработаны. Поэтому в качестве сравнительных могут использоваться методы, правильность которых исследована, и которые не дают существенного отклонения от истинных величин.

Для более точной оценки правильности предлагаемого метода сравнение методов следует проводить в соответствии с правилами сравнения методов.

Правила сравнения методов предусматривают:

1) точное соблюдение всех письменных указаний по применению метода;

2) проведение исследований под контролем качества с применением единого контрольного материала для гарантии стабильности условий исследования за время всего периода сравнения методов;

3) в сравниваемых методах должны быть проверены точность и линейность калибровочных кривых;

4) за время всего периода сравнения методов должны, по возможности, применяться одни и те же реактивы, приборы; работа проводится одними и теми же лаборантами;

5) правильность метода должна оцениваться на всем диапазоне измеряемых концентраций; поэтому должны быть исследованы образцы с низкими, нормальными и повышенными концентрациями вещества;

6) сравнение методов проводится на контрольном материале и на биологическом материале, полученном от больных и здоровых лиц;

7) очень важным является выбор метода для сравнения. Статистическая обработка результатов состоит в оценке степени совпадения результатов, полученных методом-кандидатом и сравнительным методом.

В отличие от воспроизводимости, оценка правильности результатов - значительно более сложная задача.

Для статистической обработки результатов могут применятся различные статистические тесты.

Ниже приводится статистический способ оценки результатов сравниваемых методов, не требующий специальной вычислительной техники и позволяющий судить о правильности метода-кандидата.

Статистическая оценка правильности результатов сравниваемых методов

Для оценки правильности определяются: достоверность различий результатов и наличие статистической связи.

Определение достоверности различий результатов

Определить достоверность различий результатов можно с помощью теста Стьюдента (формула 8).

Наиболее достоверные результаты тест Стьюдента дает при нормальном распределении результатов.

Поэтому в тех случаях, когда распределение результатов не является нормальным, или вид распределения невозможно определить из-за малого числа наблюдений, рекомендуется использовать непараметрические критерии - критерий знаков, тест Вилкоксона.

Преимуществом непараметрических критериев является их независимость от вида распределения результатов и простота расчета.

Критерий знаков эффективен при большом числе определений. Он учитывает не степень различий в каждой паре, а лишь их направленность (знак) и основан на подсчете числа разностей между результатами X и Y со знаком + или -.

Если число наблюдений невелико, и критерий знаков не выявил различий, целесообразно применить критерий Т-парный критерий Вилкоксона. Критерий Т более чувствителен, он основан на следующем приеме: вычисленным разностям между двумя рядами результатов (X и Y) дают ранговые номера в порядке возрастания абсолютных значений разности (без учета ее знака). Совпадающим значениям дают ранговые номера, равные средним из их порядковых значений. Например, одинаковые разности, стоящие на 3-м и 4-м местах, получают ранг 3,5. Далее вычисляется величина Т, равная сумме ранговых номеров разностей, имеющих отрицательное значение (т.е. разностей, противоположных наблюдаемым в большинстве).

Таблица 9

Пример расчета критерия Т-Вилкоксона

NN п/п	Результаты ряда X	Результаты ряда Y	Разность	Ранговый номер разности
1	107	88	19	6,5
2	93	74	19	6,5
3	121	92	29	8
4	85	72	13	4
5	89	90	-1	1
6	110	108	2	2
7	81	67	14	5
8	102	110	-8	3

T = 1 + 3 = 4

Заключения строятся на достигнутом уровне значимости.

Для целей лабораторной диагностики достаточным является уровень значимости P = 0,05. Полученные значения сравнивают с табличными. Если P < 0,05, то различия между методом-кандидатом и сравнительным методом достоверны, т.е. метод-кандидат - неправильный. Если P > 0,05, то различия на достигнутом уровне значимости не достоверны, т.е. метод-кандидат может быть правильным. Дальнейшая обработка результатов состоит в оценке статистической связи.

Оценка статистической связи

Для оценки статистической связи можно использовать корреляционный метод и метод регрессии. Корреляционный метод менее информативен, чем метод регрессии.

Корреляционный метод. Корреляция указывает на степень связи двух рядов чисел, т.е. изучается зависимость между результатами X и Y двух методов. Для определения корреляции рассчитывают обычный коэффициент корреляции r и коэффициент ранговой корреляции ро, при расчете которого результаты оцениваются порядковыми номерами - рангами от меньших результатов к большим. Порядковый номер каждого результата является его рангом.

Формулы расчета коэффициента корреляции 9 и 10.

Коэффициенты корреляции могут колебаться от 0 до +1 при положительной корреляции и от 0 до -1 - при отрицательной корреляции.

Если имеется хорошее совпадение результатов сравниваемых методов, то значение r будет около 1,0 (0,9-0,99). Чем ниже величина коэффициента корреляции, тем меньше степень совпадения результатов сравниваемых методов. При отсутствии связи между результатами r = 0. При отрицательной корреляции, при изменении результатов группы "X", результаты группы "Y" будут изменяться в противоположном направлении: r = -1.

Метод регрессии. Если корреляция указывает на степень связи, то регрессия позволяет определить, как количественно меняется один результат по мере изменения другого.

Для построения эмпирической линии регрессии на диаграмму наносят парные результаты в виде точек: на оси абсцисс - сравнительного метода, а на оси ординат - метода-кандидата. Диаграмма дает первое впечатление о типе связи между двумя методами. При линейности регрессии точки располагаются вокруг прямой линии.

Если регрессия нелинейна, то требуется дальнейшая доработка метода-кандидата, т.е. он не пригоден для целей лабораторной диагностики.

Линейная регрессия рассчитывается по формуле 11.

Если "a" статистически отличается от 0, то метод-кандидат имеет систематическую погрешность по отношению к сравнительному методу. Эта ошибка может быть приемлемой и неприемлемой.

В таблице 10 приведена статистическая обработка результатов сравнения рефрактометрического и биуретового методов определения белка.

Таблица 10

СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ БИУРЕТОВОГО (УНИФИЦИРОВАННОГО) И РЕФРАКТОМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Методы	n	$\bar{X}$, S (г/л)	t-тест	Критерий знаков	Коэффициент корреляции рангов	Линейный коэффициент корреляции	Регрессия
Биурето-							

вый (X)	50	X = 76 S = 7,2	t = 6,26	+48 -2	0,75	0,75	X=16+ 0,96Y
Рефракто-метриче-ский (Y)	50	$\bar{Y}$ = 86 S = 8,7	p < 0,05	p<0,05			Sxy=8,9

Различия результатов - достоверны, связь низкая.

В таблице 11 сравниваются результаты диацетилмонооксимного и уреазного методов определения мочевины в сыворотке крови. Сравнительным методом в данном случае является наиболее специфичный уреазный метод.

Таблица 11

СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ СРАВНЕНИЯ
УРЕАЗНОГО И ДИАЦЕТИЛМОНООКСИМНОГО МЕТОДОВ

Метод	n	$\bar{X}$, S (ммоль/л)	t-тест	Крите-рий знаков	Тест Вилкоксона	Коэффици-ент корре-ляции
1	2	3	4	5	6	7
На нормальных величинах						
Уреазный (X)	14	$\bar{X}$ = 5,26 S = 2,3	t = 0,26	+8 -6	T = 45	0,94
Диацетил-монооксим-ный (Y)	14	$\bar{Y}$ = 5,0 S = 2,0	p > 0,05	p>0,05	p > 0,05	
На патологических величинах						
Уреазный (X)	14	$\bar{X}$ = 18,6 S = 7,76	t = 0,194	+8 -6	T = 46	0,98
Диацетил-монооксим-ный (Y)	14	$\bar{Y}$ = 19,2 S = 8,0	p > 0,05	p>0,05	p > 0,05	

Различия результатов не достоверны, связь высокая.

III. Специфичность

Аналитическая специфичность метода - способность метода измерять лишь тот компонент или те компоненты, для определения которых он предназначен. Низкая специфичность приводит к получению неправильных результатов и должна быть указана в описании метода. Оценка специфичности не имеет завершения, поскольку любое вещество может повлиять на результаты. Например, к методам с низкой специфичностью относится редуктометрический метод для определения группы редуцирующих веществ в крови или реакция Яффе для определения креатинина и креатининподобных хромогенов крови.

Высокоспецифичными являются ферментативные методы определения глюкозы, мочевины.

Многие методы для коррекции неспецифичности требуют постановки холостого опыта.

Для оценки аналитической специфичности следует использовать примеси, которые, исходя из химической структуры, являются репрезентативными представителями тех групп веществ, которые с физиологической точки зрения имеют практическое значение.

Интерференция обусловлена влиянием веществ на ход реакции. Способ влияния (повышение, понижение) и степень влияния могут быть различными.

Важным аспектом этой проблемы является интерференция лекарств. Лекарственные вещества, в зависимости от вида, дозы, способа применения, могут воздействовать на результаты лабораторных исследований различными путями: различают фармакологическую интерференцию в организме и техническую интерференцию в ходе выполнения анализа.

Низкая специфичность, интерференция снижают правильность метода. Поэтому предпочтение следует отдавать более специфичным методам и неподвергающимся интерференции.

IV. Аналитическая чувствительность. Предел чувствительности

Аналитическая чувствительность метода определяется его способностью выявлять наименьшие различия между двумя концентрациями исследуемого вещества. В процессе калибровки устанавливается диапазон калибровочной кривой, что является частью аналитической характеристики метода. При прочих равных условиях меньший наклон калибровочной кривой соответствует более высокой чувствительности метода, что позволяет выявить меньшие количества анализируемого вещества. На нижнем и верхнем пределах калибровочной кривой способность к выявлению веществ ухудшается.

Нижний предел чувствительности метода - это концентрация исследуемого вещества, которая соответствует наименьшему результату определения, статистически достоверно отличающемуся от показателей холостой пробы. Предел чувствительности может быть охарактеризован количественно. Он аналитически характеризует метод и позволяет сравнивать методы по этому качеству.

Кроме того, нижний предел чувствительности позволяет избежать ошибок, связанных с измерением величин, более низких, чем нижний предел чувствительности.

Практически определить нижний предел чувствительности для фотометрических методов можно следующим образом: проводят многократное исследование (n = 20) холостой пробы и проб с низкой концентрацией анализируемого вещества и устанавливают с заданным уровнем значимости статистически достоверные различия между холостой и опытной пробой с низким значением анализируемого вещества, которое и будет количественно соответствовать нижнему пределу чувствительности метода.

Экспериментально установлено, что обычно нижний предел чувствительности в фотометрических методах равен среднему значению холостой пробы плюс 3 среднеквадратических отклонения.

Теоретические основы определения допустимых погрешностей результатов лабораторных исследований

Определение допустимых пределов погрешностей метода преследует цель - установить приемлемость аналитических качеств метода для клинических целей.

Теоретические основы определения допустимой аналитической вариации базируются на следующем:

1. Определение аналитической вариации метода (среднеквадратического отклонения и коэффициента вариации) путем оценки аналитической надежности метода.

2. Теоретический расчет аналитической вариации, как фиксированной части биологической вариации. Смысл такого подхода состоит в определении степени влияния аналитической вариации на биологическую, тем самым - определении степени влияния аналитической вариации на расширение диапазона нормальных или референтных величин.

Соотношение между различными видами вариации определяется следующим уравнением:

$$S^2_{общ.} = S^2_{ан} + S^2_{биол},$$

где: $S^2_{общ.}$ - общая вариация;

$S^2_{ан}$ - аналитическая вариация;

$S^2_{биол}$ - биологическая вариация.

Биологическая вариация имеет два источника - внутрииндивидуальная и межиндивидуальная вариации:

$$S^2_{биол} = S^2_{межинд} + S^2_{внутриинд.}$$

Математически рассчитано, что, если отношение Sан к Sбиологической меньше 0,4, то увеличение биологической вариации за счет аналитической будет незначительным.

Существуют и другие способы определения соотношения аналитической и биологической вариаций. По данным ряда авторов коэффициент вариации метода не должен превышать 1/8 области нормальных пределов в процентах от средней величины нормы. При этом нормальные величины рассматриваются как совокупность аналитической и биологической вариации.

Во всех случаях, при расчете допустимых пределов погрешности метода индивидуально для каждого вещества и метода аналитическая вариация, полученная экспериментально, сопоставляется с теоретически рассчитанными величинами.

3. Медицински допустимые пределы погрешностей. Этот способ оценки допустимых пределов погрешностей может быть основан на опросе мнений врачей-клиницистов и лабораторных работников.

Каждое исследуемое вещество определяется в конечном счете для клинических целей - установления диагноза, контроля за лечением, обследования здоровых. Поэтому медицински допустимые пределы погрешностей в различных клинических ситуациях будут различными, но они безусловно дополняют представление о допустимых погрешностях в зависимости от цели лабораторного исследования.

Однако, медицински допустимые пределы погрешности, в зависимости от поставленной цели, могут включать различные виды вариаций. Например, при повторном анализе теста медицински допустимые пределы погрешностей будут включать внутрииндивидуальную и аналитическую вариации изо дня в день.

При диспансерном обследовании здоровых наибольшее значение для разделения нормы и патологии будут иметь межиндивидуальные колебания.

Определение медицински допустимых пределов погрешностей позволит в ряде случаев не добиваться большей точности, чем она требуется в определенных клинических обстоятельствах, что связано в ряде случаев с увеличением расходов на проведение анализов.

В таблице 12 приводятся допустимые пределы аналитической вариации (V%) для ряда веществ, принятые рабочей группой экспертов по лабораторной диагностике стран - членов СЭВ.

Таблица 12

ДОПУСТИМЫЕ ПРЕДЕЛЫ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ВАРИАЦИИ (РАЗБРОСА)
ДЛЯ АНАЛИЗИРУЕМЫХ КОМПОНЕНТОВ

NN	Анализируемый компонент	V%
1	2	3
	Клиническая биохимия	
1	Адреналин	7
2	Аланинаминотрансфераза	7
3	Альбумин	3
4	альфа-Амилаза	10
5	Аммиак	5
6	Аспартатаминотрансфераза	7
7	Белок общий	3
8	Белковые фракции	8
9	Билирубин	10
10	Глюкоза	5
11	Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	8
12	гамма-Глутамилтранспептидаза	10
13	Железо	5
14	Иммуноглобулины	7
15	Калий	2
16	Кальций	2
17	Кортизол	7
18	Креатинин	5
19	Креатинкиназа	7
20	Лактатдегидрогеназа	7
21	Лейцинаминопептидаза	10
22	Липиды общие	5
23	Магний	2
24	Медь	5
25	Мочевая кислота	7
26	Мочевина	7
27	Натрий	2
28	Норадреналин	7
29	Триглицериды	7
30	Фосфор	5
31	Фосфатаза щелочная	7
32	Хлор	3
33	Холинэстераза	7
34	Холестерин	7
	Гематология	
1	Гемоглобин	2
2	Гематокрит	3
3	Лейкоциты	10
4	Эритроциты	10

В целом, клиническая характеристика аналитических качеств метода и определение допустимых пределов погрешностей метода направлены на повышение диагностической значимости и экономической эффективности лабораторных тестов.

Начальник
Главного управления
лечебно-профилактической помощи
А.М.МОСКВИЧЕВ

Приложение N 5
к приказу Минздрава СССР
от 23 апреля 1985 г. N 545

ПЕРЕЧЕНЬ
ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ,
РЕЗУЛЬТАТЫ КОТОРЫХ ПОДЛЕЖАТ КОНТРОЛЮ КАЧЕСТВА
С ПОМОЩЬЮ ОТЕЧЕСТВЕННЫХ КОНТРОЛЬНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Утратил силу. - Приказ Минздравмедпрома РФ от 19.02.1996 N 60

Приложение N 6
к приказу Минздрава СССР
от 23 апреля 1985 г. N 545

ЗАДАНИЕ
НА РАЗРАБОТКУ И ПРОИЗВОДСТВО КОНТРОЛЬНЫХ МАТЕРИАЛОВ
ДЛЯ КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЙ

NN п/п	Наименование и назначение контрольного материала	Потребность по годам (в литрах)	
		1986-1990	1991-1995
1	2	3	4
	I. Контрольные материалы для биохимических исследований		
1	Сероконт-В - контрольная лошадиная сыворотка для контроля воспроизводимости результатов исследований ручными и автоматическими методами. Расширение числа контролируемых компонентов (натрий, калий, кальций, фосфор неорганический и др.).	1500	2000
2	Сероконт-П-эквин - контрольная лошадиная сыворотка с исследованным содержанием компонентов в нормальной концентрации для контроля правильности результатов исследований ручными и автоматическими методами. Расширение числа контролируемых компонентов (натрий, калий, фосфор неорганический и др.).	150	200
3	Патосероконт-П-эквин - контрольная лошадиная сыворотка с исследованным содержанием компонентов в патологической концентрации для контроля правильности результатов исследований ручными и автоматическими методами.	100	150
4	Сероконт-П - контрольная человеческая	100	200

	сыворотка для контроля правильности результатов исследования липидных компонентов. Расширение числа контролируемых		
	компонентов, включая белковые фракции методом электрофореза.		
5	Контрольная человеческая сыворотка с исследованным содержанием компонентов в нормальной концентрации для контроля		400
	правильности результатов исследования активности ферментов.		
	II. Контрольные материалы для исследований мочи		
1	Контрольные материалы с исследованным содержанием компонентов в нормальной		300
	концентрации для контроля правильности результатов исследований химического состава мочи.		
2	Контрольные материалы с исследованным		200
	содержанием компонентов в патологической концентрации для контроля правильности результатов исследований химического состава мочи.		
	III. Контрольные материалы для коагулологических исследований		
1	Стандартный препарат тромбопластина с установленным временем.		200
2	Контрольная человеческая плазма с известным содержанием тромбопластина.		100
3	Контрольная человеческая плазма с установленным временем частично активированного тромбопластина.		100

Начальник
Главного управления
лечебно-профилактической помощи
МЗ СССР
А.М.МОСКВИЧЕВ

Начальник
Главного управления
по производству бактерийных и вирусных
препаратов МЗ СССР
Г.Н.ХЛЯБИЧ