

Kalibrace analytických metod

Miroslava Beňovská

➤ **Měřicí zařízení** (zjednodušeně přístroje)
pro měření fyzikálních veličin musí být
výrobci kalibrovaná

Objem: pipety

při definované teplotě (+37 C definovaná
přesnost)

Hmotnost: váhy

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

Směrnice rady IVD 98/79/ES

- **Soubor pravidel pro způsobilost výrobců laboratorních diagnostik a zařízení**
- **Je vyžadována návaznost hodnot pracovních kalibrátorů a povinnost poskytnutí dat výkonnostních charakteristik měřících postupů, včetně postupu kalibrace**
- **Grafickým symbolem shody vlastností výrobku s požadavky formulovanými Směrnicí 98/79/ES je „CE“ značka**

(realizace návaznosti je popsána v normě ISO 18153)

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 (Wikipedie)

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
- **Je nástrojem návaznosti**
- Ne pro všechny analyty existují referenční materiály

Kalibrátory

- **Primární kalibrátory** - připraveny z čisté substance
- **Sekundární kalibrátory** - hodnota přiřazena pomocí referenčního měřícího postupu (např. multikalibrátory v klinické laboratoři jsou sekundární matricové kalibrátory pro základní analyty)

Kalibrátory

- Primární kalibrátory - připraveny z čisté substance
- Certifikované referenční materiály (CRM)
 - návaznost, nejistota
- Pracovní kalibrátory výrobce
- Kalibrátory dodávané výrobcí - včetně multikalibrátorů

Ideální kalibrátor v laboratoři

- Hodnoty
 - odvozené srovnáním s CRM (certifikovaný referenční materiál) nebo
 - stanovené referenčními metodami
- Komutabilní (matrice shodná s matricí biologických vzorků)
- S udanou nejistotou hodnot

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

Kalibrační funkce

- **Lineární**
- **Nelineární**

Vyhodnocení:

- Manuální
- Software

Způsoby kalibrace

Automatické analyzátory umožňují např. tyto typy kalibrace:

- Lineární dvoubodovou (případně třibodovou) – pro **fotometrické metody**
- Nelineární – **pro turbidimetrické, imunoturbidimetrické, imunonefelometrické a imunoanalytické metody**

Příklady: Logit-log 4P

Logit-log 5P

RCM2T2 exponenciální funkce

Spline

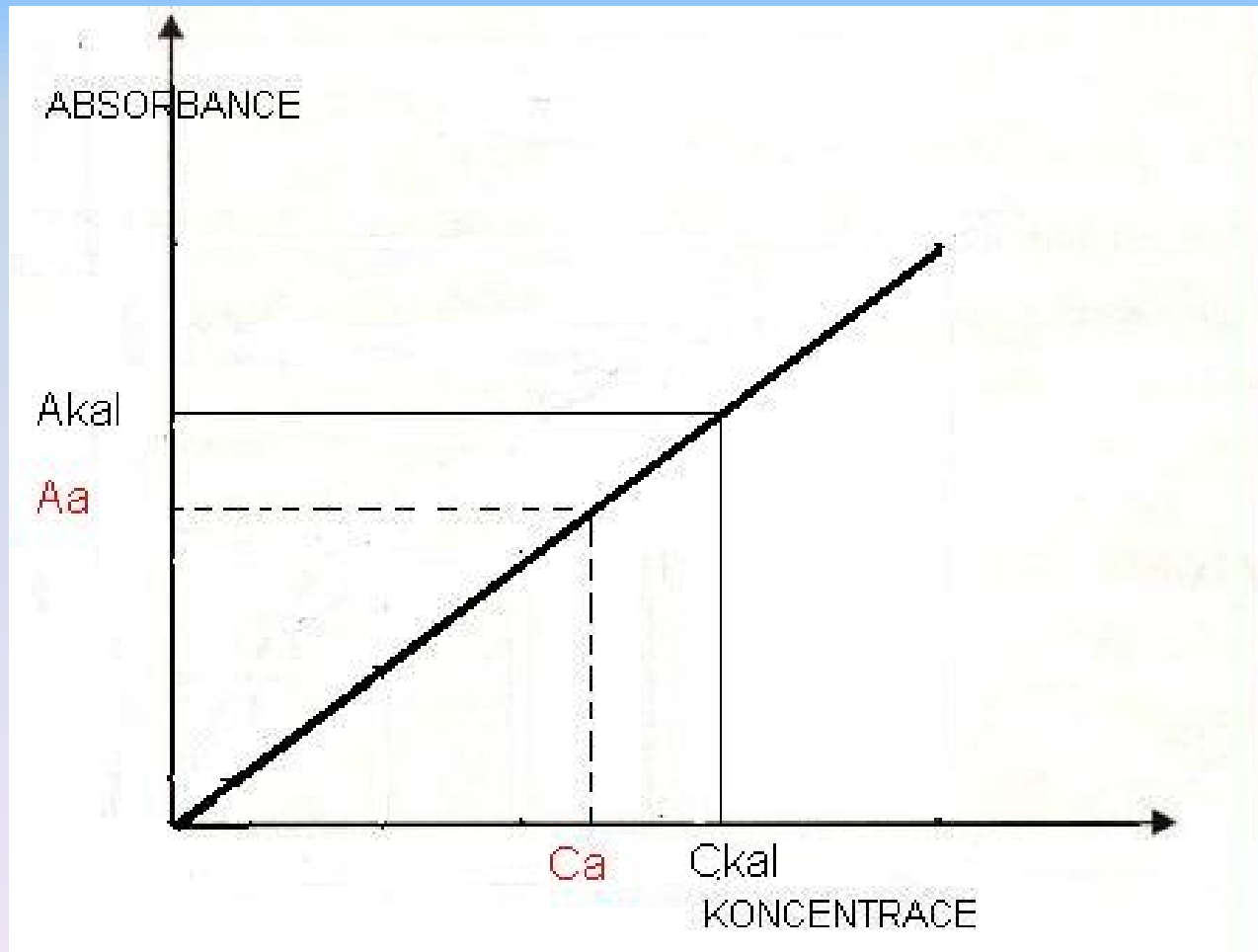
- ISE (třibodová)

Na analyzátor je třeba **nainstalovat** každou šarži kalibrátoru **Kalibrátory Roche a Siemens mají pro každou šarži jedinečné čárové kódy** využívané při analýze

Kalibrační křivka

Je **grafickým znázorněním** závislosti měřeného signálu na měřené vlastnosti analytu (např. koncentraci)

- Přednost se dává lineárním funkcím
- Průběh křivky se vypočítá **regresní analýzou**



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

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

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)

Workplace

Reagent

Calibration

QC

Utility

Overview

Status

Calibrators

Install



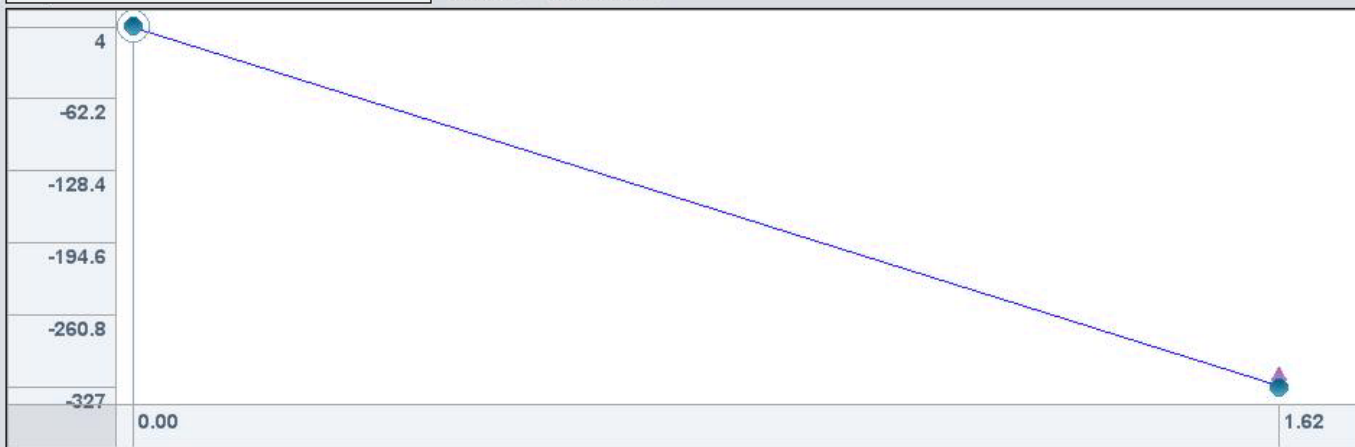
Working Information

Test	Module	Calibration Type	R1 R. P. Lot ID	R1 R. P. Seq. No.	R2 R. P. Lot ID	R2 R. P. Seq. No.	R3 R. P. Lot ID	R3 R. P. Seq. No.
AST	C2[B2 B2]	Linear	614617	0007439			614617	0007439

S1 Abs.	K	A	B
4	-4908		

L	H	I

Scale: Automatic



Point	Abs. 1	Abs. 2	Update Factor 1	Update Factor 2
1	4	4		

Scale

Close

Select a plot from the graph.

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**

Workplace

Reagent

Calibration

QC

Utility

System

Maintenance

Application

Calc. Test

Special Wash

Report Format

Module Set

Test	
	D Ser/PI
3	CHOL P Ser/PI
4	GLU P Ser/PI
	Urine
	CSF
	D Ser/PI
5	LDH P Ser/PI
	D Ser/PI
6	MG P Ser/PI
	Urine
7	S.I. P Ser/PI
8	TG P Ser/PI
	D Ser/PI
9	UREA P Ser/PI
	Urine
	D Ser/PI
10	OPI3Q P Urine
11	IGG P Ser/PI
12	ALB P Ser/PI

Analyze

Calib.

Range

Others

Calibration Type

Point

Span

Weight

Update Type

Isozyme Q Channel

Auto Calibration

Timeout

Blank

Span

2 Point

Full

SD Limit

Duplicate Limit % Abs.

Sensitivity Limit

S1 Abs. Limit

Auto Masking

Changeover

Module

Lot

Bottle

Save

Delete

Read Barsheet

Help

Select the test from the list box.



Stop

Logoff

S. Stop

Alarm

Print

Start

NUM

Figure G-286 Calib sub-screen (Photometric Test)

Touch the Status tab on the Calibration screen to display the Status screen.

Host: Core ISE D1 P1 E1 Stand By admin 02/01/28 (Mon) 22 30

Workplace Reagent Calibration QC Utility

Status Calibrator Install

Module: All Remaining Time: 20

Module	Dt.	Test	Callb. method	Cause
D1	P1	ALT	2 Point	Timeout
D1	E1	LDH		
D1	ISE	AST		
D1	4	UREA		
D1	5	GLU		
P1	1-1	CHOL	Blank	Calib Now
P1	1-2	GLU	2 Point	Timeout
P1	1-3	GLU	2 Point	Calib Now
P1	1-5	CHOL	Blank	Calib Now
P1	1-6	GLU	2 Point	Calib Now
P1	1-7	S.I.		
P1	1-8	OPI3Q		
P1	1-9	LDH	2 Point	Timeout
P1	1-12	MG	2 Point	Timeout

Method: Blank, 2 Point, Full, Span

Buttons: Start Up, Stop, Logoff, S. Stop, Alarm, Print, Start, Save, Calib Trace, Calibration Result, Reaction Monitor, Instrument Factor, Start Up Setting, Reject, Release, Help

NUM

Figure G-92 Status screen

Workplace

Reagent

Calibration

QC

Utility

System

Maintenance

Application

Calc. Test

Special Wash

Report Format

Module Set

Test

- D Ser/PI
- 3 CHOL P Ser/PI
- 4 GLU P Ser/PI
- Urine
- CSF
- D Ser/PI
- 5 LDH P Ser/PI
- D Ser/PI
- 6 MG P Ser/PI
- Urine
- 7 S.I. P Ser/PI
- 8 TG P Ser/PI
- D Ser/PI
- 9 UREA P Ser/PI
- Urine
- D Ser/PI
- 10 OPI3Q P Urine
- 11 IGG P Ser/PI
- 12 ALB P Ser/PI

Analyze

Callb.

Range

Others

Standards

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
Calibrator Code	501	401	0	0	0	0
Concentration	0.0	470				
Rack No. - Pos.	S0002-1	S0002-2				
Sample Volume	5.0	5.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Diluted S. Volume	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Diluent Volume	0	0	0	0	0	0

Save

Delete

Read Barsheet

? Help

Select the test from the list box.

Stop

Logoff

S. Stop

Alarm

Print

Start

NUM

Figure G-288 Others sub-screen

Calibration Result (Photometry)

Calibration Type

Linear

Reagent

R1

Lot No.

624528

Seq. No.

34560

Position

1-1

Test	Module	S1 Abs.	K	A	B	C	L	H	I
ALT	D1	-2	-56477						
ALT	P1	4	-54500						
CHOL	P1	1436	5590						
CHOL	P1	1427	5547						
GLU	D1	28	323						
GLU	P1	28	325						
GLU	P1	11	329						

S1 Abs.

K

1436

5590

Cancel

Working
Information

Update

OK

Figure G-269 Calibration Result (Photometry) window

Remote Control

Stand By ruti 30/09/2015 19:27 ? Help

Workplace Reagent Calibration QC Utility Overview

System Maintenance Application Special Wash System Configuration

Chemistry Immune Calib. ▾

No.	Test	Module	S. Type
1	GGT12	c 702	Ser/PI
2	GLUC3	c 702	Ser/PI
			Urine
			CSF
3	A1AT	c 702	Ser/PI
4	ALB2	c 702	Ser/PI
5	ALP2L	c 702	Ser/PI
6	ALT	c 702	Ser/PI
7	AMYL	c 702	Ser/PI
			Urine
8	APOB	c 702	Ser/PI
9	AST	c 702	Ser/PI
10	BILT3	c 702	Ser/PI
11	LPA2	c 702	Ser/PI
12	C3C	c 702	Ser/PI
13	C4	c 702	Ser/PI
14	BILD2	c 702	Ser/PI
15	CK	c 702	Ser/PI

Auto. Calibration

Mandatory Calibration Settings:

Changeover
Lot: Cancel ▾
R. Pack: Blank ▾

Preference Calibration Settings:

Timeout
Lot: Cancel ▾
0 Days ▾
R. Pack: Cancel ▾
0 Days ▾

If a calibration has failed

Auto. Masking

Limit Value

SD Limit: 0.1
Duplicate Limit: 5 % 10 Abs.
Sensitivity Limit: 48 - 126
S1 Abs. Limit: -32000 - 32000

Calibration Method

Type: Linear ▾
Point: 2
Span: 2
Weight: 0
RCM Weight: 0.000 0.000 0.000
0.000 0.000 0.000
Update Type: None ▾
Update Point: 0 0

Delete Download Save

Instrument

data manager

e-library

Stop

Logoff

S.Stop

Alarm

Monitor

Print

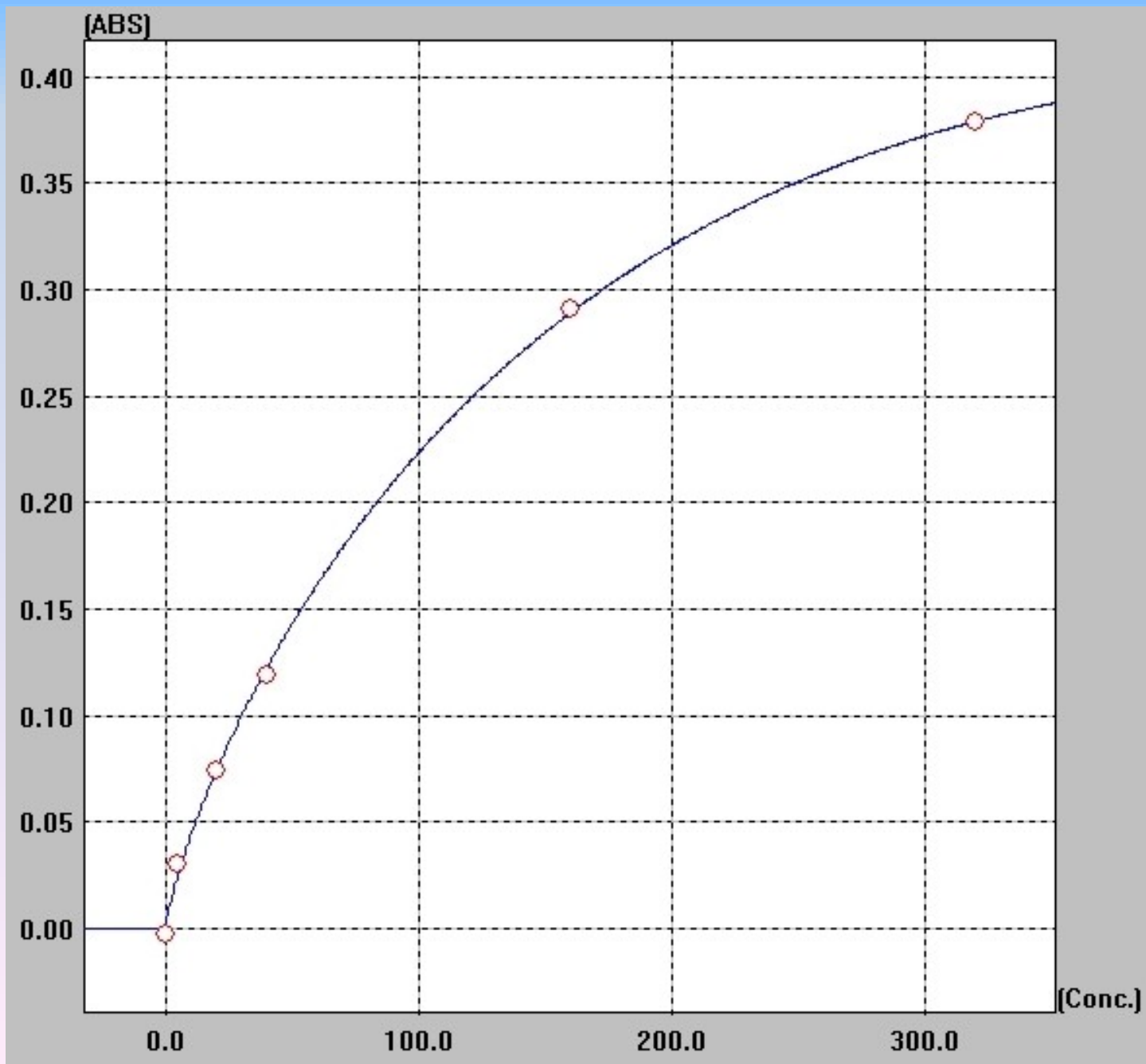
Start

Select a page from the list.

Navigation icons: Home, Camera, Search, Chat, Print, Refresh

Nelineární funkce

- **Typická pro imunoanalytické metody** –
imunoturbidimetrie, imunonefelometrie, imunoanalýza
- Kalibrace v klinické laboratoři obvykle realizována šesti kalibrátory
- Proložení kalibrační křivky
 - spline**
 - logit-log-1, logit-log-2, logit-log-3**
 - RCM2T2 exponenciální funkce**
 - 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



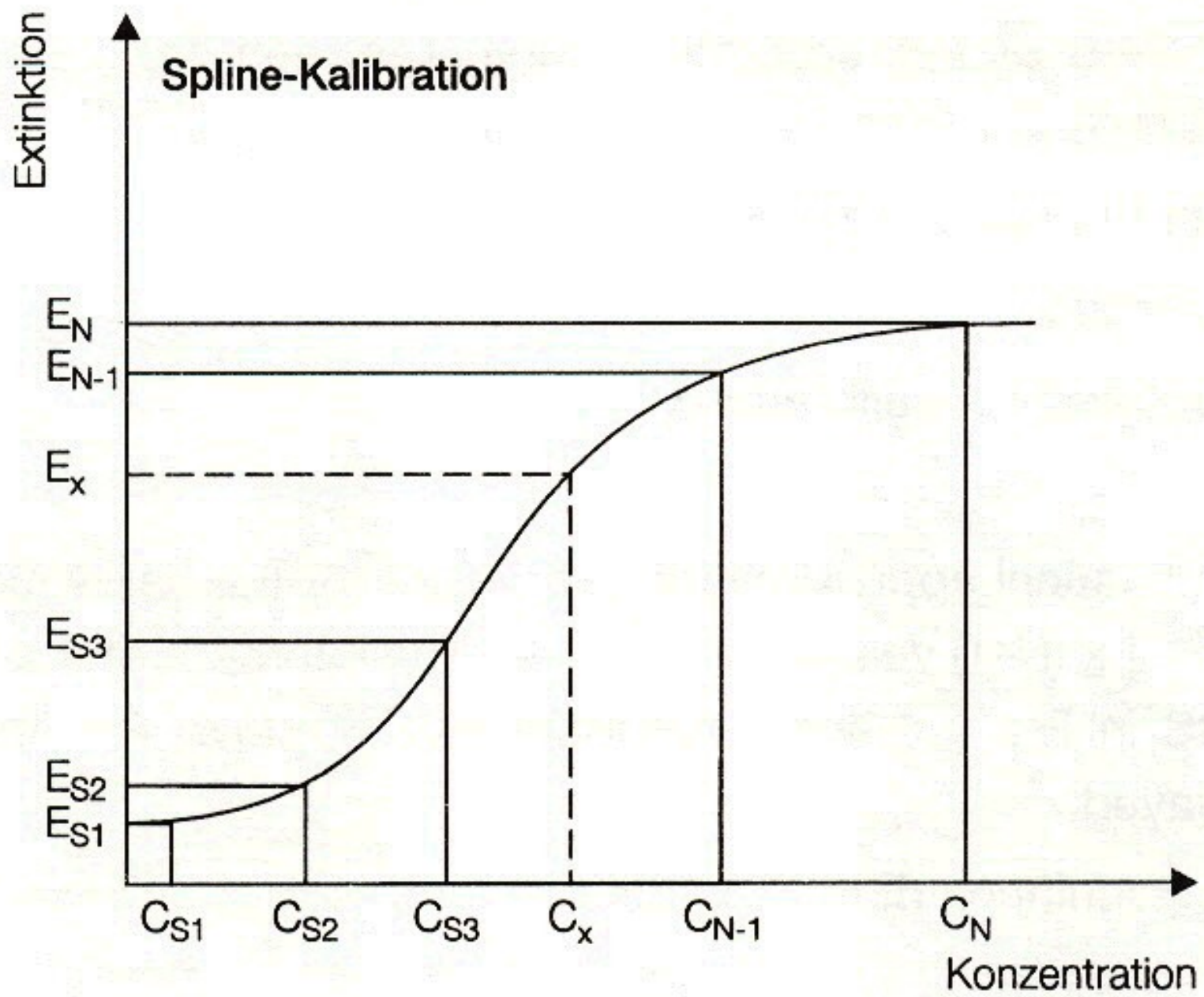
LOGIT-LOG-2



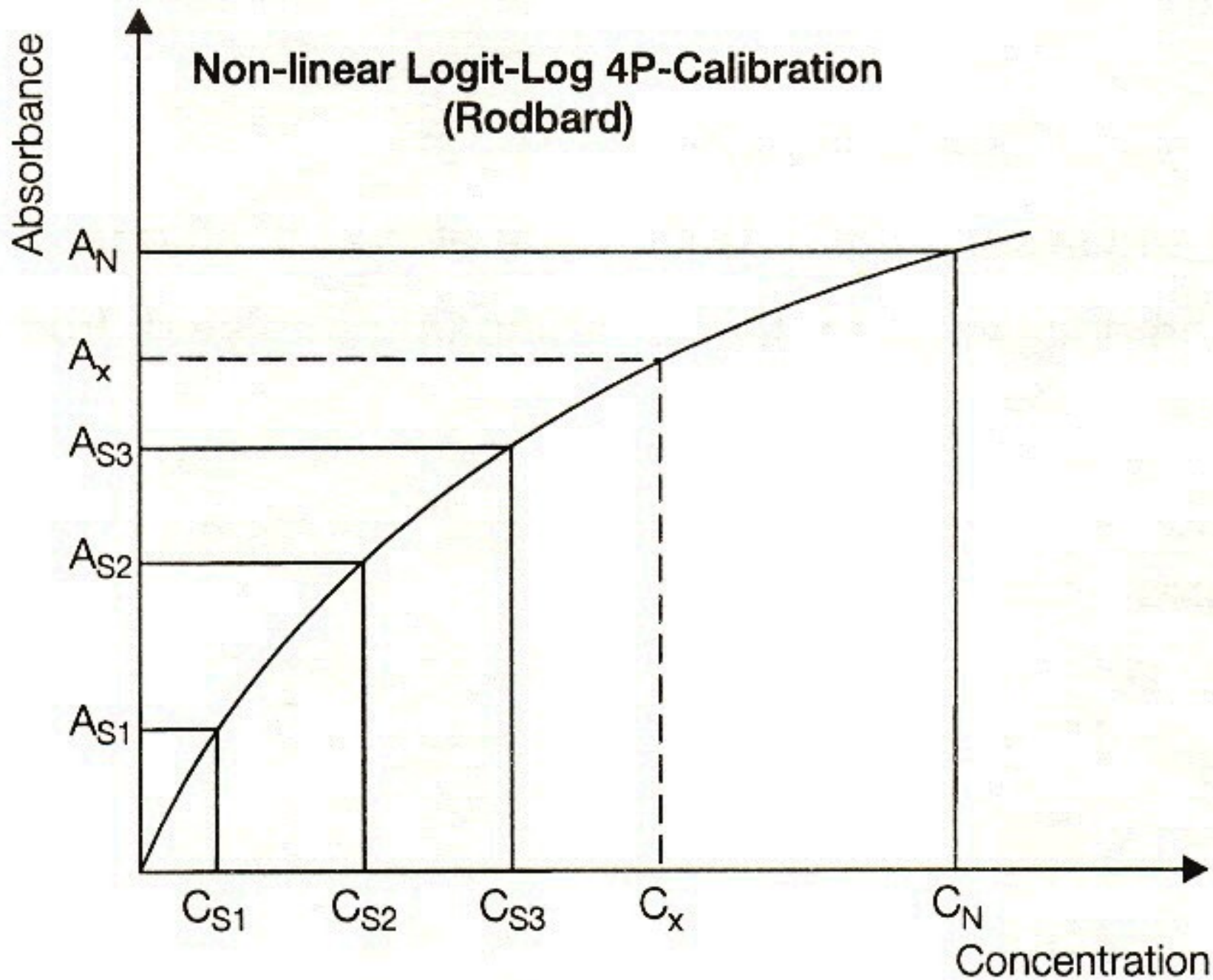
LOGIT-LOG-3

cal stds

6



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





Stop



Logout



S.Stop



Alarm



Monitor



Print



Start

History

Report Name	Date/Time
Calibration Monitor[C1-B_...	30/09/2015 00:14:19
Calibration Monitor[C1-B_...	30/09/2015 00:14:12
Calibration Monitor[C1-B_...	30/09/2015 00:14:04
Calibration Monitor[C1-B_...	30/09/2015 00:13:58
Calibration Monitor[C1-A_...	30/09/2015 00:13:56
Result List	29/09/2015 19:58:41
Result List	29/09/2015 18:24:34
Result List	29/09/2015 15:59:00
Result List	29/09/2015 15:58:54
Result List	29/09/2015 14:56:14
Result List	29/09/2015 14:56:10
Result List	29/09/2015 14:55:39
Result List	29/09/2015 14:55:36
Result List	29/09/2015 08:18:59
Result List	29/09/2015 07:50:43
Calibration Monitor[C2-A_...	29/09/2015 00:27:01
Calibration Monitor[C2-B_...	29/09/2015 00:26:59
Calibration Monitor[C2-A_...	29/09/2015 00:26:53
Calibration Monitor[C2-B_...	29/09/2015 00:26:51
Calibration Monitor[C2-A_...	29/09/2015 00:26:46
Calibration Monitor[C2-B_...	29/09/2015 00:26:44

cobas 8000		Roche		HITACHI	
Calibration Monitor		Operator ID: ruti		29/09/2015 00:26	
29/09/2015 00:26:43		C2-B		ruti	
Test	SD Value	Calib. Alarm			
AI AT	36				
Calibration Result					
	Calib. Lot ID	Abs. 1	Abs. 2	Initial Abs. 1	Initial Abs. 2
Std (1)	999999	164	167	197	200
Std (2)		1000	988	0	0
Std (3)		1544	1572	0	0
Std (4)		2495	2502	0	0
Std (5)		3337	3278	0	0
Std (6)		4100	4195	0	0
Calibration Factor					
	S1 Abs.	K	A	B	
	-11303	2.295E+4	1.401E-1	6.762E-1	
Reagent Pack					
	R1	R2	R3		
Lot ID	606096	---	606096		
Seq. No.	0000885	---	0000885		
Update Factor					
	Factor 1	4			
	Factor 2				

Select reports from the list.

cobas 8000



HITACHI

Calibration Monitor

Operator ID: rein

10/06/2020 08:54

10/06/2020 08:54:29 CI-A rein

Test	SD Value	Calib. Alarm
AMP	79	

Calibration Result

	Calib. Lot ID	Abs. 1	Abs. 2	Initial Abs. 1	Initial Abs. 2	Alarm
Std (1)	389879	7728	7787	17308	17391	
Std (2)	389879	6672	6694	15901	15981	
Std (3)	389879	5640	5846	14759	15003	
Std (4)	389879	4932	4018	14170	13858	
Std (5)	389879	3830	3873	12908	12599	
Std (8)	389879	3504	3511	12494	12396	

Calibration Factor

S1 Abs.	C	A	B
7766	6.648E+2	1.151E+0	3.123E+3

Reagent Pack

	R1	R2	R3
Lot ID	460130	460130	_____
Seq. No.	0007779	0007779	_____

Update Factor

Factor 1

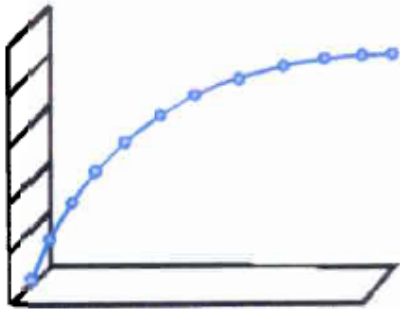
Factor 2

Kalibrace na imunochemických analyzátorech (Roche)

- **K výpočtu koncentrace stanovovaných analytů - nelineární kalibrační závislosti**
- **Využití kubických polynomů**
- **Master křivka od výrobce - zákazník ji při kalibraci pouze koriguje na aktuální podmínky (dvě hladiny)**

Elecsys® - The Master Calibration Process at Roche Diagnostics

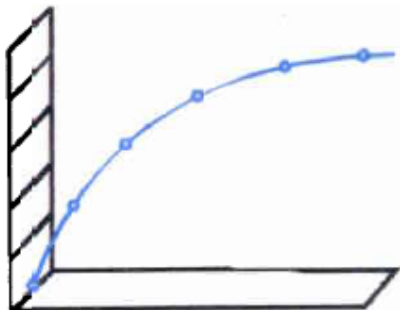
Reference Standardization once



**Reference: gold standard (e.g. WHO material),
10 - 12 concentration values
(much wider range than reportable range).**

➔ read values for master calibrators (copies of gold standards)
to secure reproducible reference to gold standards

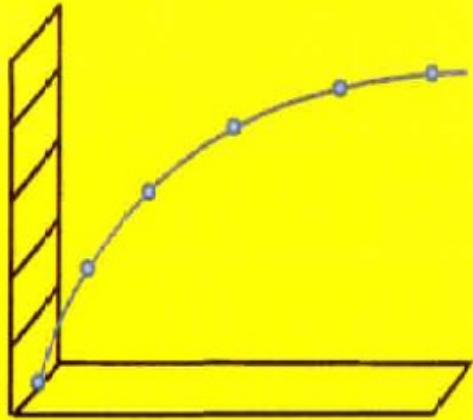
Lot specific Master Calibration for each lot



**Reference: master calibrators, 5 - 6 concentration values
(range wider than reportable range).**

➔ read values for a) Calset Calibrators
b) Rodbard parameters: a,b,c,d ➔ Roche-Barcode

Master calibration



Master calibration
performed by Roche

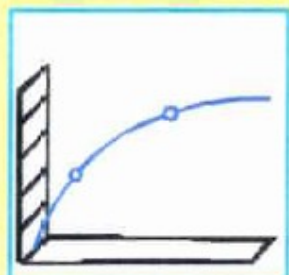
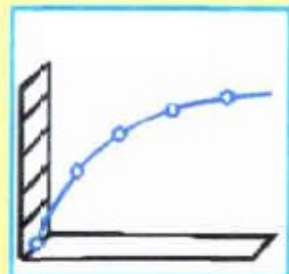
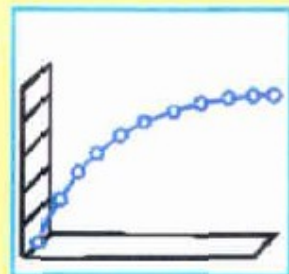


Data carrier



Calibration on
customer's site
with two calibrators

Elecsys® 2010 - The Master Calibration Process



Roche Development



Roche Production



Customer





Workplace

Reagent

Calibration

QC

Utility

Overview



Stop



Logoff



S.Stop



Alarm



Monitor



Print



Start

History

Report Name	Date/Time
Photometer Check	30/09/2015 19:45:59
Photometer Check	30/09/2015 19:45:55
Result List	30/09/2015 15:22:13
Result List	30/09/2015 08:07:58
Result List	30/09/2015 07:41:23
Calibration Monitor[E1-2_...	30/09/2015 07:38:11
Result List	30/09/2015 07:28:43
Result List	30/09/2015 07:22:26
Calibration Monitor[E1-2_...	30/09/2015 07:15:05
Calibration Monitor[E1-1_...	30/09/2015 07:11:55
Calibration Monitor[C2-B_...	30/09/2015 00:16:07
Calibration Monitor[C2-A_...	30/09/2015 00:16:05
Calibration Monitor[C2-B_...	30/09/2015 00:16:00
Calibration Monitor[C2-A_...	30/09/2015 00:15:58
Calibration Monitor[C2-B_...	30/09/2015 00:15:53
Calibration Monitor[C2-A_...	30/09/2015 00:15:51
Calibration Monitor[C2-B_...	30/09/2015 00:15:45
Calibration Monitor[C2-A_...	30/09/2015 00:15:39
Calibration Monitor[C1-B_...	30/09/2015 00:14:33
Calibration Monitor[C1-B_...	30/09/2015 00:14:26
Calibration Monitor[C1-B_...	30/09/2015 00:14:19

cobas 8000 **HITACHI**

Calibration Monitor Operator ID: ruti 30/09/2015 07:15

30/09/2015 07:15:04	E1-2	ruti		
Test	Unit	Calib. Lot ID	Lot ID	Seq. No.
FT4 II	pmol/L	179281	18689300	049034

Evaluation Result Message
L-Calib. was generated!

Calibration Result

	Level 1	Level 2
Target	9.77	43.00
Signal 1	136781	43337
Signal 2	137359	43601
Signal 3	—	—
Signal 4	—	—
Monotony	—	—
Drift	—	—
Dupl.	—	—
Sys. Err.	—	—

Factor
1.00



1

/1



Zoom

Refresh

Delete

Delete All

Backup

Print Out

Close

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 (IKK)
- Využití regulačních diagramů

Rekalibrace

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

Počet a rozmístění kalibrátorů, rozsah kalibrace

- dodržovat postup kalibrace výrobcem IVD MD 98/79 EC
- Počet kal. bodů: lineární 1-3 (L-M-H); nelin. 6 (při validaci 10 – 15)

Zamítnutí kalibrace

- **Naměřené signály/měřené veličiny kalibrátorů nesplňují předepsané hodnoty od výrobce**
- **Častá chyba - Duplicate limit error (všechny kalibrační body se měří 2x (až 4x) – příliš velký rozdíl vede k chybovému hlášení a zamítnutí kalibrace**

Analyt	Typ kalibrace	Počet bodů (při kalibraci v klinické laboratoři)
ALT		
transferin		
fosfáty		
IgG		
troponin T		
urea		
bilirubin		
folát		

Analyt	Typ kalibrace	Počet bodů (při kalibraci v klinické laboratoři)
ALT	lineární	2-3
transferin	nelineární	6
fosfáty	lineární	2-3
IgG	nelineární	6
troponin T	nelineární	2 (Siemens, Roche); 6 (ost.)
urea	lineární	2-3
bilirubin	lineární	2-3
folát	nelineární	2 (Siemens, Roche); 6 (ost.)