

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 čarovým 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

1:1	100 % plazma (neředěná/ředěná)	100%
1:2	1díl 100% plazmy + 1 díl pufru	50 %
1:4	1díl 100 % plazmy + 3 díly pufru	25 %
1:8	1díl 100 % plazmy + 7 dílů pufru	12,5 %
1:16	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, $\mu\text{g}/\text{ml}$...)

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 správnosti v normálním i patologickém rozsahu

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

→ 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

- Správnost/pravdivost
- Přesnost v čase/ reprodukovatelnost
- Přesnost v sérii/ opakovatelnost
- Porovnatelnost přístrojů/metod



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
- Materiál nesmí být použit ke kalibraci analytických metod

Kontrolní vzorky

- Firemní komerční plazmy (lyofilizované)
 - ↘ V referenčních mezích („normální“ – N) a mimo referenční meze (patologické – P)
 - ↘ Atestované a neatestované
- Plazmy připravené laboratoří (čerstvé i zamražené po alikvotech)
 - ↘ „Normální“ a patologické

Kontrolní vzorky atestované

- Atestované (=certifikované) kontrolní materiály
 - ↘ Mají přesně udanou hladinu měřeného parametru s udáním povolených odchylek
 - ↘ Nutno použít více kontrolních vzorků s různou hladinou měřeného parametru, aby byl pokryt celý měřený rozsah
 - ↘ Odlišné hladiny nelze získat různým řaděním téhož kontrolního materiálu!!!

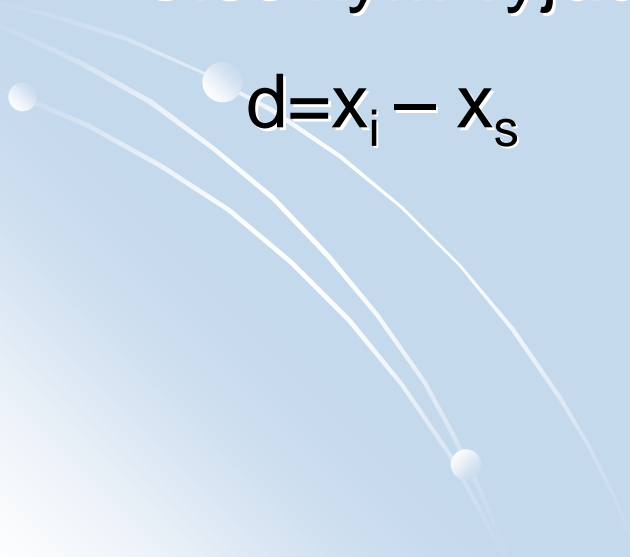
Kontrolní vzorky neatestované

→ Neatestované kontrolní materiály

- Komerční kontrolní materiály, které
- Nemají udanou hladinu měřeného parametru
- Mají uvedeno pouze
 - Parametry, pro které je kontrolní materiál určen
 - Orientační vymezení hladiny měřeného parametru
 - „Normální“ a patologické

Správnost / pravdivost

- Vyjadřuje těsnost shody mezi naměřenou hodnotou a „pravou hodnotou“ udanou výrobcem kontrolního materiálu
- Číselným vyjádřením = absolutní chyba (d)

$$d = x_i - x_s$$


Správnost / pravdivost

→ Relativní chyba (e)

$$e = \frac{100 \times d}{X_s} \quad (\%)$$

→ Kontrolní materiály s přesně udanou hladinou stanovované složky a s udáním povolených odchylek/rozmezí

Správnost / pravdivost

- Atestovaný komerční kontrolní materiál
- Použít minimálně dva nezávislé kontrolní vzorky
 - Normální
 - Patologický
- Odchytky/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

Správnost / pravdivost

→ Rutinní koagulace

- ↘ Při změně šarže reagensie
- ↘ Po kalibraci
- ↘ 1x měsíčně minimálně

→ Speciální koagulace

- ↘ Po kalibraci
- ↘ S každou sérií vyšetření

Správnost / pravdivost

→ Vyhodnocení

- ↘ Porovnání s deklarovánými hodnotami

→ Vedení protokolů

- ↘ výsledky měření

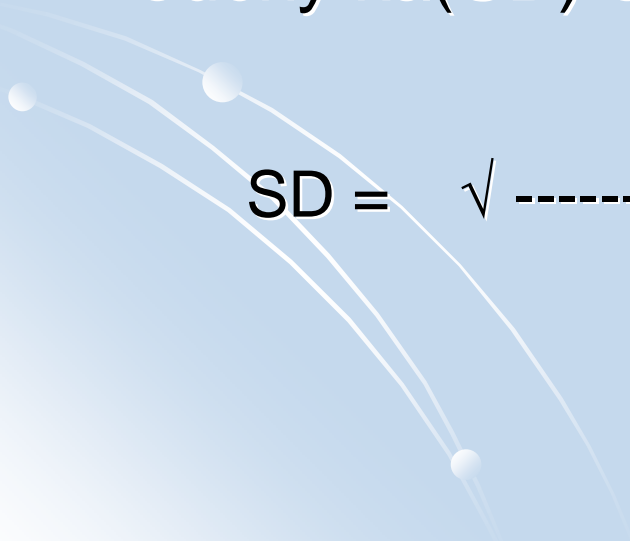
- ↘ deklarované rozmezí

- ↘ autorizace

- ↘ schválení

Přesnost

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


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


Přesnost

→ relativní směrodatná odchylka = variační koeficient

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



Stanovení přesnosti

- 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 přesnosti

→ Přesnost metody v sérii

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

→ Přesnost metody v čase

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

Přesnost v čase/reprodukovatelnost

→ Rutinní koagulace (PT,APTT,Fbg,TČ,AT)

↘ Kontrolní materiál

- komerční neatestovaný
- připravený laboratoří

↘ Vhodné dva kontrolní vzorky

- N
- P

↘ Provádět minimálně 1-2x denně

- Před zahájením denního provozu (a před pohotovostní službou)
- Pro každý parametr
- Pro každý přístroj, který je v provozu

Přesnost v čase - vyhodnocení

→ Statistické programy

- ↘ koagulační automat

- ↘ LIS

- ↘ samostatné

 - výstup na Levey - Jenninsonovy grafy

● → Westgardova pravidla

 - není běžné

Přesnost v čase - vyhodnocení

→ Nutno provádět průběžně

↘ Průměr, SD, CV (%CV doporučené nebo vlastní)

↘ kontrolní rozmezí (průměr ± 2 SD)

↘ varovné rozmezí maxim. (průměr ± 3 SD)

Přesnost 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

Přesnost v čase/reprodukovatelnost

→ Vedení protokolů

↘ průběžně

- výsledky měření, kontrolní a varovné rozmezí, CV, autorizace, schválení

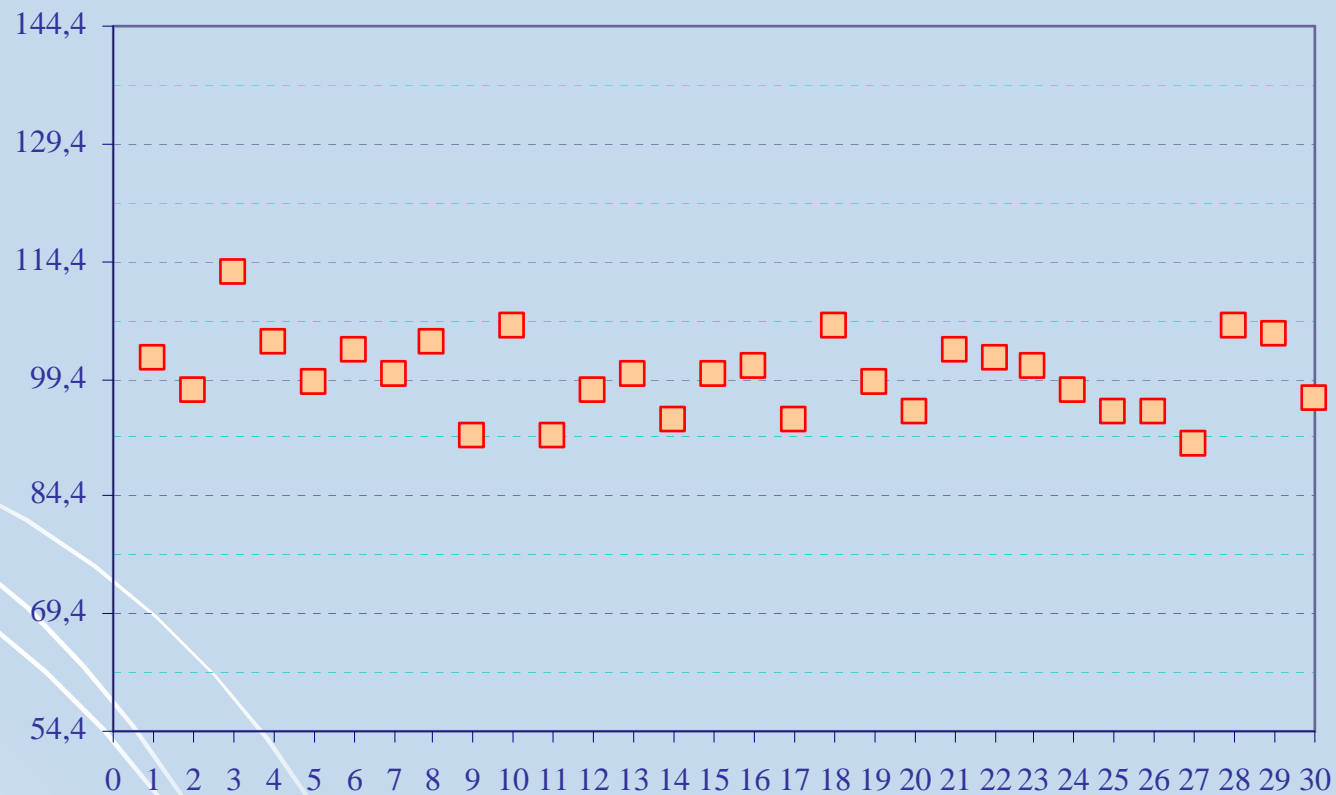
↘ závěr (šarže kontroly, reagentie, kalibrace)

- CV, (počet překročení kontrolního rozmezí)

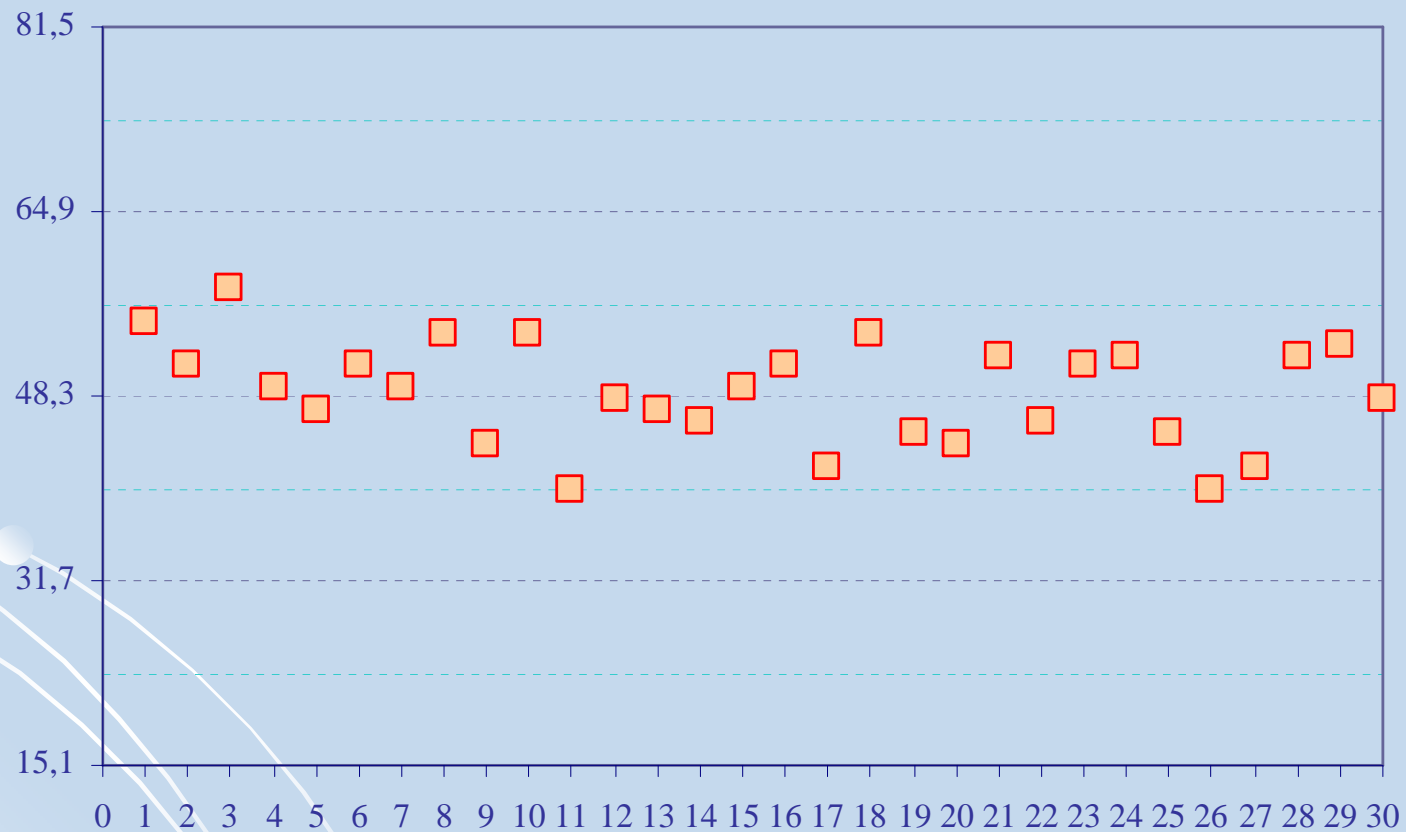
→ Primární dokumentace

↘ tisk výsledků kontrol, grafů

Kontroly přesnosti pro AT - N



Kontroly přesnosti AT - P



Přesnost v čase/reprodukovatelnost

→ Speciální koagulace

→ Kontrolní materiál

- Komerční atestovaný
 - V případě více měření v rámci kontroly správnosti
- Připravený laboratoří
 - Provádět s každou sérií vyšetření

→ Vyhodnocení

- Průměr, SD, CV (%CV doporučené nebo vlastní)
- kontrolní rozmezí (průměr \pm 2 SD)

Přesnost 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 5 – 10
- Vyhodnocení
 - ↘ Průměr, SD, CV (%CV doporučené)

Porovnatelnost přístrojů

- Rutinní koagulace (PT,APTT,Fbg,AT)
 - ↘ Čerstvě odebrané vzorky pro dané parametry (N a P)
 - Vzorky změřit 1x denně na všech přístrojích, které jsou v provozu
 - ↘ Komerční atestované kontroly (N a P)
 - Vzorky změřit na všech přístrojích
 - Po kalibraci
 - Při změně šarže reagentie
- Vyhodnocení
 - ↘ CV (%CV doporučené nebo vlastní)

Porovnatelnost přístrojů

→ Speciální koagulace

- ↘ Běžně se nedělá vzhledem k provádění kalibrace s každou sérií vyšetření
- ↘ Neprovádí se u všech speciálních testů

→ Vyhodnocení

- ↘ CV (%CV doporučené nebo vlastní)