

Kalibrace analytických metod

Petr Breinek

- Měřicí zařízení (zjednodušeně přístroje) pro měření fyzikálních veličin musí být výrobcem kalibrována

Objem: pipety

Teplota (+37°C ± definovaná přesnost)

Hmotnost: váhy

Čas (?),

- Pro účely akreditace: *verifikace (ověření)*
 - *certifikát* (Český metrologický institut)
 - v laboratoři

Měření vlastností (především koncentrace)
chemických látek a kalibrace měřících
systémů v klinických laboratořích
je obtížnější

Výrobci měřících systémů

- **IVD MD**

(in vitro diagnostic medical devices)

- zákonný předpis **98/79 EC**

(reguluje výrobu, vlastnosti a prodej zařízení vyráběných a prodávaných k posuzování zdraví a chorob in vitro)

- označení **CE** = potvrzení shody vlastností výrobku se zákonným předpisem

IVD MD 98/79 EC

- Týká se výrobců
- Je vyžadována **návaznost** hodnot pracovních kalibrátorů a povinnost poskytnutí dat výkonnostních charakteristik měřících postupů, včetně **postupu kalibrace**

(realizace návaznosti je popsána v normách ISO 17511 a ISO 18153)

Validace a verifikace

Výrobci mají povinnost provádět validaci

Laboratoř musí validované metody
IVD MD 98/79 EC verifikovat (ověřovat)

Pokud laboratoř používá vlastní měřicí metody, musí je validovat (to je poměrně velký problém)

Kalibrace

Definice:

Soubor úkonů, kterými se za specifických podmínek stanoví **vztah mezi hodnotami veličin**, které jsou **indikovány měřícím přístrojem** nebo měřícím systémem nebo referenčním materiálem **a odpovídajícími hodnotami kalibrátorů**

Zjednodušeně:

Kalibrace určuje vztah mezi měřeným signálem (např. absorbancí) a množstvím (koncentrací) zjišťované látky (analytu).

Tento vztah je definován **matematickým modelem (kalibrační funkcí)**

- Zajišťuje přenos hodnot z referenčních materiálů/metod do rutinní laboratoře (kalibrace je nástrojem **návaznosti**)

Kalibrátory

- Primární kalibrátory
- Certifikované referenční materiály (CRM)
- Sekundární kalibrátory
- Pracovní kalibrátory výrobce
- Kalibrátory dodávané výrobcí

Ideální kalibrátor

- Hodnoty odvozené srovnáním s CRM (certifikovaný referenční materiál) nebo stanovenými referenčními metodami
- Komutabilní (bez vlivu matrice)
- S udanou nejistotou hodnot

Kalibrační funkce

- Výsledkem kalibrace je kalibrační funkce
 $y = f(x)$
y.....signál
x.....koncentrace
- Grafickým znázorněním této závislosti je kalibrační křivka
- Ze signálu potom lze vypočítat (určit) koncentraci (množství) sledovaného analytu

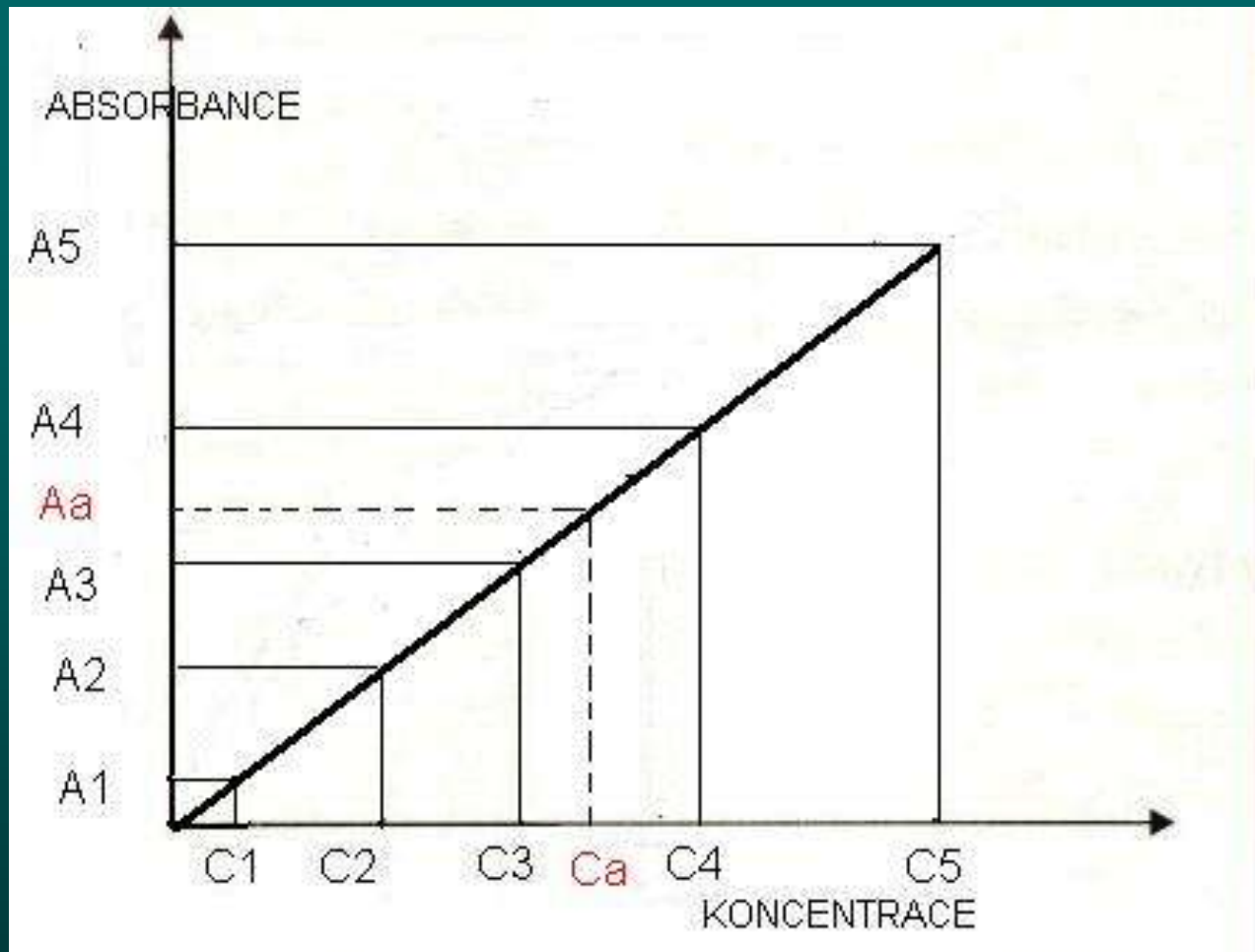
Kalibrační funkce

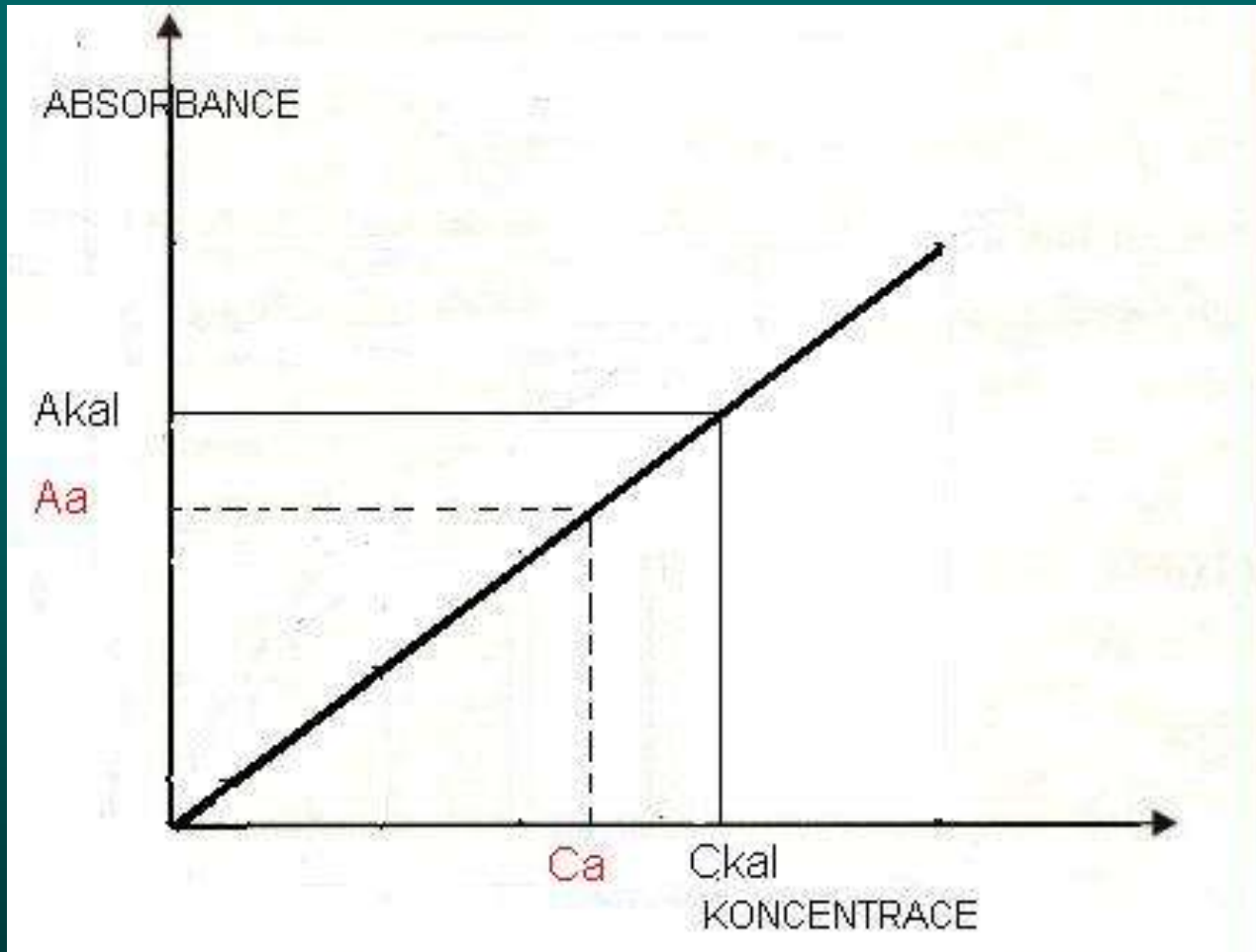
- **Lineární**
- **Nelineární**

Vyhodnocení:

- Manuální
- **Počítačové programy**

- Přednost se dává lineárním funkcím (závislostem)
- Vypočítá se **regresní analýzou** (statistická technika porovnání metod)





$$C_a = C_{kal} \cdot A_a / A_{kal} = A_a \cdot \text{faktor}$$

$$\varepsilon = A / c \cdot l$$

Rovnice lineární regresní analýzy

$$Y = a + b.X$$

Y.... signál (např.absorbance)

X.... koncentrace analytu

a.... úsek na ose y (**intercept**)

b.... směrnice přímky(**slope**)

(a...by měla být blízká nule)

Lineární regresní analýzou můžeme kontrolovat (ověřovat) linearitu kalibrace

Pomáhají i metody korelační analýzy (= metoda, která studuje vztah mezi dvěma proměnnými hodnotami)

- ***Pasing-Bablokova regrese***
- ***Demingova regrese***

Korelační koeficient (r): statistická charakteristika udávající těsnost vztahu mezi dvěma proměnnými

Hodnoty: $-1 \leq r \leq +1$ minimálně $r > 0,985$)
ideálně $r = 1,0000$

Koeficient determinace (r^2): vyjadřuje z jaké části lze vztah mezi dvěma proměnnými nahradit matematickým vztahem

Nelineární funkce

- Typická např. pro imunochemické metody
- Kalibrace obvykle realizována šesti kalibrátory
- Proložení kalibrační křivky
 - spline
 - logit-log-1, logit-log-2, logit-log-3
 - kvadratický model
 - kubický model

Calib.curve info.

Test name

CRP-U

Calc.mthd.

ABS

1-point

Multi-point

Axis conv.

No conv.

Log.-linear

Log.-log.

Multipoint
Formula

Linear

Quadratic

Cubic

Spline

Line graph

LOGIT-LOG-1

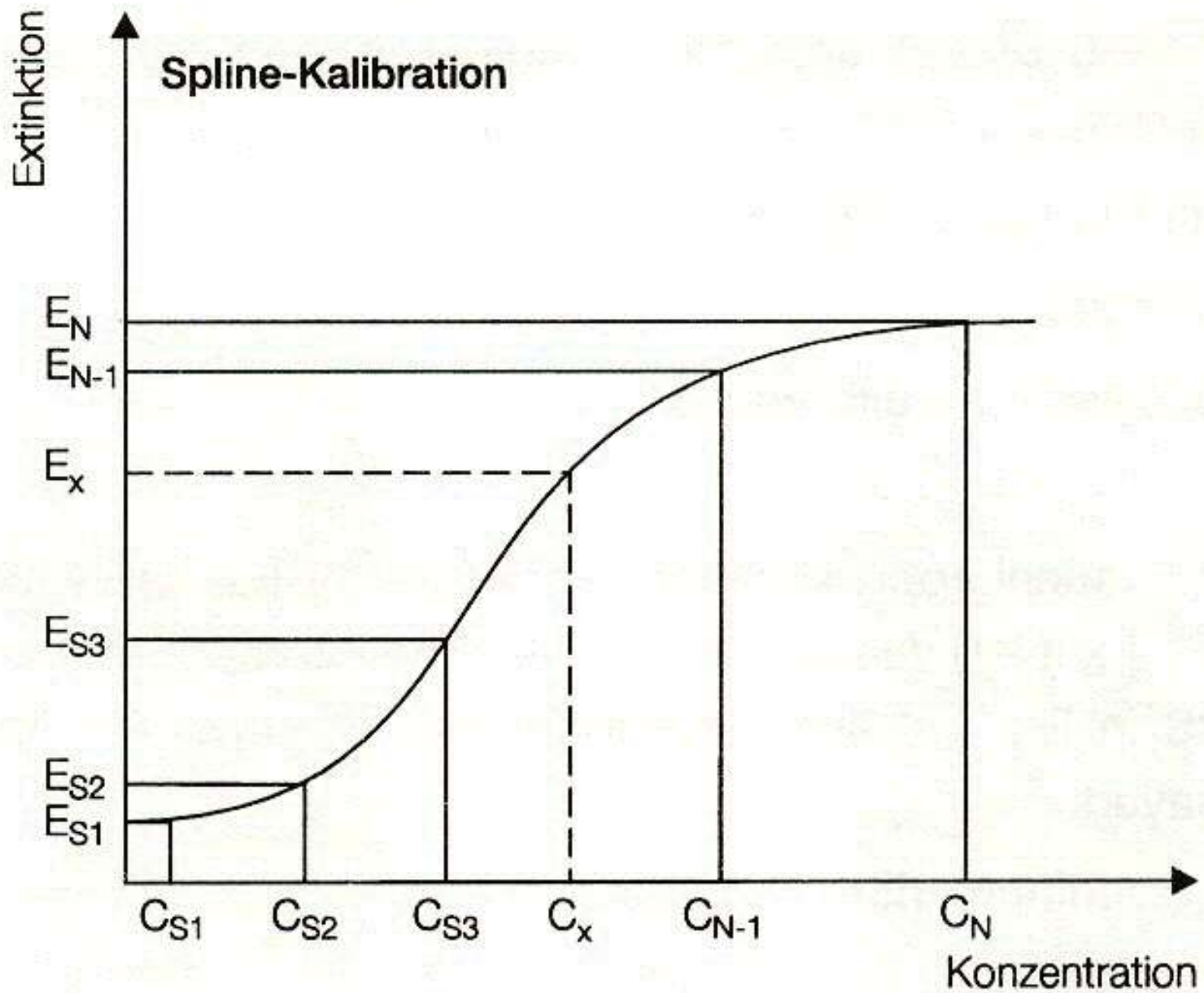
LOGIT-LOG-2

LOGIT-LOG-3

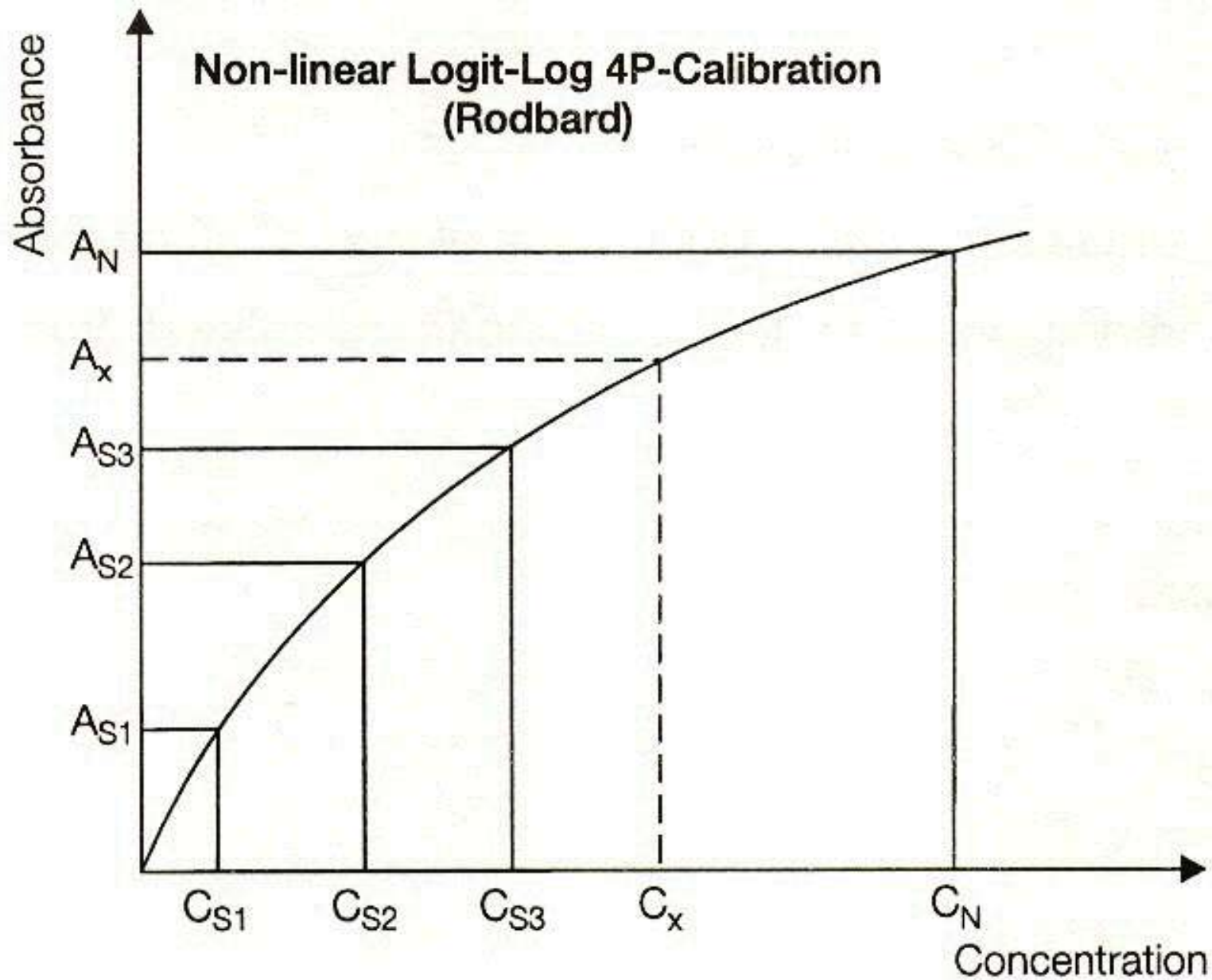
cal stds

6





Non-linear Logit-Log 4P-Calibration (Rodbard)



Statistické (počítačové) programy

- Analyse-It®
- MedCalc ®
- CBstat®
- ADSTATLabo®
- Excel,....

Používá se parametrický (Pearson) nebo neparametrický přístup (Spearman, **Passing-Bablok**,...)

Počet a rozmístění kalibrátorů, rozsah kalibrace

- dodržovat postup kalibrace výrobcem
IVD MD 98/79 EC
- počet: 1, 3 (L-M-H), 6
(při validaci 10 – 15)
- $n = 1, 2, 3$ (při validaci až 5)

- **Rozsah kalibrace**

(pracovní rozsah měření):

Interval koncentrací, v němž lze dosáhnout požadované hodnoty přesnosti a pravdivosti měření

Meze: dolní a horní mez stanovitelnosti

Kontrola kalibrace a četnost kalibrací (rekalibrace)

- Analýza kontrolních materiálů
- Dodržovat doporučení výrobců
- VKK
- Kontrolní grafy (regulační diagramy)

Rekalibrace

- nová šarže reagensů
- doporučené údaje výrobce
- výsledky kontrolních vzorků mimo povolené rozmezí, ...
- výměna některých částí měřicího zařízení (např. dávkovače, elektrody)

Nejčastější nedostatky kalibrátorů pocházející od výrobce

- Hodnoty bez návaznosti na referenční materiál (metody)
- Návaznost není řádně provedena a dokumentována
- Rozdíly mezi šaržemi
- Různé hodnoty v závislosti na použité metodě

Nejčastější chyby kalibrace

- Korekce kalibrace na hodnoty kontrolních materiálů
- Používání kalibračních faktorů (údaj výrobce) bez jejich verifikace
- Malý počet (četnost) měření kalibrátorů
- Nedostatky při práci s kalibrátory