

# **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)

- ↘ připravená laboratoří

# 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 kódem 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 (u většiny)
    - 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](http://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. Maliková,  
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, *revize 1*

**Platnost od:** *20.11.2020*

# 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
  - ↘ 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 analyzátorech

# 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  $\pm$  2 SD)
- ↘ **varovné rozmezí** maxim.(průměr  $\pm$  3 SD)
- ↘ Westgardova pravidla (není běžné)

## → Dokumentace měření

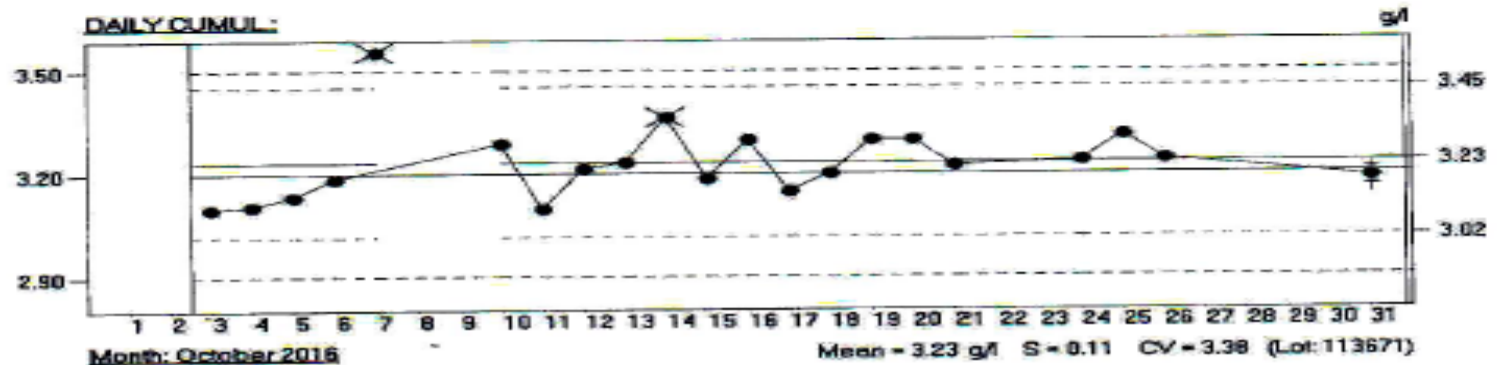
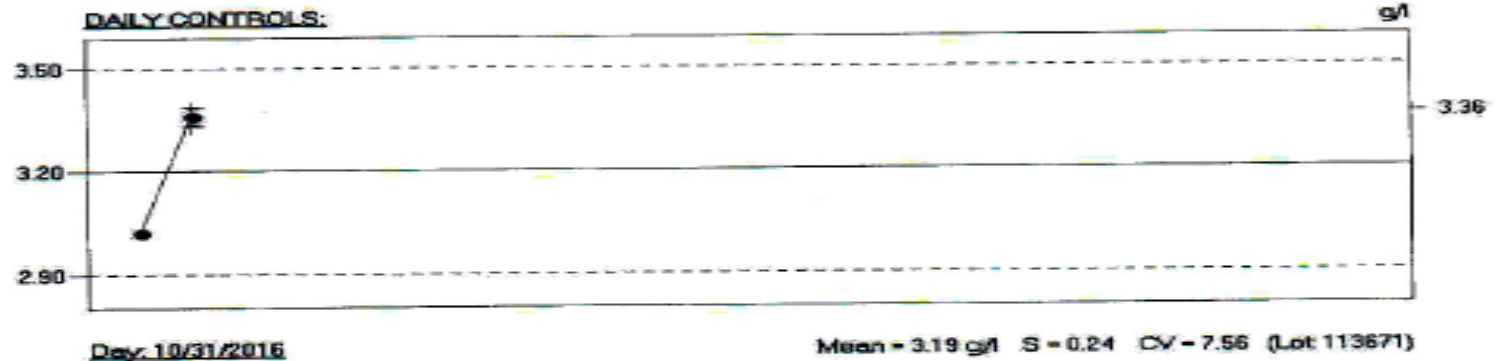
- ↘ primární dokumentace s vyhodnocením průměr, SD, CV
- ↘ Levey-Jennings grafy
- ↘ formuláře s autorizovanými záznamy, vyhodnocením
  - SD (výběrová SD) vypočítaná metodou „n-1“
  - $SD = \sqrt{(\sum(x_i - \bar{x})^2 / n-1)}$ ,  $CV = SD \times 100 / \bar{x}$ 
    - $\bar{x}$  = aritmetický průměr,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

## → Interval a četnost

### ↘ po kalibraci metody

- v rámci ověření funkčnosti reagenčního systému

### ↘ při současném provozu a v době střídání provozu na různých analyzátořech

- 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  $\sigma$  (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  $\sigma$

# 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<sub>%</sub>** (vychýlení aritmetického průměru výsledků měření oproti cílové hodnotě referenčního materiálu)

## → Dokumentace měření

- ↘ primární dokumentace
- ↘ formuláře s autorizovanými záznamy a vyhodnocením bias<sub>%</sub>
  - $\text{bias}_{\%} = ((x - C_{\text{ref}})/C_{\text{ref}}) \times 100$ 
    - $x$  = aritmetický průměr výsledků měření
    - $C_{\text{ref}}$  = 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,  $\sigma$ ,  $D_{Max}$
- Doporučení SEKK pro  $D_{Max}$
- Vyhodnocení kontrol dle kritérií
  - ↘ bezprostředně
  - ↘ sledování trendů