

Kalibrace, kontroly kvality v koagulační laboratoři

Jiřina Zavřelová



Kalibrační materiál

- Komerční kalibrační plazmy
 - ↘ přesně udaná hladina vyšetřované složky
 - ↘ návaznost na mezinárodní referenční materiály
 - ↘ některé parametry návaznost na „pool“ normální plazmu (APTT, PT,..)
- Směsná normální plazma (PT, APTT)

Kalibrace

1/ Vyšetření

- ↘ různých ředění kalibrační plazmy s udanou hladinou parametru(100%, 50 %, 25 %....)
- ↘ několika kalibračních materiálů s různou hladinou parametru
- a vynesení naměřených hodnot (čas, A...) pro jednotlivé hladiny do grafu
 - ↘ závislost lin/lin, lin/log, log/log, nelineární(polynom)

2/ Vyšetření referenčního času (času normálu) pro výpočet R, INR

3/ Načtení kalibrace čárovým kodem u předkalibrovaných metod

Ředění kalibrační plazmy

→ Automatické

↳ naprogramováno

→ Manuální

↳ geometrickou řadou (100%, 50%, 25%, 12,5%...)

↳ přímé ředění (1:1, 1:2, 1:4, 1:8...)

Kalibrační křivka

Grafická závislost měřeného parametru na hladině vyšetřované složky

→ měřený parametr (osa y)

↘ koagulační čas (s)

↘ absorbance (A, $\Delta A/\text{min}$).....

→ hladina vyšetřované složky (osa x)

↘ aktivita (% , IU/ml...)

↘ koncentrace (g/l, $\mu\text{g/ml}$...)

Kalibrační křivka - požadavky

→ minimálně třibodová

↘ závisí na typu vyšetření

→ musí pokrýt rozsah normálních i patologických hodnot

→ linearita kalibrační křivky (ideální $r = 1,00$)

→ pokud **naměřená hodnota mimo kalibrovanou oblast v oblasti s klinickým významem** je nezbytné opakovat vyšetření s jiným ředěním (menším nebo větším) vyšetřované plazmy

Odečtení výsledku

→ Automatické

→ Manuální

→ přímé odečtení

↘ stejné ředění kalibrační i vyšetřované plazmy

→ odečtení + vynásobení dilučním faktorem

↘ odlišné ředění kalibrační a vyšetřované plazmy

Provedení kalibrace

- ➔ Při změně šarže setu/jednotlivých reagensů, v případě že nejsou součástí jednoho setu
 - rutinní i speciální testy
- ➔ S každou sérií vyšetření
 - speciální testy
 - vzhledem k omezené stabilitě reagensů a vysoké citlivosti
 - za obzvláště citlivé metody vyžadující kalibraci s každou sérií jsou považována vyšetření FF VIII, IX, XI a XII, PC a PS
- ➔ po kalibraci musí následovat provedení kontrol kvality s deklarovaným rozmezím v normálním i patologickém rozsahu

Kontroly kvality koagulace

- Je nezbytnou součástí systému kontrolních procesů (SMK), které zajišťují
 - ↘ spolehlivost výsledků vyšetření
 - ↘ potřebnou jistotu pro
 - pro laboratoř, pacienty, lékaře
 - ↘ minimalizaci možných analytických chyb
- VKK zahrnují nejen měření kontrol, ale i analýzu výsledků a jejich hodnocení, řešení neshod

Kontroly kvality koagulace

- Vnitřní (interní) kontrola kvality (VKK, IKK)
- Externí kontrola kvality (EHK)

Vnitřní kontroly kvality koagulace

→ Doporučení ČHS : www.hematology.cz



Doporučení laboratorní sekce
České hematologické společnosti ČLS JEP

Doporučení pro vnitřní kontrolu kvality koagulačních vyšetření

Zpracoval: I. Hrachovinová, J. Zavřelová, M. Jelínková, M. Matýšková, I. Malíková,
J. Kratochvíla

Recenzent: Laboratorní sekce ČHS ČLS JEP

Schváleno Laboratorní sekcí ČHS ČLS JEP: 8.4.2016

Schváleno Výborem ČHS ČLS JEP: 4.5.2016

Aktualizace:

Verze: 1

Platnost od: 1.9.2016

Preventivní činnosti související s VKK

- Validace přístrojů
- Validace pipet
- Údržba přístrojů
- Záznamy do provozních deníků
- Kvalita diagnostik
- Verifikace metod

Typy kontrol

- Preciznost měření v čase (mezilehlá preciznost)
- Ověření funkčnosti reagenčního systému
- Reprodukovatelnost měření stejných metod na různých analyzátorech (mezipřístrojová kontrola)
- Preciznost v sérii (opakovatelnost)
- Pravdivost (správnost)

Preciznost

- je těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky opakovaných měření téhož vzorku
 - ↘ bez vztahu k cílové hodnotě/deklarovanému rozmezí
- Měření za podmínek
 - ↘ opakovatelnosti (preciznost v sérii)
 - opakovaná analýza stejného materiálu, stejnou metodou v krátkém časovém intervalu na stejném analyzátoru... (např. 10x)
 - ↘ reprodukovatelnosti
 - opakovaná analýza stejného materiálu v různém čase v provozních podmínkách laboratoře současně se vzorky pacientů, stejný analyzátor, stejná metoda (preciznost v čase, mezilehlá preciznost)
 - opakovaná analýza téhož materiálu v provozních podmínkách laboratoře současně se vzorky pacientů stejnou metodou na různých analyzátořech (mezipřístrojová kontrola)
- Číselným vyjádřením preciznosti je
 - ↘ směrodatná odchylka (SD) od aritmet. průměru (\bar{x}), variační koeficient (CV)
 - ↘ procentuální odchylka ($D_{\%}$)

Pravdivost

- Je těsnost shody mezi průměrnou hodnotou výsledků více měření a uvedenou cílovou hodnotou referenčního kontrolního materiálu
- Mírou pravdivosti je odchylka aritmetického průměru série výsledků měření od cílové hodnoty kontrolního materiálu (bias)

Požadavky na kontrolní vzorky

- Měření v jednom běhu současně se vzorky pacientů
- Analyzované složky musí být dostatečně stabilní
- Složení co nejvíce podobné vyšetřovaným vzorkům
- Zcela nezávislé na kalibračních materiálech
- Odlišné hladiny nelze získat různým ředěním téhož kontrolního materiálu!!!

Kontrolní materiál

- Firemní komerční materiál (lyofilizované)
 - ↘ referenční materiál
 - ↘ materiál s deklarovaným rozmezím hodnot
 - atestovaná kontrola
 - ↘ materiál bez deklarovaného rozmezí hodnot
 - neatestovaná kontrola
- V laboratoři připravený kontrolní materiál
 - ↘ šokově zmrazený nebo čerstvý
- Kontrolní materiály v rozmezí
 - ↘ fyziologických i patologických hodnot („normální“ a patologické)

Referenční kontrolní materiál

- Má pro daný test deklarovanou
 - ↘ cílovou hodnotu
 - ↘ nejistotu měření
 - ↘ metrologickou návaznost
 - ↘ použité postupy vyšetření
 - uvedeno v dokumentu vydaném způsobilou osobou nebo organizací (např. WHO)
- Je používán převážně pro **hodnocení pravdivosti**
- Značí se CRM, SRM..

Atestovaný kontrolní materiál

- S uvedeným
 - ↘ deklarovaným rozmezím hodnot pro jednotlivé parametry
 - ↘ nejistotou měření
 - ↘ použitými postupy vyšetření
 - ↘ metrologickou návazností na CRM nebo bez metrologické návaznosti
- Je v souladu s IVD MD (označen „CE“ značkou)
- Lze jej použít k **ověření funkčnosti reagenčního systému**

Neatestovaný kontrolní materiál

- Bez deklarovaného rozmezí hodnot pro jednotlivé parametry
- Mají uvedeno pouze S vymezením
 - ↘ parametry, pro které je kontrolní materiál určen
 - ↘ orientační vymezení hladiny parametrů
 - „normální a patologické“
- Je v souladu s IVD MD (označen „CE“ značkou)
- Lze jej použít ke stanovení **mezilehlé preciznosti** nebo **opakovatelnosti**

V laboratoři připravený kontrolní materiál

→ Směsná plazma

‣ počet dárců/jedinců je vázaný na účel použití v laboratoři

→ Vzorek jednoho dárce

→ Lze jej použít ke stanovení

‣ mezilehlé preciznosti

‣ opakovatelnosti

‣ reprodukovatelnosti měření stejných metod na různých analyzátořech.

VKK v koagulační laboratoři

- U každého typu kontroly v SOP uvedeno
 - ↘ účel měření
 - ↘ interval a četnost
 - ↘ kontrolní materiál
 - ↘ hodnocení měření
 - ↘ dokumentace měření

Preciznost v čase (mezilehlá preciznost)

→ Účel měření

- záchyt neúměrného vychýlení denních rutinních vyšetření (PT, APTT, TT, FBG, D-Di, AT, aXa)
- speciálních koagulačních vyšetření, která se provádí s větší frekvencí (např. F VIII)

→ Interval a četnost

- každé spuštění přístroje, nová šarže reagensie, servisní zásah (s vlivem na analýzu), nová lahvička reagensie, která se musí rekonstituovat
- minimálně 1x denně/po provedení 200 vyšetření

→ Kontrolní materiál

- komerční (neatestovaný)/připravený laboratoří
- dvě úrovně, dostatečné množství, zachování stability

Preciznost v čase (mezilehlá preciznost)

→ Hodnocení měření (statistické programy)

- ↘ průběžně průměr, SD, CV
- ↘ kontrolní rozmezí (průměr ± 2 SD)
- ↘ varovné rozmezí maxim.(průměr ± 3 SD)
- ↘ Westgardova pravidla (není běžné)

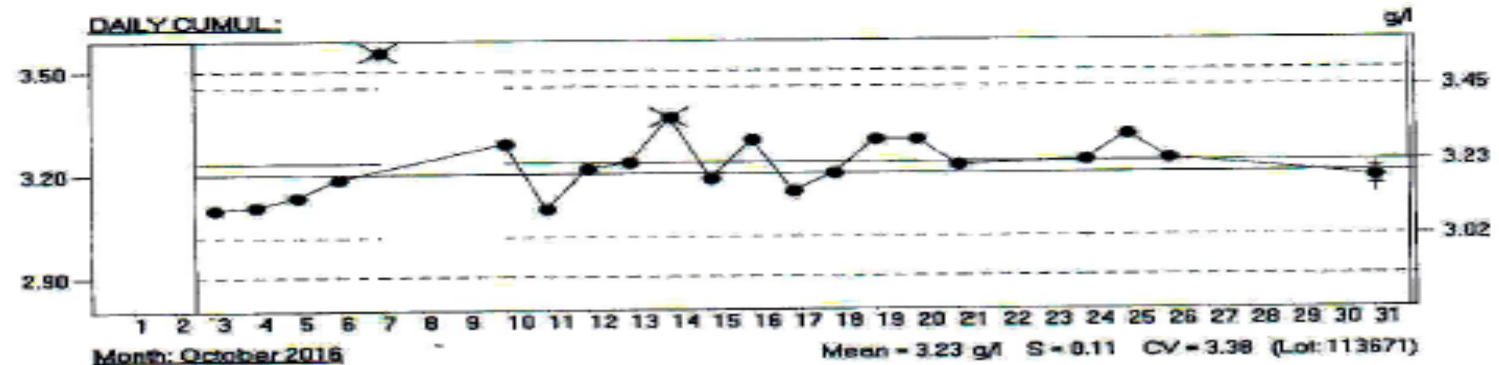
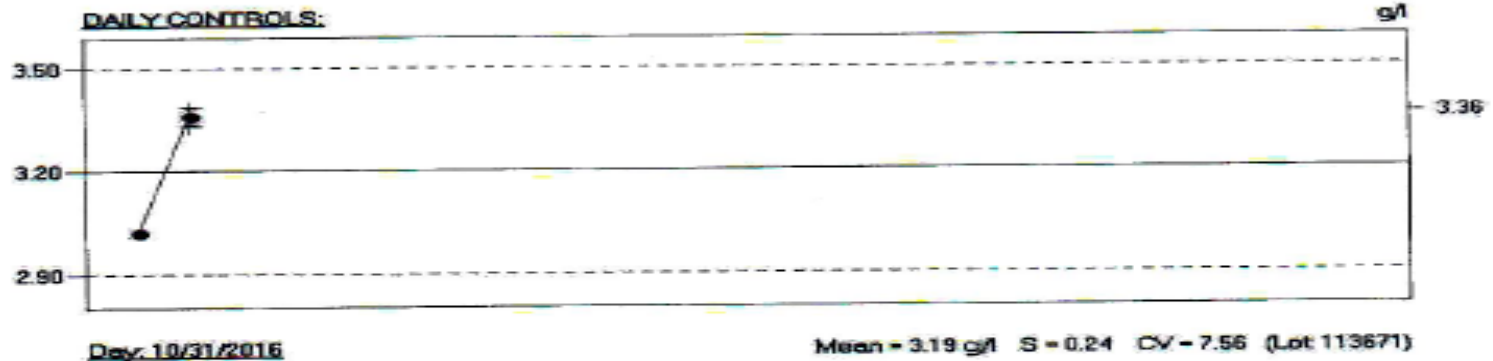
→ Dokumentace měření

- ↘ primární dokumentace s vyhodnocením průměr, SD, CV
- ↘ Levey-Jennings grafy
- ↘ formuláře s autorizovanými záznamy, vyhodnocením
 - SD (výběrová SD) vypočítaná metodou „n-1“
 - $SD = \sqrt{(\sum(x_i - \bar{x})^2 / n-1)}$, $CV = SD \times 100 / \bar{x}$
 - \bar{x} = aritmetický průměr, n = počet měření

Kontroly preciznosti v čase - Fbg

Methodology FBG Fibrinogen

Control Level 1: 12351 STA-COAG CONT N
10/31/2016, 11:28 AM: 3.36 g/l
Lot 113671 Min: 2.90 g/l Max: 3.50 g/l



Ověření funkčnosti reagenčního systému

→ Účel měření

- ↘ ověření zda výsledky pro daný měřicí systém jsou validní

→ Interval a četnost

- ↘ při změně šarže reagensie, při nové kalibraci metody
- ↘ minimálně 1x měsíčně u rutinních metod a s každou sérií vyšetření u speciální metod

→ Kontrolní materiál

- ↘ komerční (atestovaný)/připravený laboratoří se stanoveným cílovým rozmezím
- ↘ dvě úrovně, pokud jsou dostupné

Ověření funkčnosti reagenčního systému

→ Hodnocení měření

- ↘ výsledky v deklarovaném rozmezí

→ Dokumentace měření

- ↘ primární dokumentace

- ↘ formuláře s autorizovanými záznamy a deklarovaným rozmezím

Mezipřístrojové kontroly

→ Účel měření

- ↘ preciznost měření za podmínek reprodukovatelnosti zpravidla u rutinních testů dní

→ Interval a četnost

↘ po kalibraci metody

- v rámci ověření funkčnosti reagenčního systému

↘ při současném provozu a v době střídání provozu na různých analyzátorech

- v rámci mezilehlé preciznosti
- **minimálně 1x denně** vyšetřením 2 čerstvých vzorků (dle možnosti laboratoře)

→ Kontrolní materiál

- ↘ jakýkoliv kontrolní materiál včetně čerstvých vzorků
- ↘ dvě úrovně, pokud jsou dostupné

Mezipřístrojové kontroly

→ Hodnocení měření

- ↘ jeden analyzátor zvolit jako referenční
- ↘ $D_{\%}$ (procentuální odchylka výsledků měření analyzátorů vzhledem k referenčnímu analyzátoru)

→ Dokumentace měření

- ↘ primární dokumentace
- ↘ formuláře s autorizovanými záznamy a vyhodnocením

$D_{\%}$

- $D_{\%} = ((x - AV) / AV) \times 100$

- x = výsledek měření analyzátoru
- AV = vztažná hodnota referenčního analyzátoru

Preciznost měření v sérii (opakovatelnost)

→ Účel měření

- ↘ sledování správné funkce analyzátoru kontrolou všech typů a principů měření
 - dle doporučení výrobce přístroje (APTT, FBG,AT)

→ Interval a četnost

- ↘ 6-10 měření
- ↘ 1x za 6 měsíců u poloautomatických koagulometrů
- ↘ 1x ročně u automatických koagulometrů

→ Kontrolní materiál

- ↘ jakýkoliv kontrolní materiál včetně čerstvých vzorků
- ↘ 1-2 úrovně

Preciznost měření v sérii (opakovatelnost)

→ Hodnocení měření

↘ CV a/nebo σ (směrodatná odchylka vypočítaná metodou „n“)

- $\sigma = \sqrt{(\sum(x_i - \bar{x})^2) / n}$, $CV = \sigma \times 100 / \bar{x}$
- \bar{x} = aritmetický průměr, n = počet měření

→ Dokumentace měření

- ↘ primární dokumentace
- ↘ formuláře s autorizovanými záznamy a vyhodnocením CV a/nebo σ

Pravdivost měření (správnost)

→ Účel měření

- ↘ sledování těsnosti shody aritmetického průměru naměřených hodnot testu oproti cílové hodnotě referenčního materiálu
- ↘ pravdivost kvantifikuje systematickou chybu měření
- ↘ je součástí verifikace a validace metody

→ Interval a četnost

- ↘ alespoň 6 měření za podmínek opakovatelnosti
- ↘ minimálně 1x ročně

→ Kontrolní materiál

- ↘ referenční materiál
- ↘ 1-2 úrovně

Pravdivost měření (správnost)

→ Hodnocení měření

↘ **bias_%** (vychýlení aritmetického průměru výsledků měření oproti cílové hodnotě referenčního materiálu)

→ Dokumentace měření

↘ primární dokumentace

↘ formuláře s autorizovanými záznamy a vyhodnocením bias_%

- $\text{bias}_{\%} = ((x - C_{\text{ref}})/C_{\text{ref}}) \times 100$
 - x = aritmetický průměr výsledků měření
 - C_{ref} = cílová hodnota referenčního materiálu

Kriteria pro vyhodnocení kontrol

- **Doporučení výrobců** přístrojů a diagnostických setů
- **Laboratoř** si stanoví **vlastní kriteria** dle výsledků vlastního provádění IKK
 - ↘ povolené rozmezí, maximální CV, SD, σ , D_{Max}
- **Doporučení SEKK pro D_{Max}**
- Vyhodnocení kontrol dle kritérií
 - ↘ bezprostředně
 - ↘ sledování trendů