

Verifikace metody „%CDT by HPLC“

Kociánová Klára
Ing. Vladimír Bartoš, Ph.D.

Lékařská fakulta OU, Ostrava
Ústav klinické biochemie, CLD FN Ostrava

Setkání uživatelů CDT

Odry, 11. - 12.11.2010

%CDT by HPLC

- Reagenční sada firmy Bio-Rad pro kvantitativní stanovení karbohydrát-deficientního transferinu v lidském séru.
- Pomocí sady se měří relativní množství CDT v poměru k celkovému transferinu

Bio-Rad VARIANT™ - HPLC

- K měření se používá analytický systém Bio-Rad VARIANT™ - HPLC
- Pro tento systém má metoda výrobcem validované výkonnostní charakteristiky



Charakteristiky metody

- Referenční interval: pod 1,9 %CDT
- Preciznost:

%CDT	1,14	6,25
Opakovatelnost (% CV)	4,90	1,71
Mezilehlá preciznost (% CV)	3,49	1,40
Celková preciznost (% CV)	5,91	2,17

- Mez detekce: 0,3 %CDT
- Linearita při ředění: do 25 %CDT lineární

Laboratorní verifikace metody

Charakteristiky metody, které byly
předmětem verifikace:

- ověření referenčního intervalu
- mezilehlá preciznost
- opakovatelnost
- vychýlení metody
- odhad nejistoty měření

Ověření referenčního intervalu

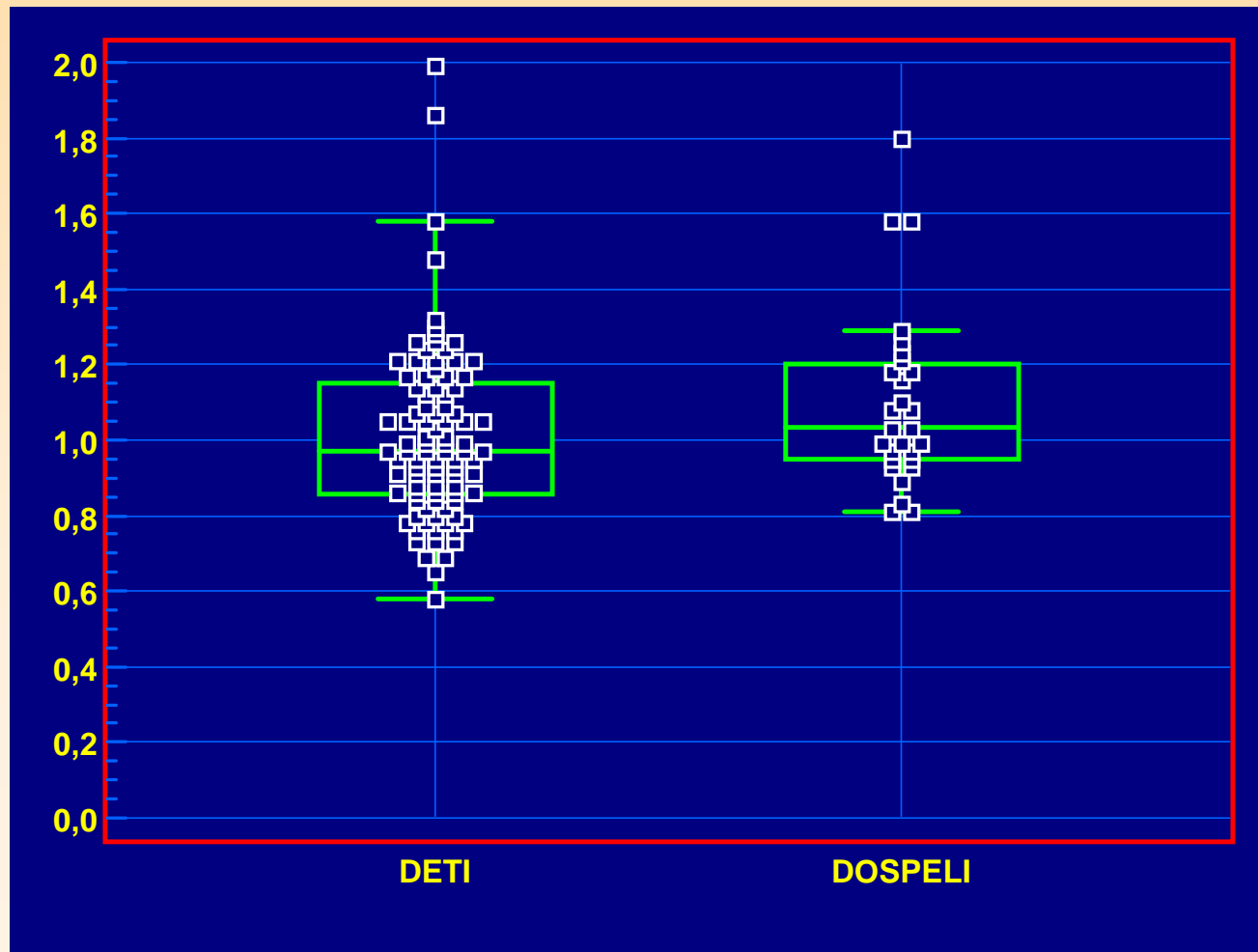
- **Problém:** jak získat reprezentativní skupinu poměrně dlouhou dobu abstinujících osob
- **Potíže:** získání dostatečného počtu vzorků dárců
- **Předpoklad:** dětská populace obvykle nekonzumuje alkohol
- **Návrh:** pokusit se použít pro tyto účely pediatrické vzorky

Ověření referenčního intervalu

Návrh - dva soubory vzorků:

- Děti: 150 pediatrických vzorků - získaných ze vzorků po analýze realizované v laboratoři pro jiné účely (prozatím analyzováno 95 vzorků)
- Dospělí: 50 vzorků dárců plasmy s jejich subjektivním vyjádřením o abstinenci (zatím analyzováno 30 vzorků)

Ověření referenčního intervalu



Ověření referenčního intervalu

Variable : DETI			
Sample size	=	94	
Lowest value	=	0,5800	
Highest value	=	1,9900	
Arithmetic mean	=	1,0141	
95% CI for the mean	=	0,9671 to 1,0612	
Median	=	0,9700	
95% CI for the median	=	0,9400 to 1,0500	
Variance	=	0,0529	
Standard deviation	=	0,2299	
Relative standard deviation	=	0,2267 (22,67%)	
Standard error of the mean	=	0,0237	
Kolmogorov-Smirnov test for Normal distribution : accept Normality (P>0.20)			
Percentiles :		2.5th =	0,6840
		5th =	0,7300
		10th =	0,7690
		25th =	0,8600
		97.5th =	1,6220
		95th =	1,3160
		90th =	1,2610
		75th =	1,1500

Variable : DOSPELI			
Sample size	=	28	
Lowest value	=	0,8100	
Highest value	=	1,8000	
Arithmetic mean	=	1,1029	
95% CI for the mean	=	1,0111 to 1,1946	
Median	=	1,0350	
95% CI for the median	=	0,9681 to 1,1819	
Variance	=	0,0560	
Standard deviation	=	0,2366	
Relative standard deviation	=	0,2145 (21,45%)	
Standard error of the mean	=	0,0447	
Kolmogorov-Smirnov test for Normal distribution : accept Normality (P>0.20)			
Percentiles :		2.5th =	0,8120
		5th =	0,8190
		10th =	0,8480
		25th =	0,9550
		97.5th =	1,7560
		95th =	1,6020
		90th =	1,4930
		75th =	1,2000

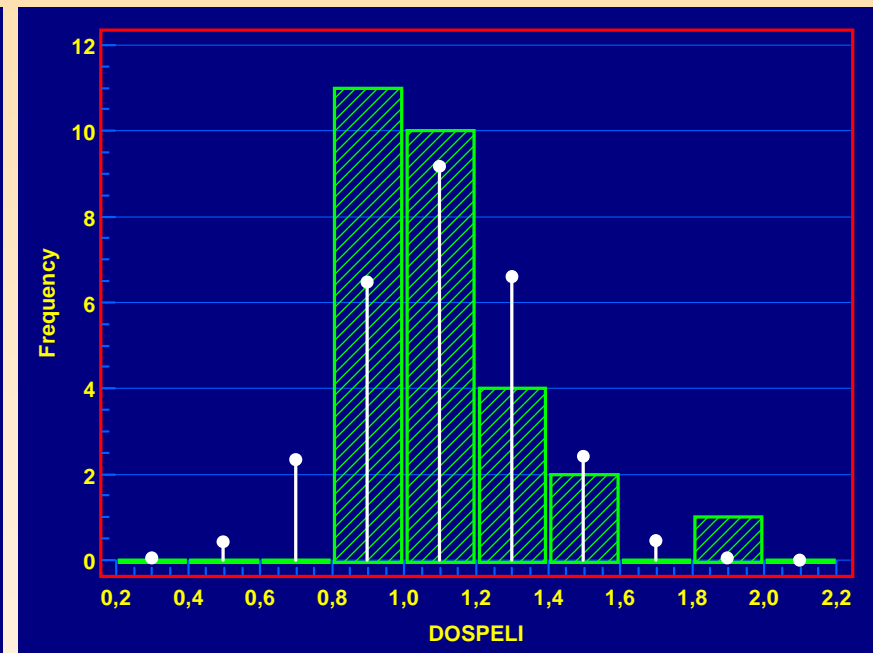
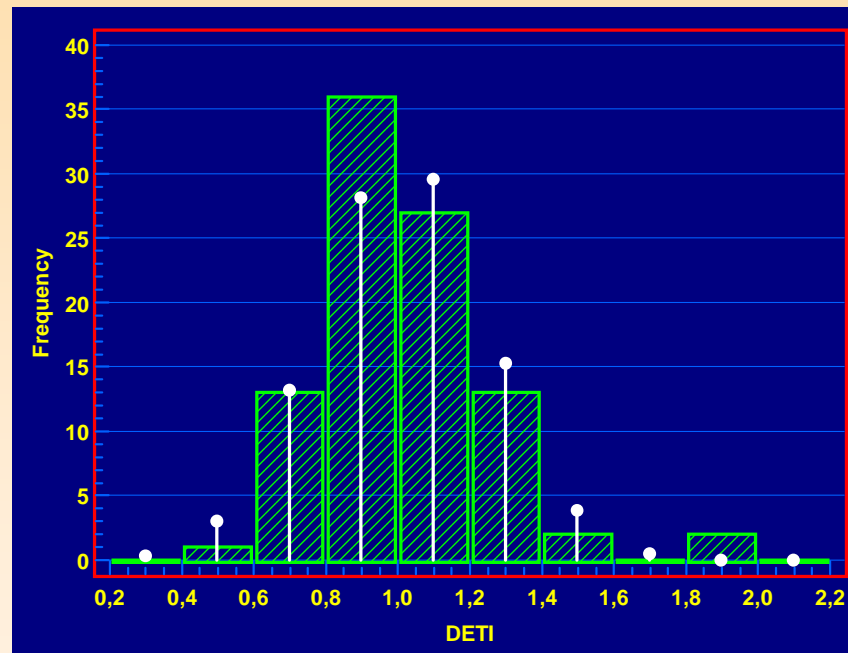
F-test:

Rozptyly lze považovat za shodné

t-test:

Průměry lze považovat za shodné

Ověření referenčního intervalu



Kolmogorov-Smirnovův test:

V obou případech se jedná o data s normální distribucí

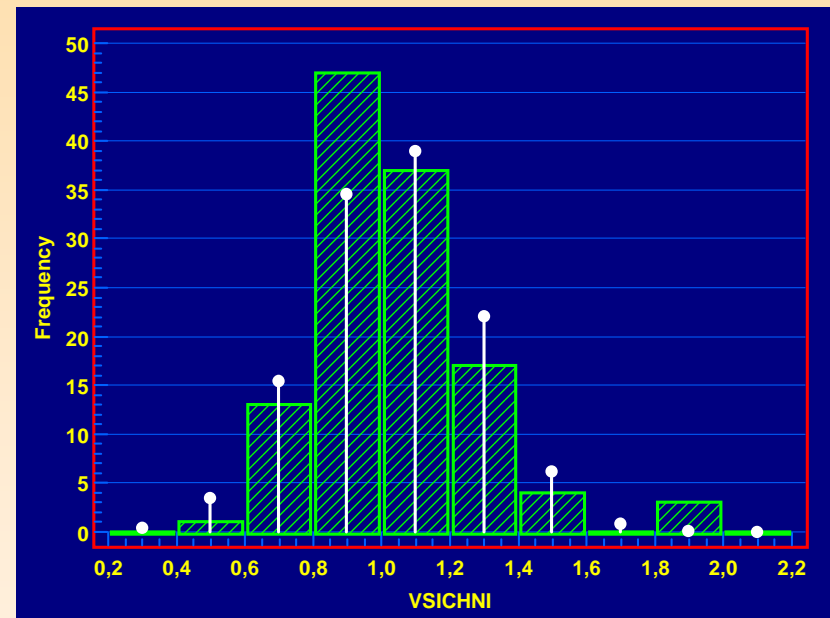
Ověření referenčního intervalu

```
Variable : VSICHNI

Sample size = 122
Lowest value = 0,5800
Highest value = 1,9900
Arithmetic mean = 1,0345
 95% CI for the mean = 0,9927 to 1,0764
Median = 0,9950
 95% CI for the median = 0,9600 to 1,0500
Variance = 0,0545
Standard deviation = 0,2335
Relative standard deviation = 0,2257 (22,57%)
Standard error of the mean = 0,0211

Kolmogorov-Smirnov test
for Normal distribution : accept Normality (P=0,170)

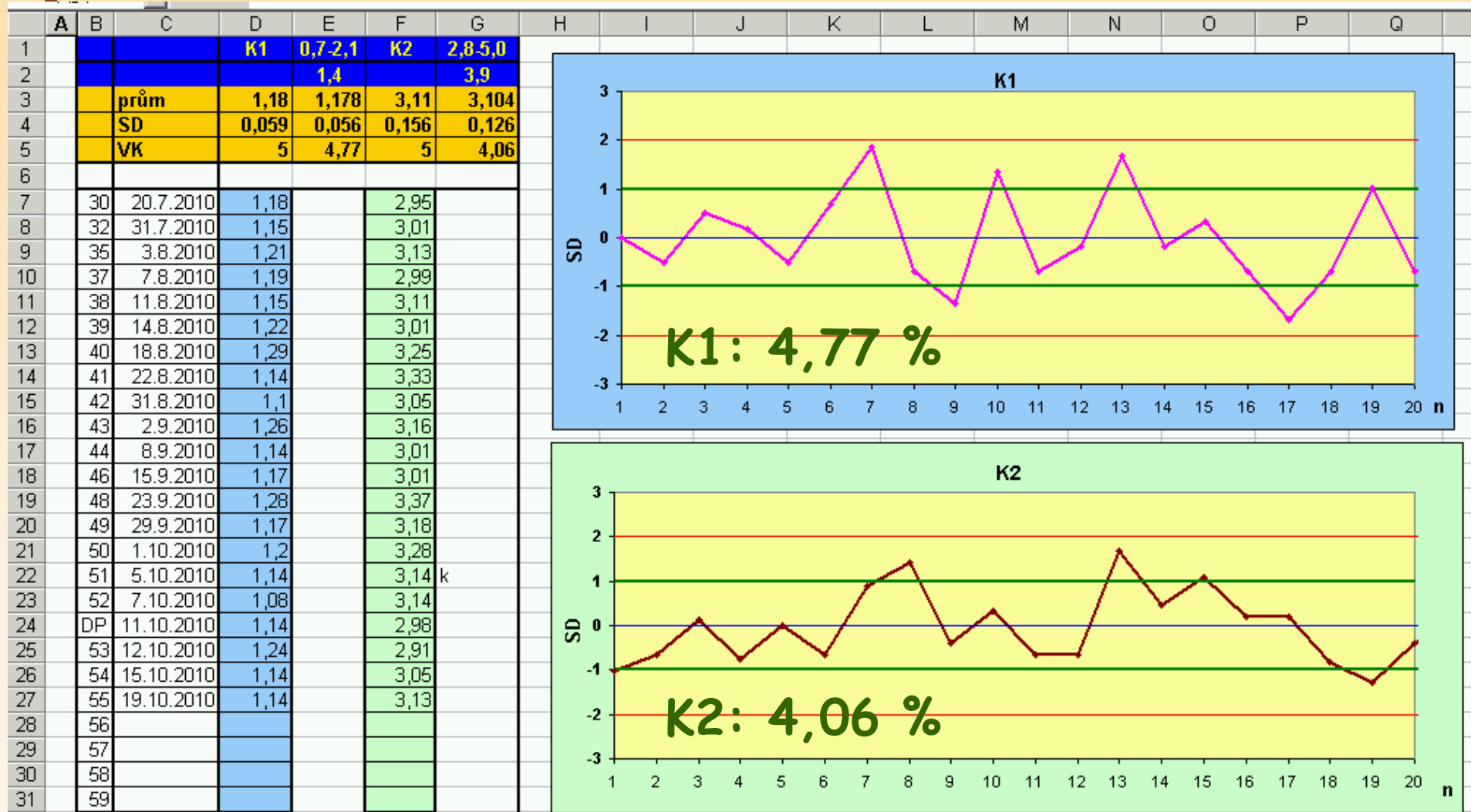
Percentiles : 2.5th = 0,6955 97.5th = 1,6790
              5th = 0,7360 95th = 1,5200
              10th = 0,7900 90th = 1,2700
              25th = 0,8800 75th = 1,1700
```



Průměr: 1,03 %CDT
Průměr + 3SD: 1,73 %CDT

výrobce: 1,23 %CDT
1,90 %CDT

Mezilehlá preciznost



Opakovatelnost

	K1	K2
	1,23	3,15
	1,3	3,01
	1,22	3,06
	1,24	3,1
	1,29	2,94
	1,23	2,78
	1,15	2,95
	1,22	2,99
	1,34	3,03
	1,27	3,08
Průměr	1,249	3,009
SD	0,053	0,104
VK (%)	4,24	3,46

%CDT Controls

Bio-Rad, Lot: 110300

Control 1 = 4,24 % (1,3 %CDT)

Control 2 = 3,46 % (3,2 %CDT)

Vychýlení metody

%CDT Controls Bio-Rad

Lot: 110300

Deklarace výrobce:	Lab.	Bias [%]
K1 = 1,3 (0,6-2,0) %CDT	1,25	-3,85
K2 = 3,2 (2,1-4,3) %CDT	3,01	-5,9

Poznámka:

U kontrol lot 109635 používaných pro VKK bylo pozorováno vychýlení na úrovni 9%

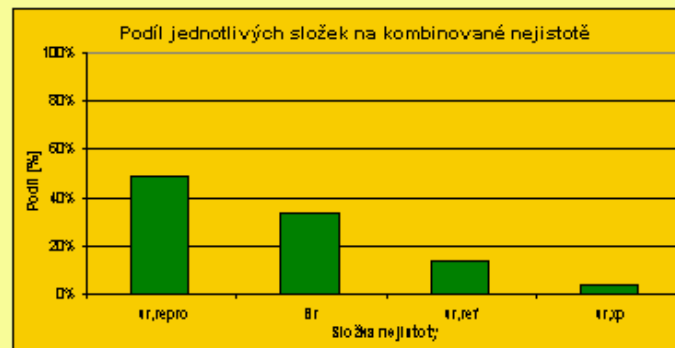
Nejistota měření - negativní

Výsledek: $u_{r,tot} = 6,8 \%$

$$u_{r,tot} = \sqrt{u_{r,repr}^2 + B_r^2 + u_{r,ref}^2 + u_{r,sp}^2}$$

	Výsledek y VKK	Výsledek y měření RM
1	1,18	1,23
2	1,15	1,3
3	1,21	1,22
4	1,19	1,24
5	1,15	1,29
6	1,22	1,23
7	1,29	1,15
8	1,14	1,22
9	1,1	1,34
10	1,26	1,27
11	1,14	
12	1,17	
13	1,28	
14	1,17	
15	1,2	
16	1,14	
17	1,08	
18	1,14	
19	1,24	
20	1,14	
21	1,14	
22		
23		
24		
25		
26		
27		
28		
29		

	Spočteno automaticky	Ruční zadání
a) Referenční hodnota (RH):	1,3	1,3
b) Nejistota RH ($u_{r,rh}$):	2,5	2,5
VKK		
c) Počet výsledků (n):	21	
d) Střední hodnota (AM):	1,18	
e) Mezilehlá přesnost (SD):	0,06	
f) Mezilehlá přesnost (CV):	4,8	
Měření RM		
g) Počet výsledků (n):	10	
h) Střední hodnota (AM):	1,25	
i) Opakovatelnost (SD):	0,05	
j) Opakovatelnost (CV):	4,2	
Mezilehlá přesnost (CV):	4,8	4,8
Bias relativní (B_r):	-3,9	-3,9
Nejistota průměru $u_{r,sp}$:	1,3	1,3



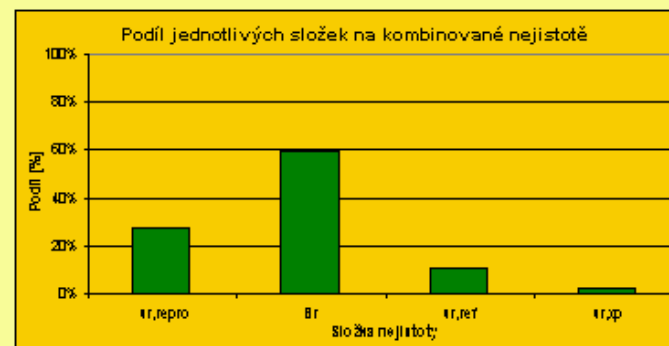
Nejistota měření - pozitivní

Výsledek: $u_{r,tot} = 7,7 \%$

$$u_{r,tot} = \sqrt{u_{r,repo}^2 + B_r^2 + u_{r,ref}^2 + u_{r,sp}^2}$$

	Výsledek y VKK	Výsledek y měření RM
1	2,95	3,15
2	3,01	3,01
3	3,13	3,06
4	2,99	3,1
5	3,11	2,94
6	3,01	2,78
7	3,25	2,95
8	3,33	2,99
9	3,05	3,03
10	3,16	3,08
11	3,01	
12	3,01	
13	3,37	
14	3,18	
15	3,28	
16	3,14	
17	3,14	
18	2,98	
19	2,91	
20	3,05	
21	3,13	
22		
23		
24		
25		
26		
27		
28		
29		

	Spočteno automaticky	Ruční zadání
a) Referenční hodnota (RH):	3,2	3,2
b) Nejistota RH ($u_{r,ref}$):	2,5	2,5 %
VKK		
c) Počet výsledků (n):	21	
d) Střední hodnota (AM):	3,10	
e) Mezilehlá přesnost (SD):	0,13	
f) Mezilehlá přesnost (CV):	4,1 %	
Měření RM		
g) Počet výsledků (n):	10	
h) Střední hodnota (AM):	3,01	
i) Opakovatelnost (SD):	0,10	
j) Opakovatelnost (CV):	3,5 %	
Mezilehlá přesnost (CV):	4,1 %	4,1
Bias relativní (B_r):	-6,0 %	-6,0
Nejistota průměru $u_{r,sp}$:	1,1 %	1,1



Relativní nejistota měření

Pro oblast koncentrací:

- pod „cut-off“: 6,8% (1,2 %CDT)
- nad „cut-off“: 7,7% (3,1 %CDT)

Relativní nejistota měření lepší než 8%

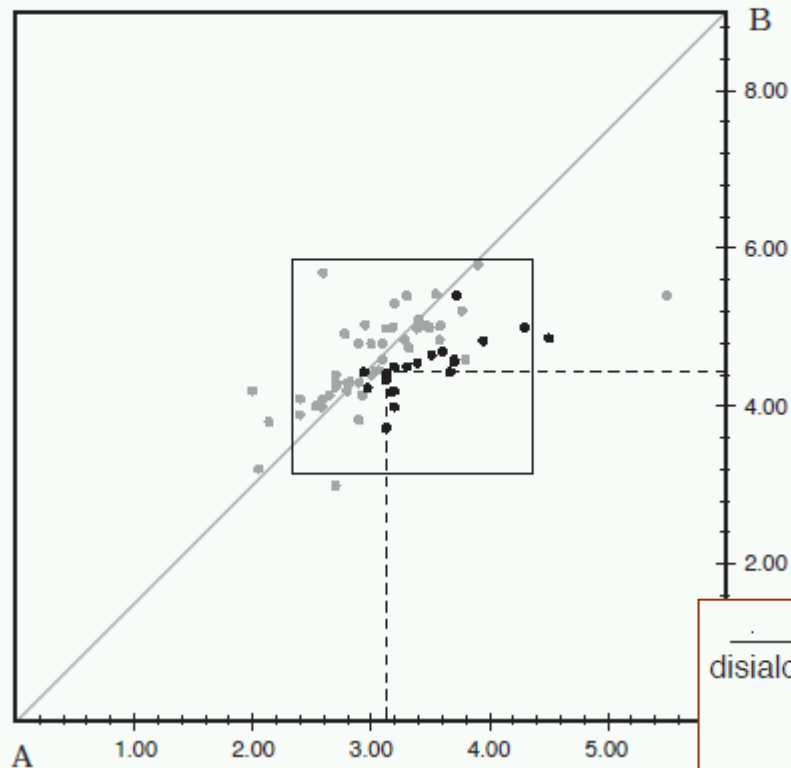
Výsledky v EHK

Youden diagrams DT2/10, Participant No [REDACTED], page 1 of 1

Analyte **disialo-transferrin**
Method **all methods**

success rate 88,8 %

out of range 0



Sample A %

M Kit	N	Min	16.P	50.P	84.P	Max	1	2	3	4	5
Alle	72	0	2.68	3.13	3.62	5.50					
3 2	20	2.94	3.13	3.35	3.87	4.50					
3 47	18	0	2.54	2.92	3.30	5.50					
3 75	17	2.05	3.09	3.39	3.62	3.90					
3 99	3	2.78		2.90		3.59					
5 99	2	2.14		2.27		2.40					
5 101	12	2.40	2.60	2.70	2.99	3.80					

Sample B %

M Kit	N	Min	16.P	50.P	84.P	Max	2	4	6	8
Alle	72	3.00	4.10	4.50	5.02	5.80				
3 2	20	3.73	4.19	4.50	4.85	5.41				
3 47	18	3.00	3.92	4.31	5.03	5.40				
3 75	17	3.21	4.59	5.00	5.32	5.80				
3 99	3	4.80		4.92		5.02				
5 99	2	3.81		3.86		3.90				
5 101	12	4.10	4.10	4.30	4.58	5.70				

Other kits (number):

The deviation of your results from the median of the corresponding sub-collective (kit) is:

A	-6.43 %
B	-1.78 %

	C	M	R	D/Dmax	T	LL	UL
disialo-transferrin [%]	+	3	A 3.13 B 4.42	-0.22 -0.06	3.35 4.50	2.34 3.15	4.36 5.85
Judgement [ohne]	+	1	A path. B path.		susp. path. path.	susp. path. path.	path. path.

Závěr

Referenční interval:

cut-off = 1,73 %CDT 1,9 %CDT

Mezilehlá preciznost:

1-3 %CDT: 4,8 % 3,5 %

Opakovatelnost:

1-3 %CDT: 4,2 % 4,9 %

Vychýlení:

1-3 %CDT: 6-9 %

Relativní nejistota měření: lepší než 8%

Závěr

- Výkonnostní charakteristiky metody vcelku splňují validované hodnoty výrobce
- Existuje záporné vychýlení metody na úrovni 6-10 %
- Záporné vychýlení potvrzují i výsledky v EHK
- Negativní odchylka se projevuje i při laboratorním odhadu hodnoty „cut-off“
- Laboratoř nadále používá hodnotu uváděnou výrobcem
- Po eliminaci vychýlení by se snížila nejistota měření na úroveň 5%
- Přispělo by ke snížení záporné odchylky použití kalibrátorů ?