

# Kalibrace, kontroly kvality v koagulační laboratoři



# 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 kódem u předkalibrovaných metod

# Ředění kalibrační plazmy

→ Automatické

↳ naprogramováno

→ Manuální





# Typy ředění

→ Geometrickou řadou

**100 %**

100 % plazma (neředěná/ředěná)

**50 %**

1 díl 100% plazmy + 1 díl pufru

**25 %**

1 díl 50 % plazmy + 1 díl pufru

**12,5 %**

1 díl 25 % plazmy + 1 díl pufru

**6,25 %**

1 díl 12,5 % plazmy + 1 díl pufru

# Typy ředění

→ Jiný způsob

<b>1:1</b>	100 % plazma (neředěná/ředěná)	100%
<b>1:2</b>	1díl 100% plazmy + 1 díl pufru	50 %
<b>1:4</b>	1díl 100 % plazmy + 3 díly pufru	25 %
<b>1:8</b>	1díl 100 % plazmy + 7 dílů pufru	12,5 %
<b>1:16</b>	1díl 100 % plazmy + 15 dílů pufru	6,25 %

# 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

→ při změně šarže jednotlivých reagensů, v případě že nejsou součástí jednoho setu

→ po kalibraci musí následovat provedení kontrol kvality s deklarovaným rozmezím v normálním i patologickém rozsahu

# Kalibrace rutinních koagulačních vyšetření PT, APTT, Fbg, AT, D-DI, aXa

## → Kalibrační materiál

- ↘ komerční kalibrační plazmy
- ↘ směsná normální plazma (PT, aPTT)

## → Provedení kalibrace

- ↘ při změně šarže setu
- ↘ při změně šarže jednotlivých reagensů,
  - v případě, že nejsou součástí jednoho setu

# Kalibrace speciálních koagulačních vyšetření

## → Kalibrační materiál

- ↘ komerční kalibrační plazmy

## → Provedení kalibrace

- ↘ s každou sérií vyšetření 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



# Typy kontrol

- Preciznost v čase (mezilehlá preciznost, reprodukovatelnost)
- Kontroly s deklarovaným rozmezím
- Porovnatelnost přístrojů/metod
- Preciznost v sérii (opakovatelnost)
- Pravdivost (správnost)

# 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, nesmí být použity ke kalibraci analytických metod
- Nutno použít více kontrolních vzorků s různou hladinou měřeného parametru, aby byl pokryt celý měřený rozsah
- Odlišné hladiny nelze získat různým ředěním téhož kontrolního materiálu!!!

# Kontrolní materiál

- Firemní komerční materiál (lyofilizované)
  - ↘ referenční materiál (cílová hodnota, návaznost)
  - ↘ 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)


# Preciznost

- je těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky opakovaných měření téhož vzorku
- číselným vyjádřením = směrodatná odchylka (SD) od aritmet. průměru ( $\bar{x}$ )


$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad \text{nebo} \quad SD = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n}}$$

# Preciznost

→ relativní směrodatná odchylka = variační koeficient (CV)

$$CV = \frac{SD \times 100}{x} \quad (\%)$$


# Stanovení preciznosti

- Opakovaná analýza stejného kontrolního materiálu, který nemusí mít udaný obsah stanovovaných složek (neatestovaný kontrolní materiál)
    - ↘ zajištění dostatečného množství kontrolních vzorků
    - ↘ zajištění stability vyšetřovaných parametrů
- 

# Stanovení preciznosti

## → Preciznost metody v sérii

↘ je to souhlas mezi výsledky opakované analýzy téhož kontrolního vzorku, analyzovaných opakovaně (např. 10x) stejnou metodou ve stejném čase

## → Preciznost metody v čase

↘ liší se od přesnosti v sérii tím, že se kontrolní vzorek analyzuje každý den v provozních podmínkách současně s ostatními vzorky

# Preciznost v čase/reprodukovateľnosť

- Rutinní koagulace (PT,APTT,Fbg,TT,AT,D-Di,aXa)
  - ↘ Kontrolní materiál
    - komerční (neatestovaný)
    - připravený laboratoří
  - ↘ Dvě hladiny (N a P)
  - ↘ Provádět minimálně 1-2x denně
    - před zahájením denního provozu (a před pohotovostní službou), pro každý parametr a pro každý přístroj, který je v provozu
- Speciální koagulace
  - ↘ jen u vyšetření prováděných s větší frekvencí



# Preciznost v čase - vyhodnocení

## → Statistické programy

- ↘ koagulační automat

- ↘ LIS

- ↘ samostatné

  - výstup na Levey - Jenninsonovy grafy

## → Westgardova pravidla

- není běžné

# Preciznost v čase - vyhodnocení

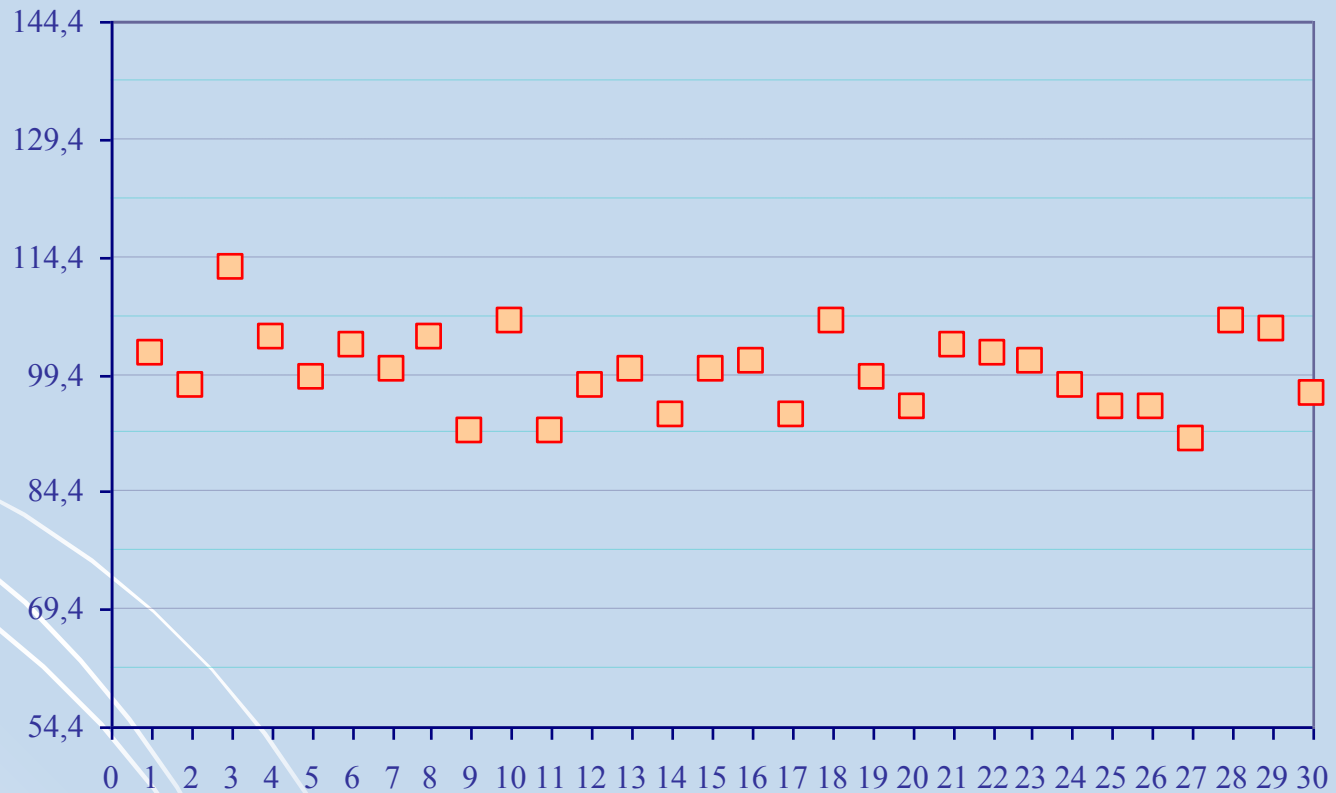
→ Nutno provádět průběžně

↘ průměr, SD, CV (**CV/SD** doporučené nebo vlastní)

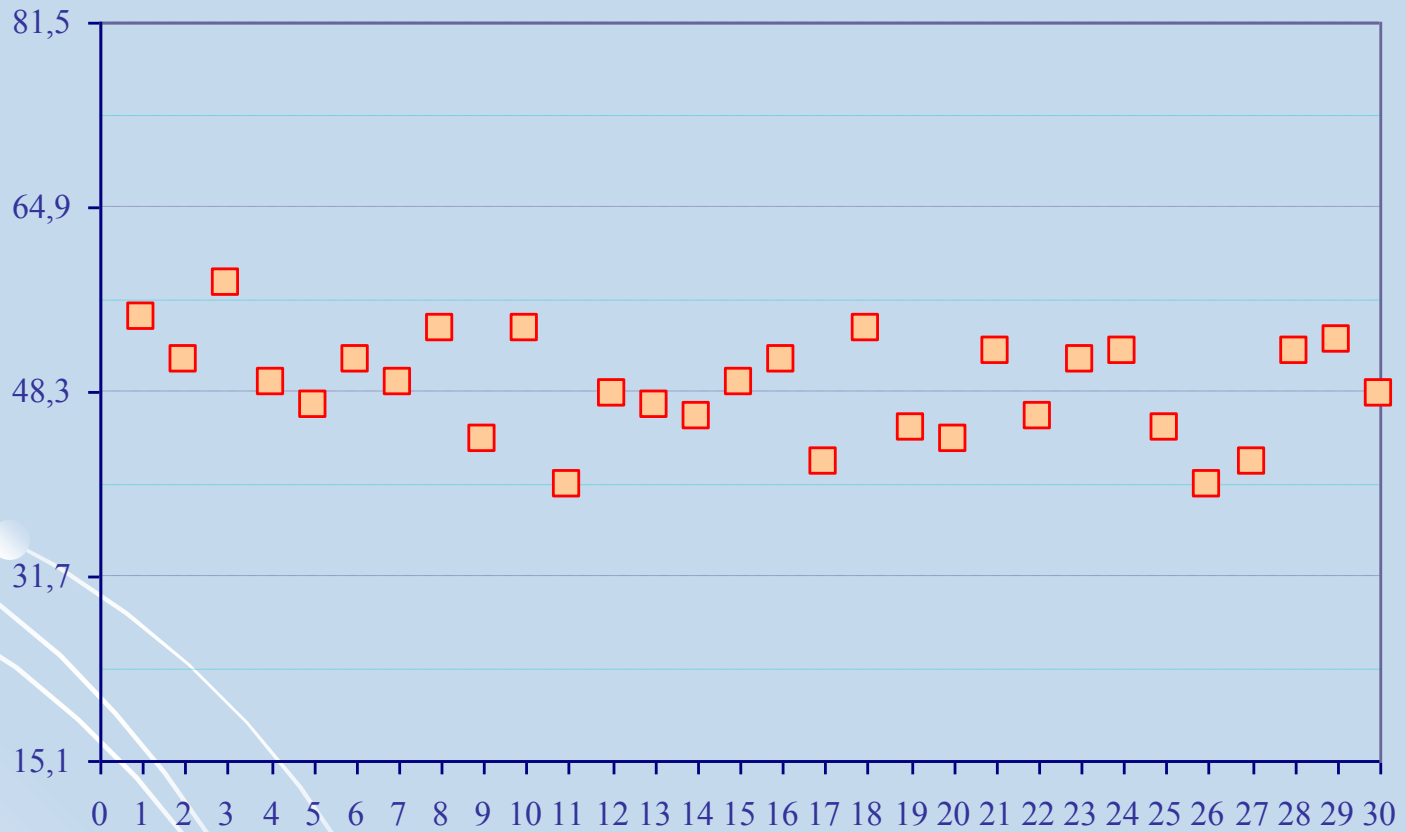
↘ **kontrolní rozmezí** (průměr  $\pm$  2 SD)

↘ **varovné rozmezí** maxim.(průměr  $\pm$  3 SD)

# Kontroly preciznosti pro AT - N



# Kontroly preciznosti AT - P



# Preciznost v čase - vyhodnocení

- Pokud výsledek mimo povolené meze
  - ↘ musí se najít příčina a celou sérii včetně kontrol zopakovat
  
- Pokud výsledky na jedné straně od  $x$  nebo vykazují stoupající nebo klesající trend, velký rozdíl oproti předchozímu výsledku...
  - ↘ je nutno analytickou metodu opravit

# Preciznost v čase/reprodukovatelnost

## → Vedení protokolů

### ↘ průběžně

- výsledky měření, **kontrolní a varovné rozmezí**, **CV / SD** autorizace, schválení

### ↘ závěr (šarže kontroly, reagensie, kalibrace)

- **CV / SD**, (počet překročení kontrolního rozmezí)

## → Primární dokumentace

### ↘ tisk výsledků kontrol, grafů

# Kontroly s deklarováním rozmezím

- Atestovaný komerční kontrolní materiál
- Použít minimálně dva nezávislé kontrolní vzorky
  - normální
  - patologický
- Odchyšky/rozmezí uvedené na kontrolních materiálech nesmí být překročeny
- Pokud k tomu dojde, je nutné hledat příčinu a celý běh analýz včetně analýzy kontrolního vzorku zopakovat

# Kontroly s deklarovaným rozmezím

## → Rutinní koagulace

- při změně šarže reagensie
- po kalibraci
- 1x měsíčně minimálně

## → Speciální koagulace

- po kalibraci
- s každou sérií vyšetření



# Kontroly s deklarovaným rozmezím

## → Vyhodnocení

- ↘ porovnání s deklarovanými hodnotami

## → Vedení protokolů

- ↘ výsledky měření
- ↘ deklarované rozmezí
- ↘ autorizace
- ↘ schválení

# Preciznost v sérii /opakovatelnost

- Nepatří mezi běžné kontroly v koagulaci
- Provádí se
  - ↘ při validaci přístroje
  - ↘ pro ověření správné funkce přístroje
  - ↘ při zavádění nových metod
- Počet měření 6 – 10
- Vyhodnocení
  - ↘ průměr, **CV / SD** ( doporučené)

# Porovnatelnost přístrojů

- Rutinní koagulace (PT,APTT,Fbg, TT,AT,D-Di,aXa)
  - ↘ Vzorokly pacientů čerstvé (N a P)
    - 1x denně na všech přístrojích, které v provozu
  - ↘ Komerční atestované kontroly (N a P)
    - po kalibraci a při změně šarže reagentie
- Speciální koagulace – běžně se neprovádí
- Vyhodnocení
  - ↘ **D%** (procentuální odchylka výsledků měření analyzátorů vůči referenčnímu analyzátoru)
    - $D\% = (v - AV/AV) \times 100$ 
      - v = výsledek měření analyzátoru
      - AV = vztažná hodnota referenčního analyzátoru

# Pravdivost

→ Je těsnost shody mezi průměrnou hodnotou výsledků více měření a uvedenou cílovou hodnotou referenčního kontrolního materiálu

→ min.6 měření za podmínek opakovatelnosti

→ Vyhodnocení

→ **Bias%** (odchylka aritmetického průměru série výsledků měření od cílové hodnoty kontroly

•  $\text{bias\%} = (x - AV) / AV \times 100$

•  $x$  = aritmetický průměr výsledků měření

•  $AV$  = vztažná hodnota referenčního materiálu