

Doporučení laboratorní sekce České hematologické společnosti ČLS JEP

Doporučení pro vnitřní kontrolu kvality koagulačních vyšetření

Zpracoval: I. Hrachovinová, J. Zavřelová, M. Jelínková, M. Matýšková I. Malíková,
J. Kratochvíla

Recenzent: Laboratorní sekce ČHS ČLS JEP

Schváleno Laboratorní sekcí ČHS ČLS JEP: 8.4.2016

Schváleno výborem ČHS ČLS JEP: 4.5.2016

Aktualizace: -

Verze: 1, *revize 1*

Platnost od: *20.11.2020*

Přechodné období (platí i nahrazovaný dokument): *22.2.2021*

Poznámky:

Toto doporučení se soustřeďuje pouze na vnitřní kontrolu kvality koagulačních metod, nezahrnuje preanalytickou fázi koagulačních metod ani externí kontrolu kvality, pro které jsou k dispozici samostatná doporučení ČHS ČSL JEP.

Změny jsou oproti předešlému dokumentu vyznačeny modrou kurzívou.

Obsah

1. ÚVOD.....	3
2. KONTROLNÍ MATERIÁL.....	3
3. TYPY KONTROLNÍCH MĚŘENÍ VKK V KOAGULAČNÍ LABORATOŘI.....	4
3.1. Preciznost měření kontrolního materiálu v čase (mezilehlá preciznost).....	4
3.2. Ověření funkčnosti reagenčního systému.....	5
3.3. Reprodukovatelnost měření stejných metod na různých analyzátoch (mezipřístrojová kontrola).....	6
3.4. Preciznost měření v sérii (opakovatelnost).....	7
3.5. Pravdivost měření (správnost).....	7
4. VLASTNÍ HODNOCENÍ, CHYBY MĚŘENÍ.....	8
4.1. Systematické a náhodné chyby.....	8
4.2. Neuspokojivé výsledky měření.....	8
5. STANOVENÍ CÍLOVÉHO ROZMEZÍ V KONTROLNÍM MATERIÁLU.....	9
6. POUŽITÉ ZKRATKY.....	9
7. LITERATURA.....	9

1. Úvod

Vnitřní kontrola kvality (VKK) práce v laboratoři je součástí systému kontrolních procesů, které mají zajistit, aby vydávané výsledky byly správné, přesné a reprodukovatelné. Tento proces by měl minimalizovat možnost analytických chyb. VKK zahrnuje celou řadu kroků, včetně pravidelných měření kontrolních materiálů a statistickou analýzu výsledků těchto měření a jejich hodnocení. Kontrolní procesy musí plnit požadavky legislativy a norem kvality, ale současně by měly být přiměřené typu laboratoře, typu a počtu analyzátorů a počtu vlastních měření a vyšetření. VKK monitoruje a upozorňuje na chybu výsledků v rámci denního vyšetření, na rozdíly „ze dne na den“ a trendy výsledků. Je nezbytnou součástí postupů, které zajišťují spolehlivost vydaných výsledků měření. Doporučení VKK koagulačních vyšetření zahrnuje monitorování kvality práce u většiny testů, které jsou prováděny v koagulační laboratoři. Nelze ale obecně aplikovat proces řízení kvality jedné laboratoře na podmínky laboratoře druhé. V zásadě platí, že každá klinická laboratoř musí provádět a dodržovat „minimální kontrolní program“, jehož zásady jsou uvedeny v tomto textu.

2. Kontrolní materiál

Kontrolní materiály by se svými vlastnostmi měly co nejvíce blížit vzorkům plazmy pacientů, tj. měly by být komutabilní. V praxi se používají lyofilizované, šokově zmražené nebo čerstvé plazmy.

Typy kontrolních materiálů:

- 1. Referenční materiál** - homogenní, stabilní a komerčně připravený lyofilizovaný materiál v rozmezí fyziologických či patologických hodnot. Referenční materiál má pro daný test deklarovanou cílovou hodnotu, nejistotu měření, uvedenou metrologickou návaznost a použité postupy vyšetření. Tyto údaje jsou uvedeny v dokumentu, který je vydáván způsobilou osobou či organizací (např. formou certifikátu od WHO). Značí se CRM, SRM, ERM aj. Je používán převážně pro hodnocení pravdivosti.
- 2. Stabilizovaný lyofilizovaný kontrolní materiál s deklarovaným rozmezím hodnot** pro jednotlivé parametry, nejistotou měření, použitými postupy vyšetření, uvedenou metrologickou návazností na CRM nebo bez metrologické návaznosti; je vyráběn komerčně v souladu s IVD MD (označen „CE“ značkou). Užívá se též termín „atestovaná kontrola“. Lze jej použít k *ověření funkčnosti reagenčního systému*.
- 3. Stabilizovaný lyofilizovaný kontrolní materiál bez deklarovaného rozmezí hodnot** pro jednotlivé parametry („neatestovaná kontrola“); je vyráběn komerčně v souladu s IVD MD (označen „CE“ značkou). Lze jej použít ke stanovení *mezilehlé preciznosti* nebo *opakovatelnosti*.
- 4. V laboratoři připravený kontrolní materiál** (směsná plazma nebo vzorek plazmy jednoho dárce) ve fyziologickém nebo patologickém rozmezí hodnot může sloužit ke stanovení *mezilehlé preciznosti*, *opakovatelnosti* nebo *reprodukovatelnosti měření stejných metod na různých analyzátořech*. Kontrolní materiál může být šokově zmražený nebo čerstvý (zbytek plazmy po analýze nebo cíleně odebraný materiál). Počet dárců/jedinců ve směsné plazmě je vázaný na účel použití směsné plazmy v laboratoři. Při cíleném odběru plazmy k přípravě kontrol musí být dohledatelný informovaný souhlas dárce.

Doporučení laboratorní sekce České hematologické společnosti ČLS JEP

Poznámka: Pro zachování kvantitativní metrologické návaznosti referenčních materiálů existuje mezinárodní biologický referenční materiál nebo mezinárodní standard, který byl vyroben a přesně definován organizací jako je např. WHO. Mezinárodní biologický referenční materiál (WHO International Standards, WHO IS) slouží ke kvantitativnímu stanovení jednotlivých parametrů v CRM nebo jiných sekundárních standardech. Tento materiál existuje pro většinu parametrů měřených v koagulační laboratoři (např. fibrinogen, FII, FV, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI, PKA, FXIII, AT, PC, PS, VWF, ADAMTS13, plasmin, PAI-1, tPA, lupus antikoagulant, nefrakcionovaný heparin, LMW heparin). Kromě WHO IS existuje ještě materiál připravený komerčním výrobcem u parametrů jako např. D-Di, APTT, PT aj., kde z různých důvodů není možné WHO IS připravit. Mezinárodní referenční materiál ani primární materiál komerčního výrobce není určen pro běžný rutinní provoz laboratoře.

3. Typy kontrolních měření VKK v koagulační laboratoři

- 3.1. Preciznost měření v čase (mezilehlá preciznost)
- 3.2. Ověření funkčnosti reagenčního systému
- 3.3. Reprodukovatelnost měření stejných metod na různých analyzátořech (mezipřístrojová kontrola)
- 3.4. Preciznost měření v sérii (opakovatelnost)
- 3.5. Pravdivost (správnost)

3.1. Preciznost měření kontrolního materiálu v čase (mezilehlá preciznost)

a) Účel měření:

- záchyt neúměrného vychýlení denních rutinních vyšetření (APTT, PT, TT, fibrinogen, D-Di, AT, antiXa) nebo speciálních koagulačních vyšetření, která se provádějí s vyšší frekvencí (např. FVIII, PC)

b) Interval a četnost:

- při každém spuštění přístroje
- při použití nové šarže reagensie
- po servisním zásahu (s vlivem na analýzu)
- ~~při otevření nové lahvičky reagensie se stejnou šarží, která se musí rekonstituovat~~
- minimálně každých 24 hodin nebo ve velkých sériích po provedení 200 vyšetření daného testu

c) Kontrolní materiál:

- komerční lyofilizovaný, který nemusí mít uvedeno deklarované rozmezí nebo cílovou hodnotu pro daný test („neatestovaná kontrola“)
- směsný vzorek plazmy připravený na pracovišti
- s co nejdelší dobou expirace

Doporučení pro vnitřní kontrolu kvality koagulačních vyšetření

Doporučení laboratorní sekce České hematologické společnosti ČLS JEP

- *dvě různé úrovně: 1. referenční interval, 2. patologické hodnoty (pokud jsou dostupné). Kontrolní materiál volíme s ohledem na rozsah měření (např. u fibrinogenu by patologická kontrola měla být v rozsahu 0,7 – 1,4 g/L).*
- pro kontrolní měření při otevření nové lahvičky reagensie se stejnou šarží, která se musí rekonstituovat, použít:
 - patientskou plazmu změřenou před a po vyměnění nové lahvičky reagensie (rozdíl výsledků měření nesmí přesáhnout nejistotu měření dané metody a musí být dodržena pravidla preanalytické fáze – doba zpracování plazmy)
 - „neatestovaný“ nebo „atestovaný“ komerční lyofilizovaný materiál (stačí jedna úroveň)

d) Hodnocení měření:

- SD a/nebo CV
- Výsledky vyhodnocovat pomocí jednoduchých statistických programů, Westgardových pravidel nebo vlastními regulačními diagramy a grafy (viz 4.1.)
- výsledky, které leží mimo interval $\pm 2SD$ (případně $\pm 3SD$) nebo mimo cílové rozmezí (viz 5.), jsou varující a je nutno provést nápravná opatření (viz 4.2.)

e) Dokumentace měření:

- autorizovaný záznam primárních výsledků měření kontrolního materiálu
- Levey-Jennings grafy, pokud je to možné
- záznam SD a/nebo CV

Poznámka: Většina koagulometrů má softwarové vybavení na sledování všech měřených parametrů u kontrolních materiálů (APTT, PT, TT atd.). Výsledky je možné sledovat v Levey-Jennings grafech. Software zpravidla vypočítává denní, měsíční a roční SD i CV. Výsledky mohou sloužit jako doklad o provádění mezilehlé preciznosti. Software ale zpravidla nevyhodnocuje výsledky podle Westgardových pravidel.

3.2. Ověření funkčnosti reagenčního systému

a) Účel měření:

- ověření, zda výsledky pro daný měřicí systém jsou validní

b) Interval a četnost:

- při změně šarže reagensie (APTT, PT, TT)
- při nové kalibraci metody (např. fibrinogen, AT, FVIII, atd.)
- minimálně 1x měsíčně u rutinních metod (APTT, PT, FBG, D-Di, atd.) a s každou sérií vyšetření u speciálních metod

c) Kontrolní materiál:

- komerční kontrolní materiál „atestovaná kontrola“ s návazností na CRM (např. fibrinogen, AT, FVIII, FIX, atd.)
- komerční kontrolní materiál „atestovaná kontrola“ bez návaznosti na CRM (např. D-Di, APTT)

Doporučení pro vnitřní kontrolu kvality koagulačních vyšetření

Doporučení laboratorní sekce České hematologické společnosti ČLS JEP

- v laboratoři připravený kontrolní materiál, u něhož je nutno si cílové rozmezí pro daný test a systém měření vypočítat (viz 5.)
- dvě úrovně hodnot daného testu, v oblasti referenčního intervalu a v patologickém rozmezí, pokud jsou dostupné

d) Hodnocení měření:

- výsledky v deklarovaném rozmezí

e) Dokumentace měření:

- autorizovaný záznam primárních výsledků měření kontrolního materiálu spolu s jeho deklarovaným rozmezím a vyhodnocením

3.3. Reprodukovatelnost měření stejných metod na různých analyzátořech (mezipřístrojová kontrola)

a) Účel měření:

- preciznost měření za podmínek reprodukovatelnosti měření; zpravidla u rutinních testů (APTT, PT, TT, fibrinogenu, AT, anti Xa, atd.)
- analýza na různých místech, s různými měřicími systémy, s různým personálem

b) Interval a četnost:

- při současném provozu a v době střídání provozu na různých analyzátořech
 - v rámci měření mezilehlé preciznosti v čase (viz. bod 3. 1.)
 - dle možností laboratoře minimálně 1x denně vyšetřením 2 čerstvých vzorků
- porovnání výsledků měření po kalibraci metody v rámci hodnocení funkčnosti reagenčního systému (viz. bod 3. 2.)

c) Kontrolní materiál:

- jakýkoliv kontrolní materiál včetně čerstvých vzorků (viz. 3.3 a 3.1)
- na dvou úrovních hodnot testů (v oblasti referenčního intervalu a v patologickém rozmezí, pokud jsou dostupné)

d) Hodnocení měření:

- jeden analyzátor zvolit jako referenční (cílová hodnota)
- D% (procentuální odchylka) výsledků měření analyzátořů vzhledem k referenčnímu analyzátoři
- laboratoř si sama stanoví maximální povolenou procentuální odchylku D_{\max} od vztažné hodnoty referenčního analyzátoři, např. na základě úvodního porovnávání analyzátořů regresní analýzou nebo podle doporučení výrobce, případně podle doporučení SEKK (D_{\max} , www.sekk.cz)

e) Dokumentace měření:

autorizovaný záznam primárních výsledků kontrolních měření spolu s vyhodnocením D%:
výpočet dle vzorce $D\% = [(x - AV)/AV] \times 100$ (x = výsledek měření analyzátoři, AV = vztažná hodnota referenčního analyzátoři).

Doporučení pro vnitřní kontrolu kvality koagulačních vyšetření

3.4. Preciznost měření v sérii (opakovatelnost)

a) Účel měření:

- sledování správné funkce analyzátoru kontrolou všech typů a principů měření dle doporučení výrobce analyzátoru event. dle výběru laboratoře – minimálně jednoho zástupce metody z každého principu/typu měření (např. APTT, FBG, AT)
- opakovatelnost je součástí verifikace *metod* a validace *přístrojů*.

b) Interval a četnost:

- 6-10 měření v sérii s jedním kontrolním materiálem
- 1× za 6 měsíců u poloautomatických koagulometrů
- 1x ročně u automatických koagulometrů

c) Kontrolní materiál:

- „neatestovaný“, „atestovaný“ komerční materiál, vzorek plazmy pacienta nebo směsný vzorek plazmy připravený na pracovišti
- 1-2 úrovně (referenční interval a/nebo patologické hodnoty)
- doba stability vzorku pro dané vyšetření nesmí být překročena během doby měření opakovatelnosti

d) Hodnocení měření:

- CV a/nebo σ (směrodatná odchylka)
- je nutno hodnotit pro daný test a pro každý typ analyzátoru samostatně

e) Dokumentace měření:

- autorizovaný záznam primárních výsledků z analyzátoru pro daný test a analyzátor včetně vyhodnocení statistických parametrů CV a/nebo σ (pro výpočet směrodatné odchylky σ je nutné vzhledem k počtu měření použít „n“ metodu)

3.5. Pravdivost měření (správnost)

a) Účel měření:

- sledování těsnosti shody aritmetického průměru naměřených hodnot testu oproti cílové hodnotě deklarované pro referenční materiál
- pravdivost kvantifikuje systematickou chybu měření, lze ji stanovit jen u testů, u nichž existuje metrologická návaznost (*např. FBG, AT, FVIII, PC, PS, FII, FV, FVII, FX, atd.*)
- *u testů, kde neexistuje metrologická návaznost (např. APTT, PT, TT, DDim atd.), je možné spočítat odhad pravdivosti měření tak, že se k výpočtu použije vztahná hodnota EKK (např. SEKK) pro daný analyt/reagencii.*
- je součástí verifikace a validace

Doporučení laboratorní sekce České hematologické společnosti ČLS JEP

b) Interval a četnost:

- alespoň 6 měření (za podmínek opakovatelnosti)
- minimálně 1×2 roky
- *c) Kontrolní materiál:*
- referenční materiál (CRM a jiné, např. materiál z EHK)
- 1-2 úrovně (referenční interval a/nebo patologické hodnoty)

d) Hodnocení měření:

- výpočet bias (míra pravdivosti)

e) Dokumentace měření:

- autorizovaný záznam primárních výsledků kontrolních měření spolu se statistickým vyhodnocením a výpočtem bias

4. Vlastní hodnocení, chyby měření

4.1. Systematické a náhodné chyby

Při hodnocení je nutno rozlišovat systematické a náhodné chyby (viz Westgardova pravidla):

- ✓ jeden výsledek je mimo interval ± 2 SD: nahodilá chyba nebo varující signál pro systémovou chybu
- ✓ jeden výsledek je mimo interval ± 3 SD: závažná nahodilá chyba nebo varující signál pro systémovou chybu
- ✓ čtyři výsledky po sobě jsou mimo interval ± 1 SD: systémová chyba, odstranit příčiny
- ✓ více výsledků po sobě je na jedné straně od střední hodnoty: varující signál pro systémovou chybu
- ✓ rozdíl mezi dvěma po sobě následujícími výsledky je větší než 4 SD (např. od +2 SD do -2 SD): varující signál

4.2. Neuspokojivé výsledky měření

Pokud jsou výsledky měření daného testu v kontrolním materiálu neuspokojivé:

- ✓ je nutné analýzu kontrolního materiálu zopakovat
- ✓ jestliže chybné výsledky přetrvávají, provést měření s jiným kontrolním materiálem, případně reagensů
- ✓ při opakovaně stejných chybných výsledcích je nutné pomýšlet na technickou nebo přístrojovou chybu

Každá laboratoř by měla mít definované postupy při chybných výsledcích měření VKK.

5. Stanovení cílového rozmezí v kontrolním materiálu

Cílové rozmezí hodnot určitého testu (např. APTT, PT, TT, fibrinogen, AT) je nutné stanovit u kontrolního materiálu, který nemá metrologickou návaznost na referenční materiál (v laboratoři připravená směsná plazma, „neatestovaná“ komerční lyofilizovaná plazma s CE značkou) nebo při použití přístroje, pro který nebylo cílové rozmezí pro daný parametr (např. APTT, PT) deklarováno. Kontrolní materiál testovat minimálně 20× za podmínek reprodukovatelnosti (mezilehlé preciznosti) *v rozmezí aspoň 5 dní*. Cílové rozmezí hodnot kontrolního materiálu vypočítat z SD, která kopíruje robustnost a variabilitu systému.

U systémů (přístroj + reagentie), kde variační koeficient pro mezilehlou preciznost vychází dlouhodobě $CV < 5\%$, používat $AM \pm 3SD$; u systémů s $CV > 5\%$ pak $AM \pm 2SD$.

6. Použité zkratky

Anti Xa	Stanovení aktivity nízkomolekulárního heparinu pomocí aktivovaného FX
APTT	Aktivovaný parciální tromboplastinový test
AT	Antitrombin
AM	Aritmetický průměr
AV	Vztažná hodnota
CV	Variační koeficient
CRM	Certifikovaný referenční materiál (Certified Reference Material)
D-Di	D dimery
D _%	Procentuální odchylka výsledku od vztažné hodnoty
D _{max}	Maximální povolená odchylka od vztažné hodnoty v %
ERM	European Reference Materials (Evropské referenční materiály)
EHK	Externí hodnocení kvality
FBG	Fibrinogen
IQC	Internal quality control, totožné s VKK
IVD MD	Zdravotnické prostředky pro diagnostiku in vitro (In Vitro Diagnostic Medical Devices)
PT	Protrombinový test
SD	Směrodatná odchylka vypočítaná metodou „n-1“ = výběrová směrodatná odchylka
σ	Směrodatná odchylka vypočítaná metodou „n“
TT	Trombinový test
SRM	Standardní referenční materiál
VKK	Vnitřní kontrola kvality
WHO	World Health Organization (Světová zdravotnická organizace)

7. Literatura

1. Kitchen S., Preston FE., Olson JD. Internal quality control in the hemostasis laboratory. Quality in laboratory hemostasis and thrombosis, 2009 Blackwell Publishing Ltd
2. Marler KA., Cook J., Johnson M. et al. One stage protrombin time and activated partial tromboplastin time test: Approved guidelines, 2nd edn. CLSI, 2007. H47-A2.

Doporučení laboratorní sekce České hematologické společnosti ČLS JEP

3. Plzák Z., Friedecký B., Kratochvíla J.: Metrologická terminologie 2. Vydal Eurachem ČR a SEKK 2009. Editoři Suchánek M. a Budina M. Volně dostupné na <http://www.eqa.cz/terminologie>
4. Parvin CA. a kol.: Evaluation of the performance of pandomised versus fixed time schedules for quality control procedures. Clin Chem 2007;53, 575-580.
5. Commission decision on Common Technical Specifications for *in vitro*-diagnostic medical devices. Official Journal of the European Communities 2002, L 131: 17 – 30.
6. Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on *in vitro* diagnostic medical devices. Official Journal of the European Communities 1998, Dec 7: L 331/1-L 331/37.
7. VIM3:2008 - Mezinárodní metrologický slovník. Základní a všeobecné pojmy a přidružené termíny – ISO Guide 99. Volně dostupné na webu BIPM (verze anglická a francouzská): <http://www.bipm.org>. Mezinárodní metrologický slovník je dostupný i v české verzi na webu UNMZ http://www.unmz.cz/files/Sborn%C3%ADky%20TH/Terminologie%20v%20oblasti%20metrologie_DEF.pdf bez úhrad
8. ISO 13528:2005 Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons. ISO Geneve 2005.
9. ISO 15195:2003 Clinical Laboratory Medicine –Requirement for Reference Measurement Laboratories ISO Geneve 2003.
10. ISO/CD TR 18112:2006 Clinical laboratory testing and *in vitro* diagnostic test systems -- *In vitro* diagnostic medical devices for professional use -- Summary of regulatory requirements for information supplied by the manufacturer ISO Geneve 2006.
11. ISO 15198:2004 Clinical laboratory medicine – *In vitro* diagnostic medical devices – Validation of user quality control procedures by the manufacturer. ISO Geneve 2004.
12. Levey S, Jennings ER. The use of control charts in the clinical laboratory. Am J Clin Pathol 1950, 20, 1059-1066.
13. Nordin G. a kol.: A multicentre study of reference intervals for haemoglobin, basic blood cell count and erythrocyte indices in the adult population of the Nordic countries. Scand J Clin Lab Invest 2004, 64, 385 – 398
14. Quality assurance in haematology. WHO Document LAB/98.4 (1998)
15. EN/CEN 14136:2004. Use of External Quality Assessment Schemes in the Assessment of the Performance of *in Vitro* Diagnostic Procedures.
16. Rillibäk 2008. Die Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. Deutsches Ärzteblatt (2008) 105/7 A341 – A355.
17. ISO/CD Guide 80: 2009. Commercial and *in house* production of non-certified reference materials for Precision Control (PCMs). ISO Remco 2009.
18. ISO Guide 31 až 35. Reference Materials. Committee on Reference Materials. ISO REMCO 2006 až 2010.
19. Macdonald R. Quality assessment of quantitative analytical results in laboratory medicine by root square of measurement deviation. J Lab Med 2006; 30/3:111 - 117.
20. Suchánek M, Friedecký B, Kratochvíla J, Budina M, Bartoš V. Doporučení k výpočtu nejistot kvantitativních výsledků měření v klinických laboratořích, 2014; http://www.sekk.cz/infoservis/2014_nejistoty_doporuceni.pdf
21. CLSI: Protocol for the Evaluation, Validation, and Implementation of Coagulometers; Approved Guideline, H57-A.
22. Westgardova pravidla a zásady: <http://www.westgard.com>

Doporučení pro vnitřní kontrolu kvality koagulačních vyšetření