

Preamalýza, kalibrace, kontroly kvality v koagulační laboratoři

RNDr. Jiřina Zavřelová
OKH FN Brno

Správnost laboratorních výsledků

- Faktory
 - objektivní
 - subjektivní
- Faktory
 - preanalytické
 - analytické
 - postanalytické

Preanalytické faktory

- Příprava pacienta
- Odběr vzorku
- Transport vzorku
- Zpracování vzorku
- Skladování vzorku

Příprava pacienta

- Odběr na lačno nebo po lehké snídani bez tuků
- Dostatečný příjem tekutin
- Uvedení času odběru
- Uvedení léčby
- Uvedení komplikace při odběru

Odběr vzorku

- Minimální zatažení paže
- Do plastických nebo silikonovaných skleněných zkumavek
- První 2-3 ml nelze použít
- Antikoagulační roztok pro nesrážlivou krev- **citrát sodný** v ředění 1:10
- Šetrné **promíchání krve s citrátem** (5-10x)

Antikoagulancia

- Citrát sodný
 - 0,109 mol/l (3,2 %) doporučeno
 - 1,129 mol/l (3,8 %)
- CTAD zkumavky
 - brání aktivaci trombocytů
 - doporučeno pro testy PAI-1, heparin, PF4...

Nedostatečné promíchání krve s citrátem

- Nebezpečí aktivace a srážení vzorku
- Koncentrování citrátu u hladiny
 - automaty pipetují těsně pod hladinou naředěnou plazmu s nadbytkem citrátu
 - špatné výsledky
 - ověření po stažení plazmy a promíchání

Správný odběr vzorku

Vyřadit vzorky

- Sražené
- S chybným objemem krve (rozdíl 10%)
- Hemolytické, ikterické a chylózní
 - hemolytický a ikterický vzorek
 - ovlivňuje výrazně fotometrická stanovení
 - chylózní vzorek
 - ovlivňuje výrazně koagulační stanovení na optických koagulometrech
 - a imunochemická stanovení vyhodnocovaná opticky

Správný odběr vzorku

Množství krve

- Méně
 - prodloužení koagulačních časů
 - APTT citlivé od 90 % objemu
 - PT citlivé od 80 % objemu
- Více
 - zkrácení koagulačních časů??

Správný odběr vzorku

- Hematokrit
- < 30 % nebo >60 % upravit objem citrátu

$$\text{ml citrátu} = \frac{100 - \text{hematokrit}}{595 - \text{hematokrit}} \times \text{ml plné krve}$$

Transport vzorku

- Čas (max 2 hod)
- Teplota (18-25°C)
- Mechanické vlivy (potrubní pošta)

Zpracování vzorku

- Odstranění krevních buněk centrifugací
- Stažení plazmy
- Většina testů do 1 - 4 hod po odběru
- Výjimka EGT, EF (15 - 30 min), heparin, PAI-1, LA, vyšetření fcí trombocytů

Vyšetřovaný materiál

- Plazma
 - **plazma bohatá na trombocyty**
 - centrifugace 10 minut 200 g, sedimentace
 - **plazma chudá na trombocyty**
 - centrifugace 15 minut 2500 g
 - **bezdestičková plazma**
 - dvojnásobná centrifugace
- Plná krev
- Sérum

Centrifugace

- Výpočet otáček pro danou centrifugu
- **$g = 1,118 \times 10^{-5} \times r \times N^2$**

r = poloměr otáčení v cm, N = otáčky/min

Příklad:

$r = 15$ cm, 2500g 3860 otáček/min

Skladování primárních vzorků

- Laboratorní teplota 18 - 25 °C
 - PT 6 hodin
 - APTT 4 hodiny
 - APTT (léčba heparinem) 1 hodinu
 - Ostatní vyšetření: 4 hod
- Vyšší teplota ne
- Uložení v lednici (aktivace FF VII a XII) ne

Zamrazování vzorků

- Plazma chudá na destičky/bezdestičková
- Objem > 500 μl
- Zkumavka se zátkou
- Správná velikost zkumavky
- Zkumavka naplněná do 3/4
- Rychlé zamrazení (-70 °C, -196 °C)
- Skladování zamrazených vzorků
 - krátkodobé -20 °C, dlouhodobé: -70 °C

Rozmrazování vzorků

- Při 37 °C min. 5 minut
- Dobře promíchat
- Opakované zamrazení není možné

Analytické faktory

- Dodržování metodických postupů
- Správné pracovní návyky
- Správná funkce a kalibrace přístrojů
- Výběr diagnostických setů a reagensů
- Správná volba kalibračních a kontrolních materiálů
- Správně provedená kalibrace a kontroly kvality

Postanalytické faktory

- Rozmezí fyziologických hodnot
- Terapeutické rozmezí
- Vyjadřování výsledků
- Vyhodnocení výsledků
- Interpretace výsledků

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, $\mu\text{g/ml}$...)

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
 - kontrolní materiály v rozmezí fyziologických i patologických hodnot (**„normální“ a patologické**)
- 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

Preciznost

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

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

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** (opakovatelnost)
 - je to souhlas mezi výsledky opakované analýzy téhož kontrolního vzorku, analyzovaných opakovaně (např. 10x) **stejnou metodou ve stejném čase**
- **Preciznost metody v čase** (reprodukovatelnost)
 - liší se od přesnosti v sérii tím, že se kontrolní vzorek analyzuje každý den **v provozních podmínkách** současně s ostatními vzorky

Preciznost v čase/reprodukovatelnost

- 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

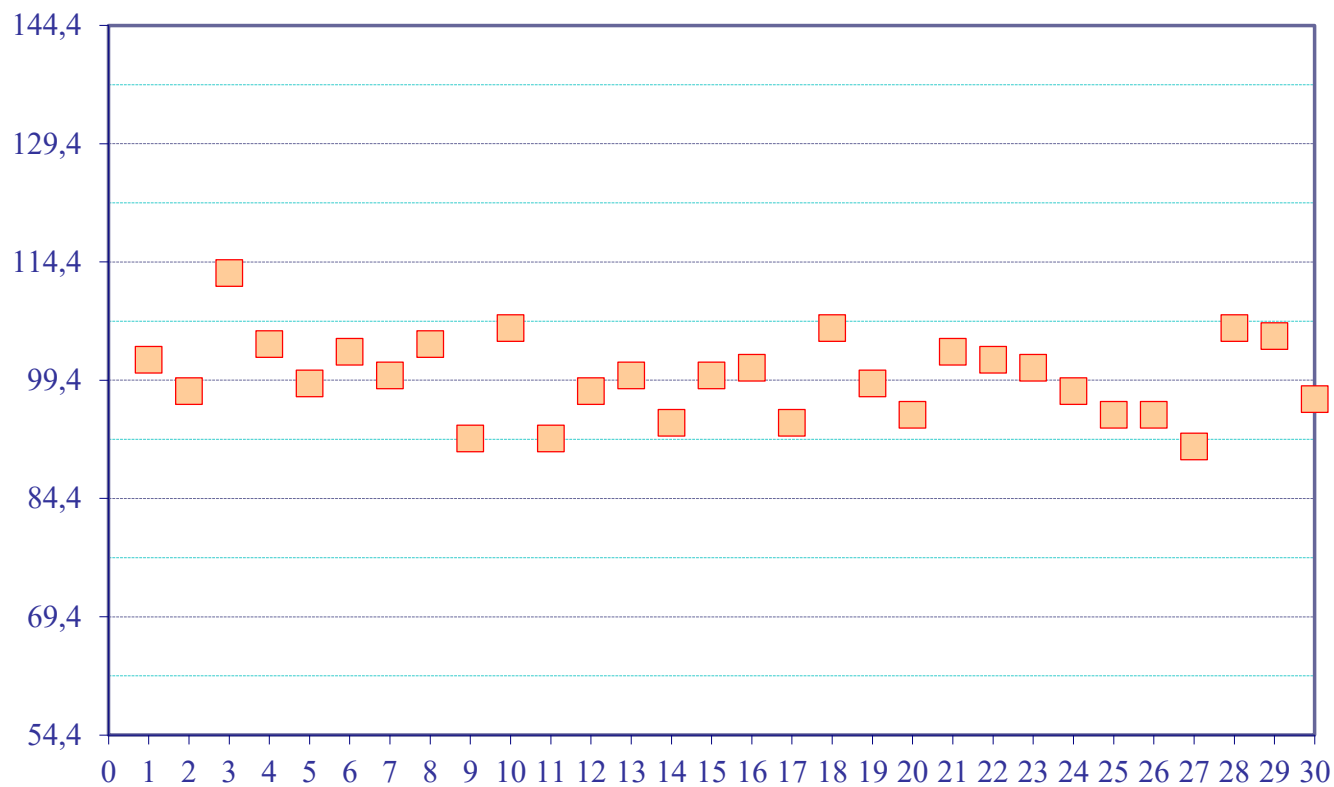
Preciznost v čase - vyhodnocení

- Statistické programy
 - koagulační automat
 - LIS
 - samostatné
 - výstup na Levey - Jenninsovy grafy
- Westgardova pravidla
 - není běžné

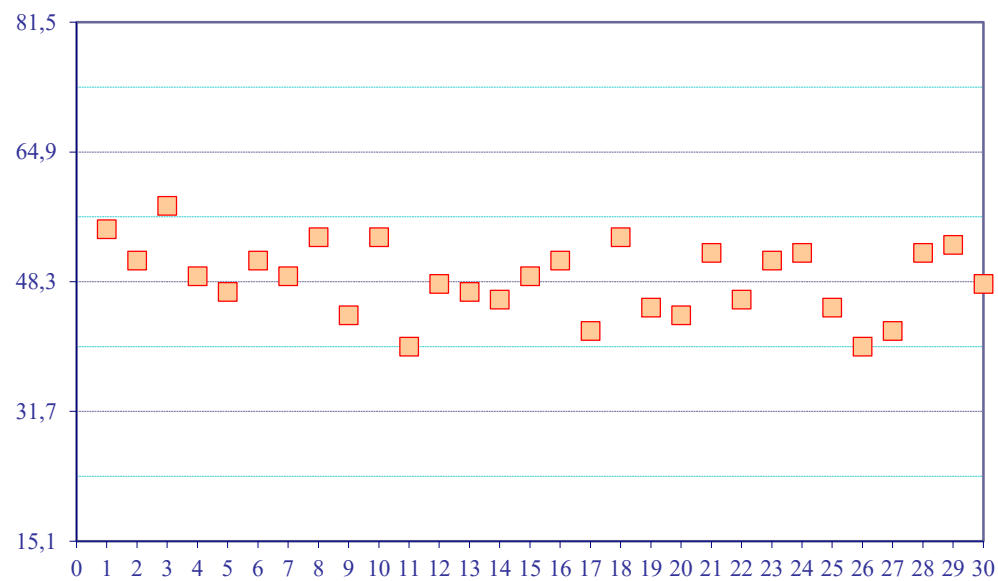
Preciznost v čase - vyhodnocení

- Nutno provádět průběžně
 - průměr, SD, CV (**CV/SD** doporučené nebo vlastní)
 - **kontrolní rozmezí** (průměr ± 2 SD)
 - **varovné rozmezí** maxim. (průměr ± 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, reagentie, kalibrace)
 - **CV / SD**, (počet překročení kontrolního rozmezí)
- Primární dokumentace
 - tisk výsledků kontrol, grafů

Kontroly s deklarovaným rozmezím

- Atestovaný komerční kontrolní materiál
- Použít minimálně dva nezávislé kontrolní vzorky
 - normální
 - patologický
- Odchyłky/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 reagencie
 - 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)
 - Vzorky 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