

Identifikace a zohlednění podstatných zdrojů nejistoty jsou důležitější, než samotný způsob výpočtu

B. Friedecký, J. Kratochvíla, SEKK spol. s r.o. Pardubice

Hlavní příčinou problémů jsou jejich řešení
(John. D. Barrow)

GUM, top-down, analytická kontrola kvality, souvislosti s metrologickou návazností, referencí a validací

Základní pramen pro výpočet nejistot, pokyn ISO Guide for Uncertainty Measurement - GUM [1- 3], rozeznává dva přístupy ke stanovení odhadu nejistot výsledků měření. První z nich je postup „top-down“, který počítá nejistotu z hodnot preciznosti a bias a používá přitom data získaná při validacích, verifikacích, vnitřní kontrole kvality a externím hodnocení kvality. Druhý způsob („bottom-up“) vyžaduje vypracovat model hodnoceného měření, který zpracovává matematickým přístupem hodnocení stochastických jevů Monte Carlo. Tento způsob je exaktnější a přesnější, ale pro rutinní klinické laboratoře je nevhodně náročný.

Zůstaňme zatím u jednoduššího přístupu top-down. Již definice předmětu měření, která je nutnou počáteční podmínkou před vlastním výpočtem odhadu nejistot, je při své zdánlivě banalitě občas neproveditelná s dostatečnou exaktností. (Soudobým šlágrum je v okamžiku, kdy je psán tento text třeba problém s identitou parathormonu jakožto předmětu měření). Identifikace všech významných zdrojů nejistoty, použití certifikovaných referenčních materiálů a poznatků metrologické návaznosti, použití dat z řízení analytické kvality a z validací jsou klíčovými body výpočtu odhadu nejistoty. Tyto entity je třeba identifikovat, náležitě vyhodnotit a také prakticky aplikovat. Jinak zůstaneme jen u více, či méně povedené hry s čísly a daty, transformujícími se v procesu akreditace na hru s auditorem o certifikát.

K čemu vlastně slouží informace o nejistotě výsledku měření v laboratorní medicíně? **V zásadě k rozhodování, zda výsledek měření v klinické laboratoři lze přijmout jako užitečnou informaci nebo zda je nezbytné ho odmítnout [3].** Tedy k posouzení „přiměřenosti shody“ výsledku měření s požadavkem (například diagnostickým), často i formulovaným jako právní předpis (třeba u potravin či environmentálních analýz aj.). Formálně je výpočet odhadu nejistoty jedním z požadavků akreditace klinické laboratoře podle normy ISO 15189. Rozhodně jde o mnohem více, než o pouhé srovnání dosažených dat měření s daty, inzerovanými výrobcí diagnostik, kde jde navíc o data, u nichž nelze vyloučit jejich případné zkreslení obchodní reklamou výrobce.

Zatímco mezinárodní úsilí o formulaci obecných postupů výpočtu nejistot bylo kodifikováno známým doporučením GUM v roce 1995 [1] a průběžně upravováno a upřesňováno [2], americký přístup k výpočtu odhadu

nejistot byl dlouhou dobu liknavý a ještě zcela nedávno dávali američtí autoři jednoznačně přednost přístupu k hodnocení pomocí celkové chyby před nejistotou [4]. Je příznačné, že velmi agilní J. O. Westgard, který se pojetí nejistoty měření nikterak nevěnuje, svěřil pojednání o ní na svých stránkách (www.westgard.com) autorovi australského doporučení o nejistotách (verze GUM, varianta top-down) Whitemu. Nové doporučení CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute) o výpočtu nejistoty C 51-A vydané v roce 2012 a popisované v tomto čísle není rozhodně nějaký principiálně nový předěl v historii výpočtu nejistot. Je poctivým, ale s doporučením GUM zcela konformním textem. Však také na jeho tvorbě mají lví podíl evropští a australští ostřílení matadoři nejistot Kallner, Giroud, White, Tholen za vydatné asistence amerického kruhu přátel nejistot Kleeho, Loa, Boyda. Lze prostě uzavřít, že doporučení CLSI a Doporučení ČSKB jsou mezi sebou poměrně kompatibilní. Jak by ne, když bazírují na stejných metodických základech. V žádném případě nebudí doporučení CLSI C 51-A dojem větší jednoduchosti. Prostě se v obou případech vkládají identická data do poněkud odlišných programů (matematický popis v práci Ambrožové je snad dostatečným varováním před manuálními výpočty). Pokud jsou vložena správná, reálná a dostatečně úplná data, obdrží se také oběma doporučeními identické výsledky při vynaložení identického pracovního úsilí.

Obdobný postup jako u doporučení ČSKB pro výpočet nejistoty zvolili před několika lety v Austrálii a na Novém Zélandu. Jde i zde o kombinaci náhodné chyby, nejistoty bias a nejistoty kalibrační/referenční hodnoty. Ta je získaná buď z certifikátu referenčního materiálu, nebo jako hodnota SEM střední hodnoty replikátů rutinních měření [5]. Zjednodušení v práci Whiteho je doporučeno možným zanedbáním bias, jestliže činí $b \leq 10\%$ hodnoty nejistoty z preciznosti, nebo jestliže platí vztah: $b \leq U_{ref}$. (Bias je menší, než nejistota hodnoty referenčního materiálu). Také skandinávská doporučení, vypracovaná formou příslušného Doporučení/guidelines (Nordtest) preferují výpočet nejistoty z dat řízení analytické kvality. Používají dat mezilehlé preciznosti a dat nejistoty bias, počítané kombinací RMS bias (Root Mean Square)-odmocniny součtu diferencí jednotlivých měření referenčního materiálu od referenční nebo střední hodnoty a nejistoty referenční (střední) hodnoty samotné [6]. Používají také dat z vnitřní kontroly kvality a externího hodnocení kvality. Prakticky stejně, jako v doporučení ČSKB. Totožný způsob (nejistoty preciznosti, bias a hodnoty referenčního materiálu) použili při nedávném hodnocení nejistoty měření sérového albuminu v Itálii a zjistili poměrně typickou situaci pro poměry v klinické biochemii. Totiž velký, až dominující podíl systematické chyby jakožto dílčí složky celkové nejistoty [7].

Bottom-up přístup a rozpačitá úroveň nejistot světových referenčních laboratoří

Hodí se k výpočtu nejistot referenčních postupů a certifikovaných referenčních materiálů. Pokud se někdo detailněji zajímá o přístup Monte Carlo při řešení problémů laboratorní medicíny, lze k přečtení doporučit práci o vyhodnocení nejistoty prealbuminu v pracovním kalibrátoru Beckman Coulter nebo neméně zajímavou práci o výpočtu nejistoty pomocí vyhodnocení kalibračního modelu stanovení cholesterolu na přístroji Modular Roche. V první práci je vyčíslena nejistota hodnoty prealbuminu v pracovním kalibrátoru vyhodnocením dílčích nejistot, vznikajících při přenosu hodnot z certifikovaného referenčního materiálu CRM 470 přes firemní „master kalibrátor“ až po pracovní kalibrátor (product calibrator). Konkrétně šlo o nejistoty navažování, dávkování, diluce, variability mezi dvěma šaržemi a čtyřmi přístroji [8]. V druhém případě byl modelován a přístupem Monte Carlo hodnocen kalibrační model měření cholesterolu na přístroji Modular Roche, vyhodnocující nejistotu kalibrace, nejistotu přístroje a kombinující obě složky do výsledné nejistoty [9]. Nejistota kalibrace byla hodnocena jako závislost na koncentraci kalibrátoru, mezilahvičkové variabilitě a stabilitě po rekonstituci. Druhá série dílčích nejistot byla spjata s nejistotami přístroje při dávkování vzorku, dávkování reagensů a nejistota spektrofotometrie. Je jasné, že tyto důkladné postupy, se mohou (a musí) uplatňovat v referenční analytice a že je však mizivá naděje k jejich uplatnění v rutinních měřeních.

Program externího hodnocení kvality referenčních laboratoří IFCC, známý jako RELA (<http://www.dgkl-rfb.de:81/index.shtml>), a prováděný pravidelně již řadu let, vyžaduje po účastnících uveřejňovat kromě výsledků měření i jejich nejistoty. Přestože se jedná o akreditované referenční laboratoře (akreditace dle ISO 15195), které mají představovat odbornou analytickou špičku, používající k měření referenčních měřících postupů, certifikovaných referenčních materiálů a vysoce kvalifikovaného personálu, jsou intervaly uváděných nejistot překvapivě široké. Za rok 2011 je to pro draselný kation 0,8 % až 3,7 %, pro glukózu 1 % až 2,6 %, pro ALT 1,5 % až 2,5 %, pro glykovaný hemoglobin HbA1c 2,5 % až 3,5 %. To ukazuje, že problém výpočtu nejistot není plně zvládnutý a naprosto standardní ani u referenčních měření. Jsou tyto rozdíly snad důsledkem různých metod použitých výpočtů nebo (a což je mnohem pravděpodobnější) důsledkem různého stupně podchycení všech podstatných dílčích zdrojů celkové nejistoty? Je úkolem analytiků spíše zlepšit úroveň výpočtů, nebo je snad cílem výpočty zjednodušit a jejich kvalitou se zas až tak nevzrušovat?

Nejistoty hodnot referenčních materiálů a pracovních kalibrátorů

Pro výpočet odhadu celkové nejistoty je důležité znát nejistoty referenčních a kalibračních hodnot. Tyto nejistoty jsou například vyhledatelné u kalibrátorů Roche na webových stránkách firmy v oddíle „Příbalové letáky“

a u kontrolních materiálů RfB DGKL Bonn v jejich certifikátech, které bývají součástí vyhodnocení kontrolních cyklů SEKK (AKS, PRO, KD, ABR, CRP aj.), takže jsou plně přístupné a archivované. Hodnoty odhadu nejistot u obou jsou velmi podobné a patrně pocházejí z „dílny“ stejných pracovníků. V mnoha dalších cyklech SEKK, zabývajících se analyty, kde chybí standardizace, metrologická návaznost a hodnoty referenčních postupů, jsou uvedeny odhady nejistoty vztažných hodnot (U_{AV}), kalkulované z výsledků účastníků podle normy ISO 13528 a rovněž použitelné pro výpočet laboratorních odhadů nejistot. Ve sdělení Ambrožové nejsou tyto nejistoty ani zmíněny, ani použity.

Nová verze ISO 15189/2012 (11) a odhady nejistot

Je již přeložená do českého jazyka a bude publikována na jaře 2013 v tisku a běžně dostupná přes UNMZ Praha (Ústav pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví; <http://www.unmz.cz/urad/unmz>). Mimo jiné změny inovuje přístup k nejistotám (a zejména se k jejím výpočtům vyjadřuje jasněji, než ve starší verzi z roku 2007) a doporučuje pro rutinní klinické laboratoře přístup, vycházející z kontroly analytické kvality (mezilehlá preciznosti a nejistoty kalibrační referenční hodnoty). To se zdá velmi logické, protože postup vychází ze standardních, v každé laboratoři přístupných dat, které by měly být velmi úzce provázané s každodenní laboratorní činností a v takové logické provázanosti i hodnoceny auditory. V novém znění této základní normy pro klinické laboratoře je nejistotě věnován Odstavec 5.5.1.4 - Nejistota měření hodnot měřené veličiny (kalibraci a metrologické návaznosti pak odstavec 5.3.1.4.). Hlavní zásady lze shrnout následovně:

- Odhad nejistoty se stanovuje u každého měřícího postupu daného laboratorního vyšetření
- Hodnota odhadu nejistoty se pravidelně přezkoumává
- Doporučuje se k výpočtu používat dat validace, vnitřní kontroly kvality a EHK
- Zahnují se přiměřeným způsobem hlavní rutinní změny při standardním prováděném měření, zejména pak změny šarží kalibrátorů, změny šarží reagensů, změny personálu, změny v důsledku plánované údržby.

Je na postupu CLSI něco zásadně nového

Proces interpretovaný v CLSI C 51-A J. Ambrožovou [10] je v principu podobný (nezahrnuje ale bias a složky nejistot z reference) s procesem, popsaným v doporučení ČSKB a při vložení stejných dat můžeme očekávat i přibližně podobné hodnoty odhadu nejistot. Není jasný důvod, proč by měl být postup CLSI považovaný za jednodušší a lepší, než postupy ostatní, jak je v textu se záviděníhodným sebevědomím tvrzeno.

Pokud použijeme u kalkulátoru nejistot, založeném na postupu ČSKB stejných dat, jako J. A., obdržíme hodnotu nejistoty U_c pro močovinu 3,4% oproti hodnotě $U_c = 3,2\%$, uváděné v článku. Tento nevelký rozdíl ($D = 0,2\%$) je dán zřejmě převážně faktem, že autorka nevezala v úvahu nejistotu referenční hodnoty močoviny (použili jsme hodnoty $U_{ref} = 1\%$ pro kontrolní materiál RfB DGKL Bonn (<http://www.dgkl-rfb.de/>) z kontrolního cyklu SEKK AKS 1/13). Pokud by byla započtena i hodnota nejistoty bias, pak by se realistická hodnota rozšířeného odhadu nejistoty stanovení močoviny U_c v českých laboratořích pohybovala mezi 7% až 8% a hodnota 13, uváděná autorkou by byla známkou vážné kalibrační chyby, která nebyla z nejasných důvodů laboratoří korigovaná. Zkrátka nejistota uvedené velikosti by byla zřejmě důvodem k odmítnutí výsledku měření.

Použití metody výpočtu ANOVA je jistě elegantní a není důvod ho odmítat nebo zlehčovat (např. zejména při hodnocení podílů různých druhů preciznosti opakovatelnosti a mezilehlé preciznosti), ale dle našeho názoru žádný zásadní pokrok oproti současným používaným postupům nepředstavuje. Navíc existují i mnohé modernější statistická software (Varcomp, S-plus, SAS, SPSS aj.), též dobře využitelná pro výpočty odhadu nejistot výsledků měření.

Za pozornost stojí úvaha, nastolená autorkou, zda má být validační postup vždy co nejjednodušší. Myslíme si, že výsledky validace mají poskytnout realistické hodnoty odhadu nejistot jako spolehlivé základní parametry analytické kvality laboratorního vyšetření a jeho míry schopnosti podílet se na diagnostice a terapii a ne jen prezentovat jednodušší výpočty nejistot tak, abychom si maximálně ulehčili proces validace, a to i za cenu nedobře odhadnuté hodnoty nejistoty. Samotné praktické provedení výpočtu je u obou postupů založeno na v podstatě stejné pracovní operaci, totiž na vložení dat do programu počítače/kalkulátoru. Jde jen o kvalitu a kompletnost těchto dat. Myslíme si, že úvaha autorky vychází z diskutabilní myšlenky, že nejdůležitějším ukazatelem analytické kvality výsledků měření je shoda údajů klinických laboratoří s daty preciznosti, udávanými výrobcí IVD. Není však logičtější žádat po výrobcích, aby bylo možné dosahovat nejistot, vhodných pro péči o pacienty, než jen potvrzovat údaje, proklamované výrobci? Velmi důležitá, v návrhu nového znění normy ISO 15189-2012, je potřeba průběžné kontroly a v případě potřeby úprava hodnoty nejistoty při výměně šarží a po údržbě. Tento fakt je v práci Ambrožové pominut a snad hlavně tímto je vsugerováno čtenáři falešně zdání vyšší jednoduchosti procesu. Navíc je chronicky známé, že výrobci nevěnují dostatečnou pozornost systematickým chybám svých vlastních analytických systémů. Výsledky externího hodnocení kvality referenčních laboratoří v cyklech RELA (program EHK pro referenční laboratoře IFCC a kalibrační laboratoře výrobců) a závažné kalib-

rační difference u teoreticky dobře standardizovaných analytů varují před podceňováním systematických diferencí. Celý postup, navrhovaný J. Ambrožovou se však o systematické chyby jako podstatný a někdy hlavní podíl celkové nejistoty zajímá jen okrajově. A přitom i u velmi dobře standardizovaných analytů základního vyšetření krevního séra nejsou tyto difference 5% až 11% vůbec neobvyklé [12].

Situace, v níž se současný stav analytiky v klinických laboratořích nachází, nedovoluje žádná podcenění hodnot systematických diferencí (viz například data webové stránky www.westgard.com). Myslíme si tedy, že současné doporučení ČSKB o nejistotách lze i nadále doporučit jako základ jejich seriózního hodnocení a odhadu, které je přitom plně kompatibilní s novou normou ISO 15189/2012 (ISO ČSN 15189/2013).

Literatura

1. ISO Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM), Geneve 1995 www.eurachem.org: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement 3rd Edition 2012.
2. Eurachem-CITAC Guide CG4: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement CITAC 2012.
3. Metodický list 9. Z. Plzák: Použití informace o nejistotě při posuzování shody 2012. Dostupné na www.eurachem.cz.
4. **Krouwer, J. S.** Setting performance goals and evaluating total analytical error for diagnostic assays. *Clin. Chem.* 2002, 48: 919-927.
5. **White, G. B.** Basic of Estimating Measurement Uncertainty. *Clin. Biochem. Rev.* 2008, 29, Suppl. S 53.
6. **Magnusson, B., Ossowitzki, H., Rienitz, O., Theodorsson, E.** Routine internal-and external-quality control data for estimating measurement and diagnostic uncertainty using GUM principles. *Scand. J Clin. Lab. Invest.* 2012, 72: 212-220.
7. **Mozi, R., Valente, C., Panteghini, M.** Is the accuracy of serum albumin measurements suitable for clinical application of the test? *Clin. Chim. Acta* 2011, 412: 791-792.
8. **Middleton, J., Veks, J. E.** Evaluation of Assigned Value Uncertainty for Complex Calibrator Value Assignment Processes. *Clin. Chem.* 2007, 53: 735-742.
9. **Ramamohan, V., Abbott, J., Klee, G. G., Yih, Y.** Application of mathematical models of system uncertainty to evaluate the utility of assay calibration protocols. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2012, 50: 1945-1951.
10. **Ambrožová, J.** „Za hranice nejistoty“: Použití techniky one way ANOVA současně pro odhad nejistoty měření a k verifikaci preciznosti měřícího postupu. *Klin. Biochem. Metab.* 2013.
11. ČSN EN ISO 15189/2012 Zdravotnické laboratoře – Požadavky na kvalitu a způsobilost UNMZ Praha 2013.
12. **Van Houcke, S. K., Rustad, P., Stepman, H. C. M. a spol.** Calcium, Magnesium, Albumin and Total Protein Measurement in Serum as Assessed with 20 Fresh-Frozen-Single-Donation Sera. *Clin. Chem.* 2012, 58: 1597-1599.