**Методические рекомендации к занятию №4**

**по дисциплине «Клиническая (био)химия»**

**Тема:** Аналитическая надежность и диагностическая значимость лабораторных тестов. **Система управления качеством лабораторными исследованиями в лабораториях клинической химии (биохимии).**

Аналитическая надежность и диагностическая значимость лабораторных тестов

Для своевременного распознавания различных заболеваний человека т. е. проведения диагностики заболеваний и оценки эффективности лечебных воздействий, используют различные технические средства, в том числе и средства измерений, которые позволяют получать измерительную информацию о функциональных показателях биологического объекта (БО).

 Изменчивость и индивидуальный разброс параметров БО, их взаимосвязь, нелинейность этих связей, наличие высокого уровня помех – все это делает задачу объективной оценки состояния БО довольно сложной.

Современная номенклатура клинических лабораторных исследований насчитывает свыше тысячи лабораторных тестов, позволяющих получить аналитически надежную и клинически высокоинформативную информацию. При неточности лабораторных данных риск клинических затруднений достигает 26% - 30%, а риск неоправданных действий врача составляет 7% - 12%.

Таким образом, **целевым параметром аналитической надежности клинических лабораторных** исследований является их способность достоверно разграничивать свойственные состояниям здоровья и патологии
значения содержания определенных аналитов в составе биоматериалов.

 Используемые тесты должны быть аналитически надежными. Аналитическая надежность устанавливается для каждого метода посредством определения четырех показателей таких как: воспроизводимость, правильность, чувстви­тельность и специфичность (обычно указывается в методиках).

**Организация системы управления качеством лабораторных исследований в клинической биохимии**

Система управления качеством лабораторных исследований включает следующие моменты.

• Участие лаборатории в международной, региональной, межлабораторной системе внешней оценки качества клинических лабораторных исследований.

• Внутрилабораторный контроль качества, который включает работу по максимально возможному снижению риска лабораторной ошибки.

Как показывают данные литературы, до 60 - 70 % лабораторных ошибок относят к преданалитической стадии, до 7-10 % - к аналитической, остальные - к постаналитической стадии.

Таким образом, огромные усилия, затраченные на создание условий для проведения точных измерений, могут оказаться бесполезными при несоблюдении правил забора и хранения биологических проб. Ошибки на постаналитической фазе связаны с неправильной интерпретацией полученных лабораторных данных.

При анализе результатов лабораторных исследований должны в комплексе рассматривать ряд моментов, ниже перечислены основные из них:

• проблема биологической вариации лабораторных параметров, включая понятие «нормативного лабораторного показателя» (референтной величины);

• проблема многообразия факторов, влияющих на результаты исследований;

• понятие о диагностически значимых (патологических) отклонениях лабораторных результатов;

• понятие о диагностической чувствительности и специфичности лабораторных тестов, их способности участвовать в дифференциальной диагностике;

• проблема порогов решений (пороговых величин лабораторных показателей, требующих принятия диагностических или лечебных решений);

• проблема использования диагностических программ (алгоритмов) для оценки результатов.

Важная роль врача при работе с получаемой информацией состоит в определении допустимых погрешностей результатов лабораторных исследований.

Основные критерии, по которым оценивают метод : ***точность, воспроизводимость, специфичность, чувствительность.***

Внутрилабораторный контроль качества в клинико-диагностической лаборатории — комплекс мероприятий, направленных на обеспечение качества клинических лабораторных исследований.

Основными задачами КДЛ является проведение необходимых клинических лабораторных исследований и повышение их качества. Качество лабораторных исследований должно соответствовать требованиям по аналитической точности, установленным нормативными документами Министерства здравоохранения Украины.

Важным элементом обеспечения качества является внутрилабораторный контроль качества, который состоит в постоянном (повседневном в каждой аналитической серии) проведении контрольных мероприятий: исследовании проб контрольных материалов или применении мер контроля с использованием проб пациентов. Целью внутрилабораторного контроля является оценка соответствия результатов исследований установленным критериям их приемлемости при максимальной вероятности погрешности и минимальной вероятности ложного отбрасывания результатов выполненных лабораторией аналитических серий.

Внутрилабораторный контроль качества обязателен в отношении всех видов исследований, выполняемых в лаборатории.

При проведении контроля качества лабораторных исследований используются следующие термины:

**Достоверность измерений (validiti)** показывает, в какой степени полученные данные соответствуют истинным значениям. В некоторых источниках достоверность называют точностью оценки (accuracy) и приводят аналогичное определение («точность измерений - качество измерений, отражающее близость их результатов к истинному значению измеряемой величины»)**.**

**Воспроизводимость измерений (reliability) -** качество измерений, отражающее близость друг к другу результатов измерений, выполненных в различных условиях.

**Сходимость измерений (precision) -** качество измерений, выполненных в одинаковых условиях.

**Точность измерений** — качество измерений, отражающее близость их результатов к истинному значению измеряемой величины. Высокая точность измерений соответствует малым погрешностям всех видов, как систематических, так и случайных.

**Погрешность измерения** — отклонение результата измерения от истинного значения измеряемой величины.

**Систематическая погрешность измерения** — составляющая погрешности измерения, остающаяся постоянной или закономерно изменяющаяся при повторных измерениях одной и той же величины.

**Правильность измерений (результатов)** — представляет качество измерений, отражающее близость к нулю систематических погрешностей в их результатах.

**Правильность результатов** – это соответствие среднего значения результатов повторных определений одного и того же материала должной (номинальной) величине.

Статистическим критерием правильности является средняя ариф­метическая (X) и степень ее отклонения от должного (номинального) значения. Способами определения правильности могут быть следующие.

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.

Процент выявления вещества, равный 90—110, считается удовлетворительным для клинических лабораторных

методов.

Исследование контрольного материала с известным содержанием компонентов - наиболее простой способ оценки правильности.

Сравнение методов. Наиболее информативным способом является способ сравнения методов, который позво­ляет определять общую систематическую погрешность метода. Сравнивается исследуемый метод с референтным, т.е. тем у которого максимальная специфичность, правильность и воспроизводимость, без учета экономических затрат.

**Случайная погрешность измерения** — составляющая погрешности измерения, изменяющаяся случайным образом при повторных измерениях одной и той же величины.

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

**Внутрисерийная воспроизводимость** — качество измерений, отражающее близость друг к другу результатов измерений, выполняемых в одной и той же аналитической серии.

**Межсерийная воспроизводимость** — качество измерений, отражающее близость друг к другу результатов измерений, выполняемых в разных аналитических сериях.

**Общая воспроизводимость** — качество измерений, отражающее близость друг к другу результатов всех измерений.

**Установленное значение** — метод-зависимое значение определяемого показателя, указываемое изготовителем контрольного материала в паспорте или инструкции.

**Аналитическая специфичность** метода – это 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. Так, например, при определении магния с магоном, повышенное со­держание кальция завышает результаты.

**Аналитическая чувствительность** метода – это наименьшее количество вещества, которое выявляет данный метод (обладая при этом вышеописанными характеристиками).

При постановке нозологического диагноза с использованием лабораторных тестов следует учитывать его диаг­ностическую надежность при определенных заболеваниях. Для количественной характеристики диагностической надеж­ности лабораторного теста рекомендованы критерии: *диагностической чувствительности (ЦЧ), диагностической спе­цифичности (ЦС),*

**Диагностическая чувствительность** — вероятность того, что у больного будет получен положительный ре­зультат теста. О ДЧ судят по доле (%) ложительных результатов анализа у пациентов с соответствующим заболеванием.

**Диагностическая специфичность** - вероятность того, что у здорового будет получен отрицательный резуль­тат теста. О ДС судят по доле (%) отрицательных результатов у лиц, не страдающих соответствующим заболеванием.

Вышеперечисленные параметры качества систематически контролируют в лаборатории.

Источниками погрешностей, выявляемых системой внутрилабораторного контроля качества, могут быть внутренние (лабораторные) и внешние факторы. ***К внешним факторам*** относятся принцип аналитического метода, качество приборов и реактивов, калибровочных средств. ***К внутренним*** — несоблюдение условий, установленных методикой проведения аналитического исследования: времени, температуры, объемов, правил приготовления и хранения реактивов.

В зависимости от характера влияния на результаты аналитического исследования различают ***систематические и случайные погрешности***, которые выявляются с помощью многократного исследования контрольного материала в аналитических сериях.

***Систематическая погрешность*** характеризует правильность измерений, которая определяется степенью совпадения среднего результата повторных измерений контрольного материала (Х) и установленного значения измеряемой величины. Разность между ними называется смещением и может быть выражена в абсолютных или относительных величинах и рассчитывается в процентах по формуле:

В= ((Х – УЗ)/УЗ) х 100 %, где Х — среднее значение измерений контрольного материала, У3 — установленное значение.

***Случайная погрешность*** отражает разброс измерений и проявляется в различии между собой результатов повторных измерений определяемого показателя в одной и той же пробе. ***Математически величина случайной погрешности выражается среднеквадратическим отклонением (S) и коэффициентом вариации (CV).***

**Внутрилабораторный контроль качества включает контроль воспроизводимости и точности (правильности)** и может осуществляться с помощью методов, использующих специальные контрольные материалы или средства ряда методов, не требующих контрольных материалов. Методы, использующие контрольные материалы: метод контрольных карт; метод «Сизит»; метод контрольных правил Westgard. Методы, использующие данные пациентов:

Метод параллельных проб.

Метод средней нормальных величин («средней нормы»).

Исследование случайной пробы.

Исследование повторных проб.

Исследование смешанной пробы.

***Метод контрольных карт***. Ежедневно работник лаборатории при проведении всех видов анализа наряду с опытными пробами исследует контрольный материал. Определение содержания компонентов в контрольном материале проводят одновременно с исследованием опытных проб, при этом вместо сыворотки или плазмы крови берут контрольный материал в таком же количестве. Контрольные материалы могут быть приготовлены в лаборатории самостоятельно (сливные сыворотки) или закуплены у фирм — коммерческие контрольные материалы. В свою очередь, коммерческие сыворотки могут быть аттестованными (с известным содержанием компонентов) и неаттестованными (с неизвестным содержанием компонентов). Неаттестованные контрольные сыворотки в первую очередь используются для контроля воспроизводимости, а аттестованные — правильности.

Определение каждого компонента в контрольном материале проводят методом, применяемым в данной лаборатории. Результаты **ежедневно** регистрируются. ***Для аттестованных контрольных материалов*** по 20-ти результатам, полученным в 20 выполненных сериях, рассчитывают:

среднюю арифметическую Х;

среднее квадратическое отклонение S;

коэффициент вариации CV: CV= s / х;

величину относительного смещения В.

***Если используют неаттестованный материал или сливные сыворотки***, по полученным результатам рассчитывают X, S и CV. Проверяют, что полученные значения В и CV не превышают их предельно допустимых значений. Если это условие выполняется, делают вывод о возможности использования рассматриваемой методики для целей лабораторной диагностики и переходят к построению контрольных карт. В случае превышения одним из полученных значений В или CV соответствующих предельно допустимых значений проводят дополнительную работу по устранению источников повышенного смещения или вариации или избирают другую методику определения данного показателя.

***Контрольная карта*** представляет собой *график, на оси абсцисс которого откладывают номер аналитической серии (или дату ее выполнения), а на оси ординат — значения определяемого показателя в контрольном материале*. Через середину оси ординат проводят линию, соответствующую средней арифметической величине X, и параллельно этой линии отмечают линии, соответствующие контрольным пределам:

X ± 1S

X ± 2S

X ± 3S

С использованием построенных контрольных карт осуществляют ***оперативный («текущий») контроль качества*** результатов определения исследуемого показателя. С этой целью в каждой аналитической серии проводится по одному измерению в каждом из двух контрольных материалов (N и P); или два измерения в одном и том же контрольном материале, если используется единственный материал (в последнем случае на контрольную карту наносят по две точки на серию).

Оценку результатов исследования контрольных материалов проводят с использованием контрольных правил Westgard:

1 2S — если один из результатов анализа контрольных материалов выходит за пределы (х±2S), то проверяется последовательно наличие всех нижеследующих признаков, и аналитическая серия признается неудовлетворительной, если присутствует хотя бы один из них;

1 3S — одно из контрольных измерений выходит за пределы (х±3S);

2 2S — два последних контрольных измерения превышают предел (х+2S) или лежат ниже предела (Х-2S);

R 4S — два контрольных измерения в рассматриваемой аналитической серии расположены по разные стороны от коридора х±2S (не применяется к одному измерению в серии единственного контрольного материала);

4 1S — четыре последних контрольных измерений превышают (х+1S) или лежат ниже (х-1S);

10 X — десять последних контрольных измерений располагаются по одну сторону от линии, соответствующей X.

Появление контрольных признаков **1 3S и R 4S** свидетельствует *об увеличении случайных ошибок*, в то время как признаки **2 2S, 4 1S, 10 X** — об *увеличении систематической ошибки методики*.

После устранения причин появления повышенных погрешностей, все пробы, проанализированные в этой серии (и пациентов, и контрольные), исследуют повторно. Методы, использующие контрольные материалы, наиболее широко применяются для контроля качества в КДЛ. Однако эти методы не выявляют ошибку в целом.

**Контроль по ежедневным средним**. Для многих исследований в качестве дополнительного рекомендуют контроль по ежедневным средним, в котором используются образцы или результаты исследования образцов пациентов. Условия, необходимые для внедрения метода: число проб пациентов, исследуемых ежедневно, должно быть достаточным для статистической достоверности данных (30 и более, значение этого числа зависит от анализируемого компонента); контингент обследуемых лабораторией пациентов должен быть достаточно однородным (по патологии, полу, возрасту); число усредняемых результатов должно быть примерно одинаковым, и оно зависит от анализируемого компонента.

Последовательность процедур:

Ежедневно из полученных в течение дня результатов проводится рассчет ежедневной средней арифметической величины (х), и эта процедура повторяется в течение 20 дней.

Даже из 20 ежедневных средних проводится расчет общего среднего х общ. и среднего квадратичного отклонения (S).

Рассчитываются контрольные пределы (Xобщ.±1S, Хобщ.±2S, Хобщ.±3S) и строится контрольная карта.

После построения контрольной карты в лаборатории ежедневно рассчитывается **х** из всех результатов каждого анализируемого показателя, и полученное значение наносится на карту в виде точки.

Анализ контрольной карты проводится по правилам Westgard.

**Метод контроля воспроизводимости по дубликатам (метод параллельных проб)**. Принцип данного метода внутрилабораторного контроля качества состоит в проведении двух параллельных исследований определяемого показателя в выбранной наугад пробе пациента, нахождении ***величины относительного размаха (Ri, %)*** между первым значением показателя (Х1) и вторым (Х2) и сравнении ее с установленными контрольными пределами. Последовательность процедур:

определить уровень определяемого показателя в выбранной наугад пробе пациента дважды в течение одной аналитической серии;

рассчитать величину относительного размаха между двумя определениями по формуле:

Ri = ((2 х (X1 — X2))/(X1 + X2)) х 100 %, где (Х1–Х2) — разница между результатами определения по абсолютному значению;

повторить описанную процедуру в 20 аналитических сериях;

из полученных 20 значений (R1, 2, 3..., 20) рассчитать среднее арифметическое значение R:

Далее рассчитывают контрольные пределы, умножая полученное значение R на коэффициенты, соответствующие 95% и 99% квантилям распределения размахов: ***для 95%-ной контрольной границы — 2,46; для 99%-ной контрольной границы — 3,23.***

Исходя из полученных контрольных пределов строится контрольная карта, где на оси абсцисс откладывается нулевая линия (она будет соответствовать нулевому размаху), на которой отмечается номер аналитической серии, а параллельно ей в удобном масштабе проводят линии, соответствующие R и контрольным границам 95% и 99%. На оси ординат отмечают уровень определяемого показателя. Далее, в каждой аналитической серии проводится параллельное исследование определяемого показателя в выбранной наугад пробе пациента.

Пробы, предназначенные для параллельного исследования, должны располагаться случайным образом по длине аналитической серии. Полученное значение относительного размаха сравнивается с контрольными границами. Если хоть одно полученное значение выходит за контрольную границу, соответствующую 99% (контрольный признак «1R99», или если два последовательных значения выходят за контрольную границу «95% (контрольный признак «2R9S»), то такая аналитическая серия считается непригодной, исследование проводится повторно.

***Исследование смешанной пробы***. При оценке воспроизводимости методом параллельных проб получают более близкие значения, чем обычно получают при наличии случайных ошибок. В методе смешанной пробы это исключено. Метод заключается в следующем: из группы образцов случайно выбирают два (А и В); из каждого образца А и В берут равные объемы и смешивают (образец С); исследуют все три образца, вычисляют теоретическое содержание компонента в образце С((А+В)/2) и различие между теоретическим и исследованным содержанием ((А+В)/2–С). Для построения контрольной карты по этому методу следует проводить исследование в течение 40 дней. Затем рассчитывают среднюю отклонения (d ср.) для единичных анализов путем сложения всех различий (опуская знаки) и деления на 40. Затем готовят контрольную карту, на которой чертят три прямых: 50% прямая составляет 0,845 dCP; 95% прямая составляет 2,5 dCP; 99,5% прямая составляет 3,5 dCP.

В дальнейшем ежедневно готовят смешанную пробу и результат отмечают на карте. Каждая точка представляет собой различие между теоретической величиной, рассчитанной как среднее двух проб, и действительной величиной, полученной исследованием смешанной пробы. Если много точек располагается выше прямых 95% и 99,5%, необходимо провести соответствующие мероприятия для выявления возможных источников ошибок.

**Особенности контроля качества гематологических исследований**

В связи со спецификой гематологических исследований контроль качества их предполагает наличие определенных контрольных средств и материалов, которые не используются в других видах лабораторных исследований. Для контроля качества определения содержания гемоглобина используются стандартные растворы гемиглобинцианида с известным содержанием Нb и специальные контрольные растворы (донорская кровь, лизированная кровь и консервированная кровь). Стандартный раствор гемиглобинцианида применяют для контроля правильности работы фотометров и построения калибровочной кривой в гемиглобинцианидном методе определения Нb в крови. Для контроля воспроизводимости определения Нb применяется раствор лизированной крови (гемолизат). Для приготовления гемолизатов используют: консервированную человеческую цитратную кровь, можно с истекшим сроком годности; консервированную лошадиную кровь; 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 3000 об/мин в течение 30 мин. Плазму сливают, к эритроцитам добавляют 100 мл стерильной дистилированной воды и тщательно перемешивают на магнитной мешалке в течение 30 мин. Раствор помещают в холодильник при -20 градусах 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 №4 — с величиной пор 4–10 мкм) и разливают в стерильные пузырьки по 1 мл. Хранят раствор в холодильнике, оптимальная t = –20°С. Стабилен 1 год. Для оценки воспроизводимости определения концентрации Нb гемолизат исследуют в течение 20 дней, из полученных данных рассчитывают XСР, S, CV, контрольные пределы (X±2S) и строят контрольную карту. Коэффициент вариации не должен превышать 5%.

Для контроля правильности используют контрольную кровь с известным содержанием гемоглобина. Контрольная кровь исследуется так же, как обычные пробы пациентов, т. е. в тех же случаях и в тех же условиях. Результаты исследования Нb в контрольной крови сравнивают с паспортными значениями, указанными в инструкции производителя, и рассчитывают смещение В. Оно не должно быть более 4%.

**Для контроля качества подсчета клеток крови** применяют следующие контрольные материалы: консервированная или стабилизированная кровь; фиксированные клетки крови (суспензии); контрольные мазки крови. Контроль качества определения эритроцитов осуществляется по принципу опосредованного контроля методом контрольных карт. В течение 2-х дней проводят 20 определений количества эритроцитов в консервированной крови, рассчитывают контрольные пределы и строят контрольную карту. Коэффициент вариации при подсчете эритроцитов в контрольном материале не должен превышать 5%.

**Для контроля качества подсчета лейкоцитарной формулы** в мазках крови используются контрольные мазки. Они готовятся из капиллярной крови доноров и больных обычным способом. 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 рассчета X и S. Для увеличения срока хранения мазка используют клей БФ-6, образующий тонкую прозрачную пленку, герметически приклеивающуюся к поверхности мазка и стекла и предохраняющую мазок от воздействия окружающей среды. Подсчет лейкоформулы считается правильным, если результаты подсчета клеток входят в рассчитанные контрольные границы (X ±2S) для каждого вида клеток крови.

**Контроль качества исследований мочи**

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. В качестве контрольных материалов для контроля химического состава мочи используют: водные растворы веществ; слитую мочу с консервантами; искусственные растворы мочи с добавками веществ, исследуемых в моче.

На контрольных материалах проверяют методы, обычно применяемые в лаборатории для качественного и количественного исследования химического **состава мочи**. Водные растворы веществ с известным содержанием используются для контроля качества исследований химического состава мочи (например, раствор глюкозы, ацетона, альбумина). Для приготовления водных растворов используют дистиллированную воду, соответствующую ГОСТ 6709-72, и реактивы квалификации хч и чда.

Водные растворы хранят в холодильнике в течение 1 месяца. Для контроля качества исследований химического состава мочи можно использовать слитую мочу, приготовленную в лаборатории. К 1 л свежей человеческой мочи добавляют 2 г 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.

Контрольный материал хранят при комнатной температуре. Срок годности — несколько лет. Слитая моча используется для контроля воспроизводимости.

Для контроля качества диагностических полосок используются контрольные растворы, имитирующие мочу. Способ приготовления: в мерную колбу на 500 мл с 200 мл дистиллированной воды добавляют 5 мл глюкозы (для инъекций внутривенно), 2 мл ацетона (ч, чда), 25 мл слитой человеческой сыворотки и 0,1 мл лизированной крови (к 0,1мл цельной крови добавляют 01 мл дистиллированной воды для лизиса эритроцитов). Тщательно перемешивают и доводят объем до метки физиологическим раствором. Используя 0,1 М НС1, величину рН доводят до 6,0. Контрольный раствор хранится в холодильнике не более одного месяца.

**Контроль качества коагулологических исследований**

Контроль качества коагулологических исследований имеет свои особенности, связанные, прежде всего, с характером методических принципов, которые применяются для исследования параметров свертывающей системы и фибринолиза и основаны, главным образом, на определении конечной точки образования фибрина, а также с видом используемых реактивов. Для контроля коагулологических исследований применяют:

Смешанную свежую плазму от большого количества доноров (не менее 20 человек).

Стандартную человеческую лиофилизированную плазму (пул) для калибровки.

Контрольную человеческую плазму с точным содержанием факторов свертывания (нормальным и патологическим).

Контрольную плазму с дефицитом индивидуальных факторов свертывания.

Контрольную плазму для контроля верхней и нижней границы терапевтической области при приеме антикоагулянтов.

В качестве основного контрольного материала используют слитую, только цитратную плазму с нормальным и пролонгированным временем свертывания. Способ приготовления слитой плазмы: свежую плазму, взятую с 3,8%-м раствором цитрата натрия, собирают от нескольких доноров, смешивают и разливают во флаконы. Быстро замораживают. Основное требование к плазме — отсутствие в ней следов гемолиза и эритроцитов.

Контрольную плазму каждый день размораживают и используют в начале работы и через каждые 20 проб. Рекомендуют использовать не менее одной порции плазмы с пролонгированным временем свертывания. Каждая проба и контрольная плазма исследуются параллельно. Если разница между параллелями больше 3 сек., то тест должен быть повторен со свежей пробой от пациента.