

# **Kalibrace analytických metod**

*Miroslava Beňovská*

➤ Měřicí zařízení + přístroje  
pro měření fyzikálních veličin musí být  
výrobci kalibrovaná

Objem: pipety

Teplota (+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

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 stanovenými 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 – pro **fotometrické metody**
- Nelineární – **pro turbidimetrické, imunoturbidimetrické, imunonefelometrické a imunoanalytické metody**

Příklady: Logit-log 4P

Logit-log 5P

RCM2T2 exponenciální funkce

Spline

- ISE (třibodová)

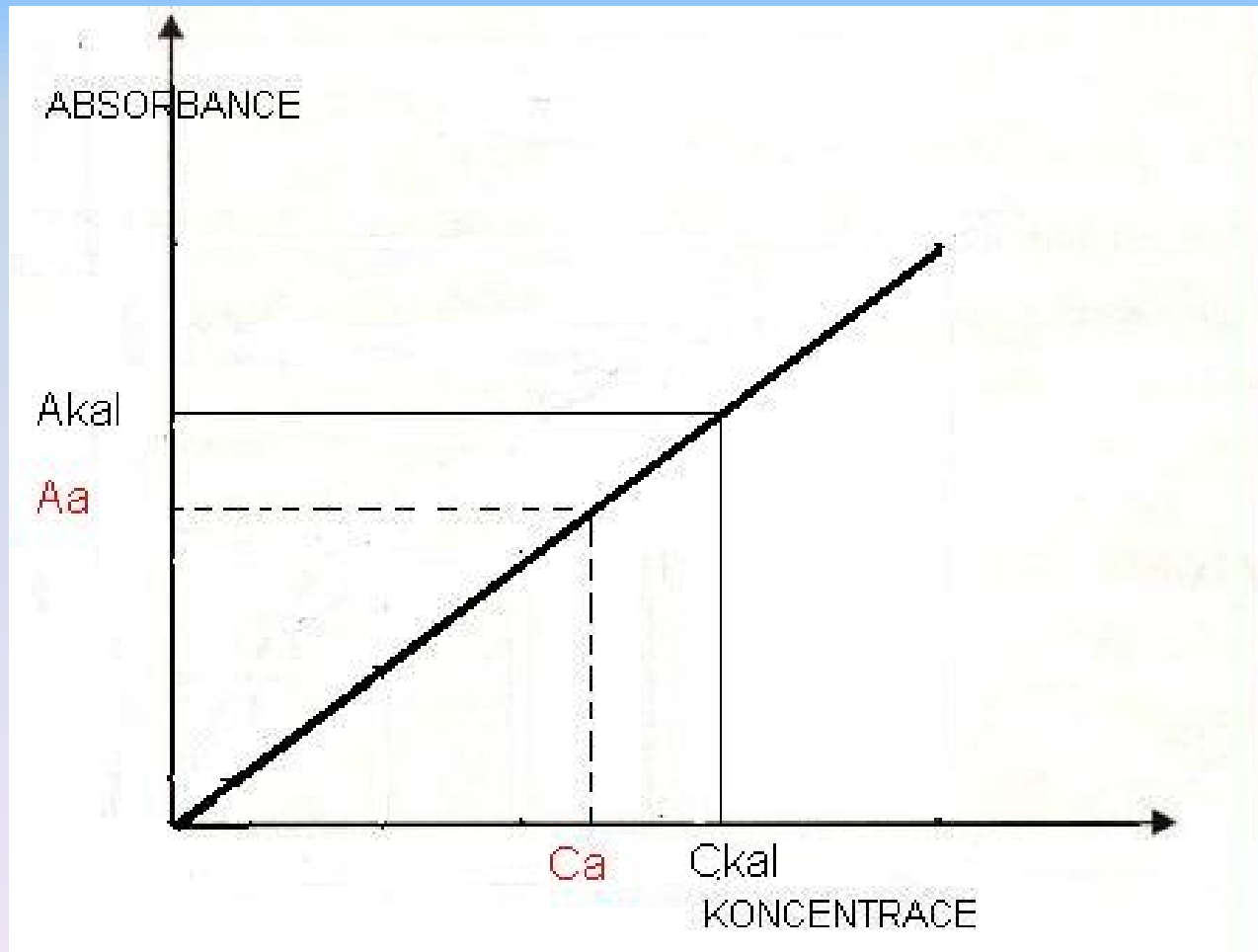
Na analyzátor je třeba **nainstalovat** každou šarži kalibrátoru

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



Logoff



S.Stop



Alarm



Monitor



Print



Start

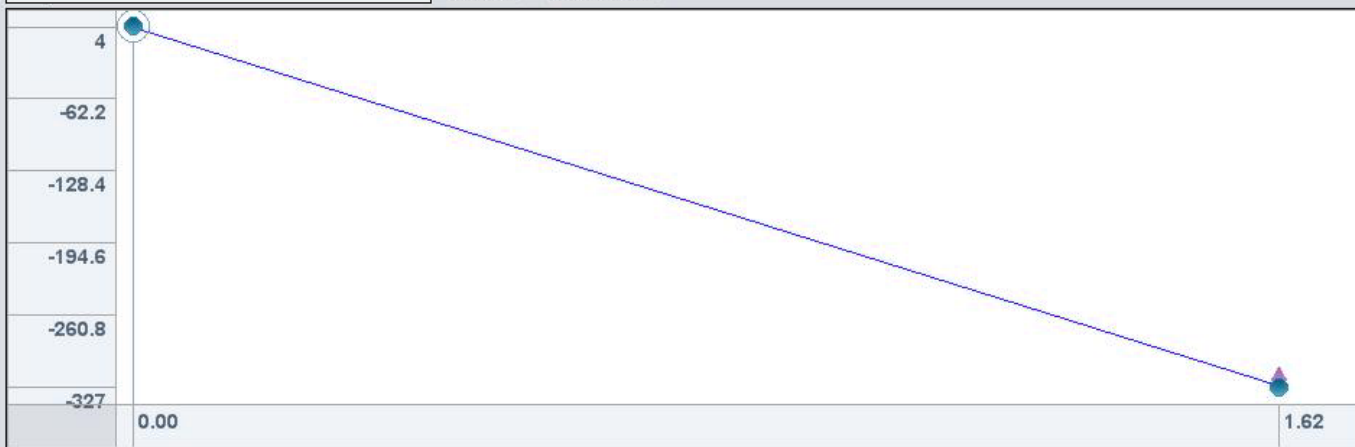
Working Information

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: CoreISE 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	Calib. 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

Reject Release

Calib Trace Calibration Result Reaction Monitor Instrument Factor Start Up Setting Save

Help Select the module from the list box.

Stop Logoff S. Stop Alarm Print Start

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

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:  ▼  
R. Pack:  ▼

**Preference Calibration Settings:**

Timeout  
Lot:  ▼  
 Days ▼  
R. Pack:  ▼  
 Days ▼

**If a calibration has failed**

Auto. Masking

**Limit Value**

SD Limit:   
Duplicate Limit:  %  Abs.  
Sensitivity Limit:  -   
S1 Abs. Limit:  -

**Calibration Method**

Type:  ▼  
Point:   
Span:   
Weight:   
RCM Weight:     
    
Update Type:  ▼  
Update Point:

Instrument

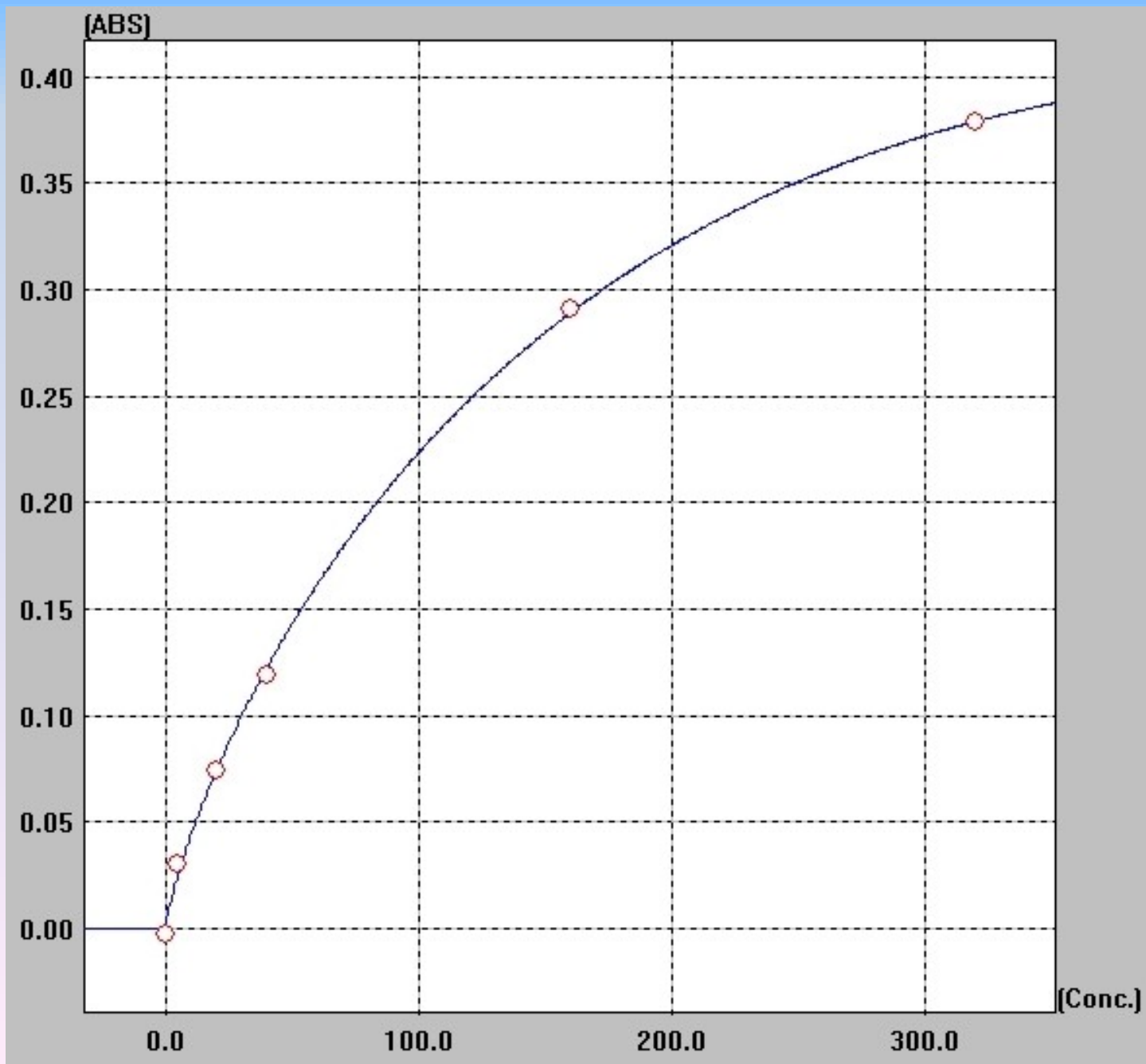
data manager

e-library

Select a page from the list.

# 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



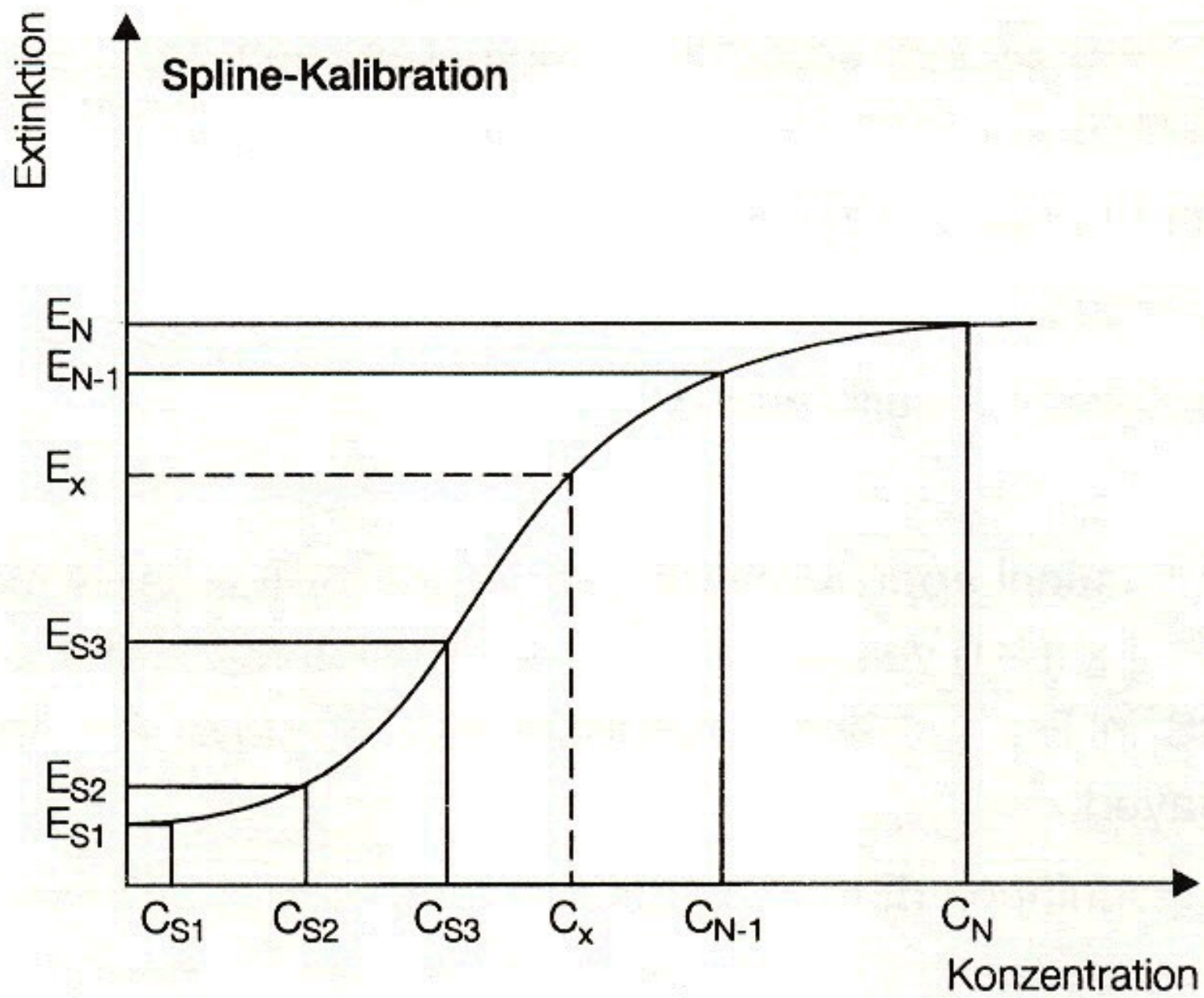
LOGIT-LOG-2



LOGIT-LOG-3

# cal stds

6





Stop



Logoff



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		
<b>Calibration Monitor</b>		Operator ID: ruti		29/09/2015 00:26		
29/09/2015 00:26:43		C2-B		ruti		
Test	SD Value	Calib. Alarm				
At AT	36					
<b>Calibration Result</b>						
	Calib. Lot ID	Abs. 1	Abs. 2	Initial Abs. 1	Initial Abs. 2	Alarm
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	
<b>Calibration Factor</b>						
S1 Abs.	K	A	B			
-11303	2.295E+4	1.401E-1	6.762E-1			
<b>Reagent Pack</b>						
	R1	R2	R3			
Lot ID	606096	—	606096			
Seq. No.	0000885	—	0000885			
<b>Update Factor</b>						
Factor 1	4					
Factor 2						

Navigation controls: < < 1 /1 > > Zoom

Refresh

Delete

Delete All

Backup

Print Out

Close

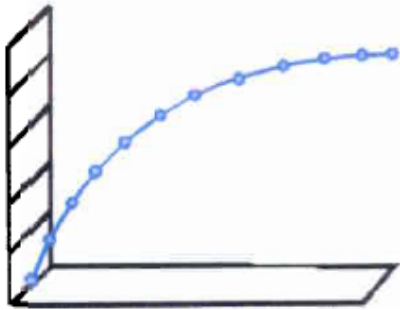
Select reports from the list.

# **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

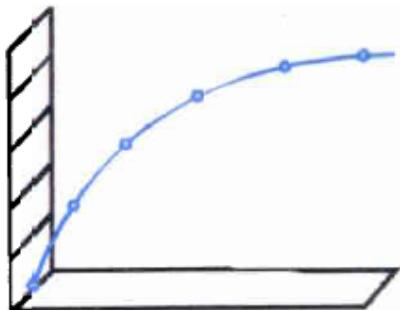
## Reference Standardization once



**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

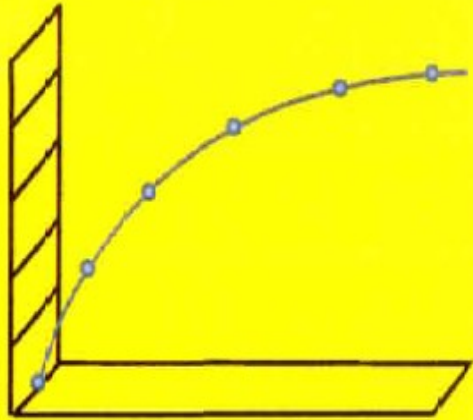
## Lot specific Master Calibration for each lot



**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

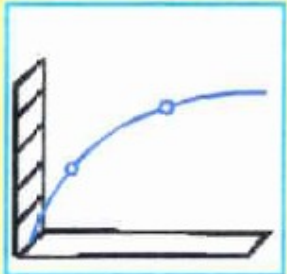
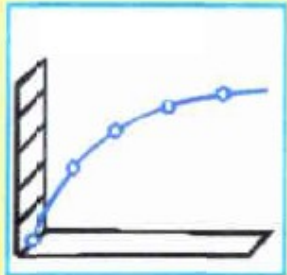
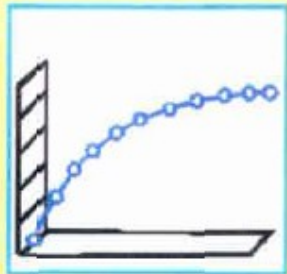


Data carrier



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

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






**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

-  Stop
-  Logoff
-  S.Stop
-  Alarm
-  Monitor
-  Print
-  Start


<
<
1
/1
>
>
Zoom

- Refresh
- Delete
- Delete All
- Backup
- Print Out
- Close

Select reports from the list.



# Nové pojetí **nelineární** kalibrace na klinických modulech/analyzátorech (včetně ISE)

- Na přístroji **cobas pro – cobas Autocal pro turbidimetrické metody**
- Při první instalaci metody – provede se šestibodová kalibrace (full kalibrace)
- S každou novou šarží se kalibrační křivka automaticky upraví pomocí tzv. podílu šarže
-  Omezení počtu kalibrací, úspora testů

# **Rozsah kalibrace**

(pracovní rozsah měření)

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

Meze: dolní a horní mez stanovitelnosti

# Rekalibrace

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

# Kontrola kalibrace a četnost kalibrací (rekalibrace)

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

# 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**

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

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