Mgr. Ivana Malíková
ÚLBLD Centrální hematologické laboratoře VFN, Praha

Koagulometr cobas t 511

– první zkušenosti s novým typem analyzátoru

Na Roche sympoziu v únoru 2018 byl prezentován nový koagulometr cobas t 511, který představuje novinku v používání a přípravě reagencií, neboť využívá kazetový systém a reagencie jsou rekonstituovány přímo v analyzátoru.

Koagulometr jsme měli možnost vyzkoušet v naší laboratoři v průběhu března a dubna, kdy jsme zařadili tento analyzátor do laboratorního provozu bez připojení na LIS.

Nároky na akreditaci laboratoří a současnou automatizaci práce vedou laboratoře ke zpřísnění podmínek pro zařazení nového koagulometru do rutinního provozu, to vše jsme se snažili zohlednit ve zkušebním režimu.

Prvním cílem bylo seznámit se s novým typem analyzátoru, který využívá jiný systém přípravy reagencií, než byl dosud v laboratoři používán. Druhým cílem bylo porovnat základní koagulační testy na novém koagulometru a všech analyzátorech v laboratoři a posoudit vhodnost analyzátoru k zařazení do běžného provozu.

Jedná se o analyzátor, který je schopen analyzovat různé primární typy zkumavek v uzavřeném i otevřeném režimu, a to i v kombinaci v jednom stojánku (počet zkumavek v jednom stojánku je pět, maximální počet stojánků na palubě analyzátoru je 15). V případě mikrozkumavek je možné naprogramovat konkrétní stojánky, do nichž jsou tyto mikrozkumavky vkládány. Výhodou mikrozkumavek je velmi malý „mrtvý objem“ plazmy.

V analyzátoru je zabudován chladicí systém, v němž jsou uloženy kazety s reagenciemi. Z tohoto prostoru se na základě požadavku zadaného do systému přesune kazeta do horního pracovního prostoru, kde proběhne samotná rekonstituce reagencie v uzavřeném prostoru. Tento způsob přípravy reagencií představuje vyšší stupeň standardizace práce a eliminuje

*Obr. 1: Koagulometr **cobas t** 511 s příslušenstvím*

Obr. 2: Typy stojánků pro kalibrátory (C), kontroly (Q) a vzorky (M, 0)

Obr. 3: Typy mikrozkumavek a měřicí kyveta

Obr. 4: Podavač stojánků s primárními zkumavkami

možné chyby v preanalytické fázi. V čárovém kódu kazety jsou pak uloženy všechny potřebné informace o reagencii (např. ISI tromboplastinu, čas normální plazmy, doba exspirace reagencie atd.). V programu „Routine – Reagent status“ pak následně můžeme všechny údaje o reagenční kazetě kontrolovat vč. počtu testů, které můžeme z daného objemu reagencie vyšetřit. Příbalové letáky k reagenciím jsou pravidelně aktualizovány on-line a všechny potřebné informace jsou uloženy v SW analyzátoru.

Pro vlastní měření jsou k dispozici čtyři vlnové délky:

- 625 nm pro koagulační stanovení
- 408 nm pro chromogenní a koagulační stanovení
- 800 nm pro imunochemické stanovení
- 588 nm pro imunochemické stanovení a hodnocení HIL

Obr. 5: Pracovní prostor s reagenčními kazetami

Obr. 6: Reagenční kazety v originálním balení

Pro koagulační stanovení je velmi důležitá vlnová délka 625 nm, protože při ní dochází k minimu interferencí, které se mohou projevit při jiných vlnových délkách. Tuto skutečnost jsme ověřili ve dvou pokusech se silně hemolytickou a silně ikterickou plazmou.

Hemolytickou plazmu jsme připravili podle doporučeného postupu (Lippi et al.: Clin Chem Lab Med 2009; 47: 934–939) a z koncentrovaného hemolyzátu připravili 5 koncentrací za pomoci poolované plazmy jako ředicího média. Parametr H_I znamená hodnocení hemolýzy a ikterického zabarvení.

Z tabulky je patrné, že u měřených parametrů nebylo výrazné ovlivnění hemolýzou potvrzeno, i když se v případě vzorku se 100% hemolýzou jednalo o silný stupeň hemolýzy (H index – 16). Ani v grafickém znázornění výsledků stanovení antitrombinu (graf 1) ovlivnění patrné není, jedná se jen o rozdíl 3% aktivity antitrombinu, což je nižší rozdíl než povolená laboratorní chyba v případě opakovaného měření.

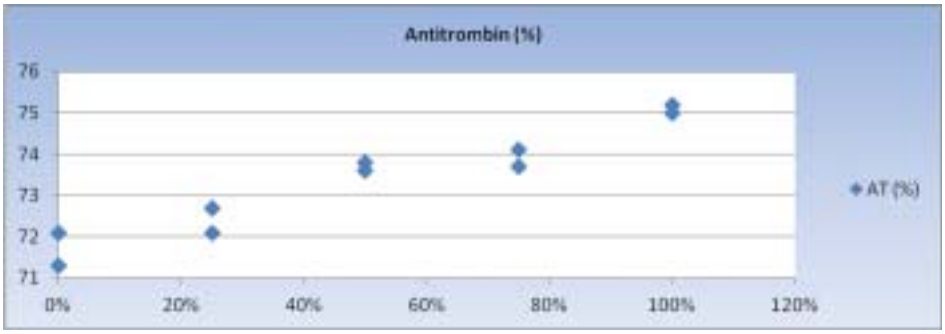
Měření ikterické plazmy jsme ověřovali podobným způsobem, ale příprava standardů nebyla možná přesně podle protokolu. Pomocí silně ikterické plazmy jsme připravili 3 koncentrace naředěním poolovanou plazmou (tab 2.).

Z tabulky je patrné, že u měřených parametrů výrazné ovlivnění ikterickou plazmou nebylo potvrzeno, i když v případě vzorku se značným ikterickým zabarvením (I index – 25) nebyl odečten derivovaný fibrinogen. Výsledky koagulačních parametrů u jednotlivých ředění odpovídají poměru zastoupení ikterické a poolované plazmy.

Velkou výhodou analyzátoru je vydání výsledků i v případě takto silně zabarvených vzorků, i když v těchto případech analyzátor neprovede automatickou validaci výsledku a na možnost interference upozorní.

	Měření	H_I	PTrec (sec)	PTrec (INR)	APTT (sec)	Der Fbg (mg/dL)	Fbg (g/L)	TT (sec)	AT (%)	OD (µgFEU/L)
100%	1	16_5	9,30	1,06	28	308	3,43	18,9	75,2	2344
	2	14_7	9,32	1,06	28	300	3,45	19,0	75,0	2366
75%	1	11_6	9,29	1,07	28,3	302	3,34	19,0	73,7	2239
	2	11_5	9,29	1,07	28,1	300	3,30	19,0	75,1	2198
50%	1	6_6	9,33	1,06	28,1	297	3,25	18,9	74,0	2103
	2	7_4	9,29	1,06	28,1	295	3,25	18,6	73,6	2107
25%	1	2_3	9,27	1,07	28,3	294	3,17	19,0	72,7	1972
	2	3_2	9,30	1,07	28,4	289	3,16	19,2	71,7	1966
0%	1	0_0	9,31	1,07	28,8	289	3,06	19,7	71,3	1870
	2	0_0	9,30	1,07	28,9	286	3,06	20,0	72,1	1840

Tab. 1: Vliv hemolýzy na měření



Graf 1: Ovlivnění stanovení antitrombinu

měření kontrolního materiálu s definovaným rozmezím na jedné nebo více hladinách.

Metodika stanovení na referenčním analyzátoru: protrombinový čas vyjádřený v sekundách a INR, Thromborel S, APTT, Pathromtin SL, trombinový čas, Thromboclotin (5 NIH), Antitrombin, Berichrom AT, Siemens, SRN, Fibrinogen, Fibrinogen Technoclone, Rakousko, D-dimer,

	Měření	H_I	PT (sec)	PT (INR)	APTT (sec)	Fbg (g/l)	Der F bg (mg/dL)	TT (sec)	AT (%)	DD (ugFEU/L)
100%	1.	0_25	11,0	1,23	27,10	1,62	-	24,5	79	8179
	2.	0_25	11,0	1,23	27,10	1,61	-	24,4	74,4	8208
50%	1.	0_12	10,6	1,20	27,60	1,88	181	16,6	81,5	4852
	2.	0_12	10,8	1,21	27,60	1,87	181	17	80,6	4865
0%	1.	0_0	10,8	1,18	33,00	2,2	231	20,1	90,2	<500
	2.	0_0	10,6	1,17	33,10	2,22	231	20	89,9	<500

Tab. 2: Vliv ikterického zabarvení na měření

Level 1								
Měření	**PT rec (s)**	**PT (INR)**	**APTT (s)**	**FBG (g/L)**	**AT (%)**	**TT (s)**	**DD (ugFEU/L)**	**Anti-Xa (IU/mL)**
Průměr	8,81	1,01	34,42	3,31	93,00	18,57	996,3	0,45
SD	0,04	0,00	0,09	0,05	0,64	0,09	10,78	0,01
CV %	0,46	0,49	0,25	1,39	0,69	0,48	1,08	1,61

Tab. 3: Hodnoty měření pro Level 1

Level 2								
Měření	**PT rec (s)**	**PT (INR)**	**APTT (s)**	**FBG (g/L)**	**AT (%)**	**TT (s)**	**DD (ugFEU/L)**	**Anti-Xa (IU/mL)**
Průměr	37,01	2,59	43,55	1,34	54,56	21,33	335,2	0,71
SD	0,07	0,03	0,33	0,01	1,09	0,28	19,96	0,01
CV %	0,19	1,16	0,75	0,60	1,99	1,33	5,96	1,48

Tab. 4: Hodnoty měření pro Level 2

Level 3								
Měření	**PTOwB (s)**	**PT (INR)**	**APTT (s)**	**FBG (g/L)**	**AT (%)**	**TT (s)**	**DD (ugFEU/L)**	**Anti-Xa (IU/mL)**
Průměr	45,26	1,99	61,66	6,53	98,09	16,14	448,6	0,2132
SD	0,05	0,00	0,31	0,04	0,86	0,12	7,21	0,01
CV %	0,11	0,00	0,51	0,60	0,88	0,74	1,61	3,79

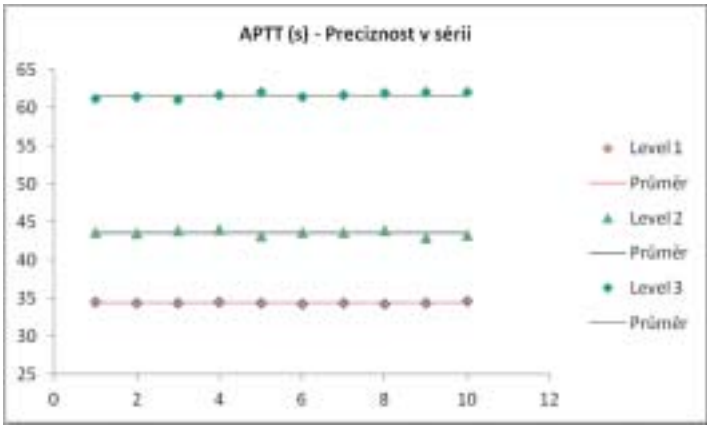
Tab. 5: Hodnoty měření pro Level 3

Při dalším posuzování koagulometru jsme se věnovali vlastnímu měření základních koagulačních parametrů: protrombinový čas (PT) vyjádřený v sekundách a INR, aktivovaný parciální tromboplastinový čas (APTT), trombinový čas (TT), antitrombin (AT), fibrinogen (Fbg), D-dimery a aktivita anti-Xa. Byla měřena preciznost v sérii, mezilehlá preciznost a ev. ovlivnění analýz vkládáním vzorků s různou hladinou analytu. Výsledky byly zpracovány statisticky. Všechny uvedené parametry byly porovnány rovněž referenčním analyzátorem, kterým je BCS XP, Siemens.

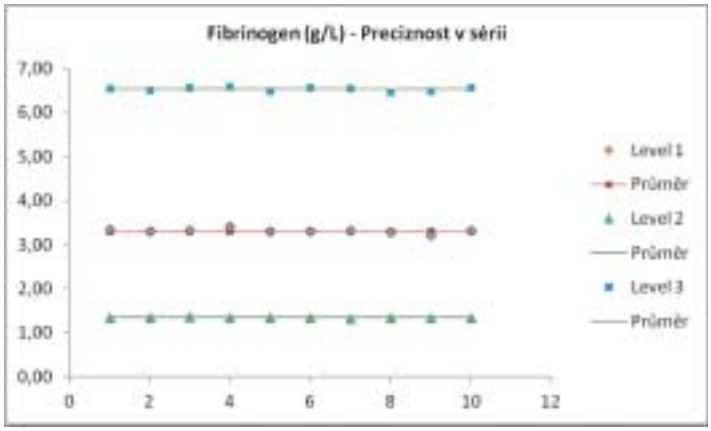
Při posuzování koagulometru jsme se řídili navrženým testovacím protokolem firmy Roche a také doporučením laboratorní sekce České hematologické společnosti: http://www.hematology.cz/doporuceni/laboratorni_sekce/files/obecna/Doporuceni_LS_CHS_CLS-Zavedeni_noveho_analyzatoru_v01.pdf

Provedli jsme více než 2 000 analýz vzorků plazmy citrátové krve standardně odebrané, centrifugované, ev. zamražené aliquoty (stejné podmínky jako při běžné laboratorní praxi). Zároveň jsme prováděli MediRox, Švédsko, aktivita antiXa, Biophen Heparin, Francie, analyzátor: BCS XP, Siemens, SRN.

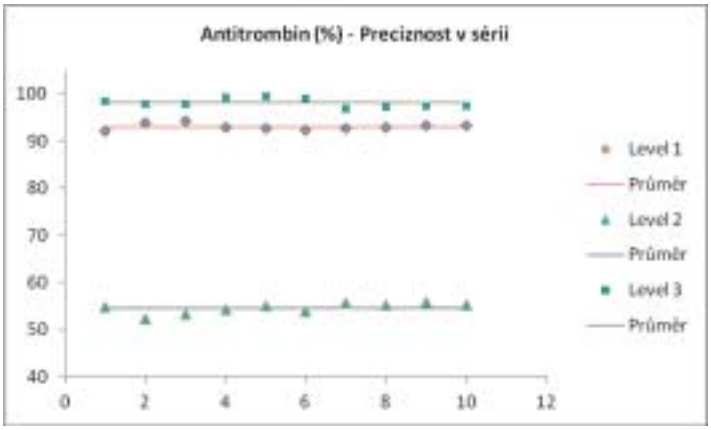
Metodika stanovení na analyzátoru **cobas t** 511: protrombinový čas vyjádřený v sekundách a INR, PT Rec a PT Owren, APTT a APTT screen, trombinový čas, TT cobas t, Antitrombin, AT cobas t, Fibrinogen, Fibrinogen cobas t, D-dimer, D-DI2 cobas t, aktivita anti-Xa, anti-Xa cobas t, Roche, Švýcarsko.



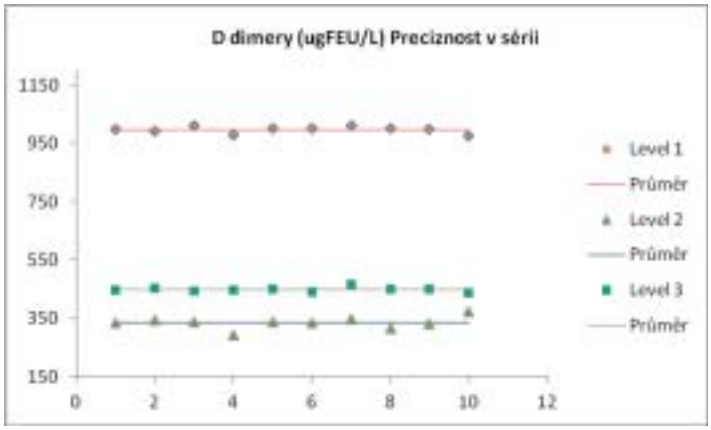
Graf 2: Preciznost v sérii pro koagulační stanovení



Graf 3: Preciznost v sérii pro koagulační stanovení s ředěným vzorkem



Graf 4: Preciznost v sérii pro chromogenní stanovení



Graf 5: Preciznost v sérii pro imunologické stanovení

Výsledky porovnání

Bylo provedeno 2 070 měření s využitím všech detekčních kanálů.

Preciznost v sérii:

Variační koeficient CV (%) se pohyboval v rozmezí 0,28–1,08 pro normální hladiny, 0,11–5,96 pro patologické hladiny. Jednotlivé statistické hodnoty pro jednotlivé parametry jsou znázorněny v tabulkách 3–6.

Graficky jsme znázornili preciznost v sérii pro každý jednotlivý kanál měření.

Mezilehlá preciznost:

Variační koeficient CV (%) se pohyboval v rozmezí 0,87–4,21 pro normální hladiny, 0,66–2,89 pro patologické hladiny. Pro stanovení mezilehlé preciznosti byl použit kontrolní materiál Roche.

Naměřená data preciznosti v sérii i mezilehlé preciznosti jsou v souladu s údaji uváděnými výrobcem i s požadavky na interní kontrolu kvality (IKK) a externí hodnocení kvality (EHK).

Závěr

Nízké hodnoty variačních koeficientů mezilehlé preciznosti i preciznosti v sérii ukazují na vhodnost zařazení nového analyzátoru do laboratorní praxe. Koagulometr **cobas t** 511 splňuje požadavky na kvalitní a přesné měření, které bylo porovnatelné s referenčním analyzátorem a které lze z klinického hlediska plně akceptovat.

Parametr	Typ kontroly	Jednotky	Průměr	SD	CV	Min.	Max.
PT Rec C	Con 2	s	27,1	0,36	1,32	26,4	27,8
	Con 1	s	8,84	0,20	2,26	8,74	9,93
PT Owren B	Con N	INR	0,987	0,01	0,872	0,968	1,01
	Con P	INR	1,97	0,03	1,55	1,9	2,03
aPTT	Con 2	s	54,7	0,96	1,75	52,7	57,4
	Con 1	s	32,6	0,38	1,16	32,1	33,6
aPTT screen	Con 2	s	46,8	0,65	1,39	45,6	48,7
	Con 1	s	27,9	0,19	0,662	27,5	28,2
Fibrinogen	Con P	g/l	1,32	0,03	2,57	1,26	1,39
	Con 1	g/l	2,68	0,08	2,89	2,54	2,85
Der Fib C	DerFib Con	mg/dl	254	5,80	2,28	243	267
TT	Con P+	s	38	1,14	3,02	35,9	39,9
	Con N	s	17,9	0,37	2,05	17,3	18,7
AT	Con N	%	99	2,84	2,87	93,3	104
	Con P	%	43,1	1,05	2,44	40,9	44,9
D-DI2	D-DI2 Con I	ng/ml	897	37,80	4,21	826	987
	D-DI2 Con II	ng/ml	3811	90,60	2,38	3661	4096
antiXa	LMWH HepCon L	IU/ml	0,379	0,01	1,91	0,363	0,394
	LMWH HepCon H	IU/ml	0,924	0,02	2,21	0,884	0,968

Tab. 6: Hodnoty měření kontrolního materiálu