

Doporučení pro určení odhadů nejistot výsledků měření/klinických testů v klinických laboratořích

Suchánek M.¹, Friedecký B.², Kratochvíla J.², Budina M.², Bartoš V.³

¹VŠCHT Praha

²SEKK Pardubice

³Fakultní nemocnice Ostrava

Na dokumentu spolupracovali členové pracovní skupiny: Balíková M., Benáková H., Brdička R., Holec V., Král V., Krýsl S., Kuncířová J., Pelinková K., Tolarová V., Zima T.

Úvod

Výsledek měření analytu či parametru danou metodou je v laboratorní medicíně, stejně jako výsledek každého měřicího procesu, jen odhadem skutečné koncentrace (obsahu, množství). Tento výsledek měření tedy nemůže představovat vlastní exaktní hodnotu bez znalosti přidruženého údaje, kterým je nejistota výsledku.

Nejistota výsledku měření představuje interval, ve kterém se nachází s deklarovanou mírou pravděpodobnosti skutečný výsledek měření. Nejistota demonstruje metrologickou kvalitu výsledků měření, zlepšuje porozumění analytickému procesu a umožňuje porovnávat výsledky měření. Bez znalosti nejistoty není možné odhadnout spolehlivost výsledku při jeho použití v klinické praxi.

Cílem doporučení je pomoci laboratorním pracovníkům při odhadu nejistot a podílů jejích složek pro jejich vlastní laboratorní měření do té doby, než bude přijato a akceptováno doporučení mezinárodních odborných společností, jejichž pracovní komise se touto problematikou rovněž zabývají. Doporučení vychází i ze skutečnosti, že normy ISO 17025 a ISO 15189 určování odhadů nejistot vyžadují. Předkládané doporučení vzniklo jako konsenzus skupiny odborníků z různých oborů laboratorní medicíny a vysokých škol a představuje možný reálný postup určení odhadu nejistot. Není to závazný pokyn, norma či nařízení a je samozřejmě vedle vlastního použití v rutinní klinické laboratoři určeno i k diskusi v odborné veřejnosti.

Poznámka: Všude, kde se v textu píše o nejistotě, míní se samozřejmě její kvalifikovaný odhad či odhad jejích podílů.

1 Nejistota měření – pojem, zdroje, odhad a význam

1. 1 Definice a její vysvětlení

Nejistota je parametr (přidružený k výsledku měření) charakterizující rozptýlení hodnot, jež jsou, na základě dostupných informací, přiřazovány/přisuzovány měřené veličině.

Nejistota vymezuje hranice, v nichž je výsledek s danou (určitou) pravděpodobností považován za správný, tj. přesný a pravdivý. Nejistota obecně zahr-

nuje mnoho složek. Některé z nich mohou být získány ze statistických distribucí výsledků sérií měření ovlivňujících veličin charakterizovaných výběrovou směrodatnou odchylkou. Další složky se odhadují z dat založených na zkušenostech nebo z jiných informací (volně podle VIM [9]).

Z hlediska validace metody/postupu měření lze nejistotu ztotožnit s intervalem, který charakterizuje, zda byly splněny požadavky plynoucí z daného účelu měření – fit for purpose.

Z hlediska klinické efektivity by měla nejistota měření odrážet požadavky kladené na zkoušku–vyšetření tak, aby byla schopna zajistit spolehlivé diagnostické rozhodování a účinné sledování terapie.

1. 2 Nejistota v procesu akreditace

Každý výsledek měření je doprovázen vlastní nejistotou měření (ISO 15189 [12], ISO 17025 [11]).

Tam, kde je to vhodné a možné, musí laboratoř vyhodnotit nejistoty měření (ISO 15189, odstavec 5. 6. 2 [12]).

Norma ISO 15189 obsahuje požadavky pro akreditaci rutinních klinických laboratořích. Z obsahu normy plyne:

- Odhad nejistot musí být v laboratoři, ucházející se o akreditaci, proveden a dokumentován jeho výsledky (tam kde je to možné).
- Způsob provedení odhadu nejistoty není specifikován.
- Postup, který laboratoř pro odhad nejistoty u konkrétního analytu zvolí, je součástí postupu výpočtu výsledku měření a musí být jako takový dokumentován (odstavec 5. 5. 3).

Na rozdíl od certifikátů referenčních materiálů nejsou hodnoty nejistot měření ve výsledkových protokolech uváděny (odstavec 5. 8), avšak laboratoř by měla být schopna na vyžádání podat informace o nejistotě měření.

1. 3 Nejistota jako integrální součást procesu měření

Obecnou, stručnou a výstižnou charakterizaci procesu měření lze popsat následovně (podle [3]):

K dosažení výsledků měření o požadované kvalitě a srovnatelnosti je nezbytné:

- Specifikovat měřenou veličinu, pracovní rozsah měření a požadovanou nejistotu.
- Vybrat vhodnou metodu (postup-výpočet-podmínky měření).

- Validovat vybranou metodu, tj. prokázat vhodnost pro daný účel a dále prokázat, že výpočty a podmínky měření zahrnují vše, co může významně ovlivnit výsledek.
 - Vybrat referenční materiál (s návazností na referenci).
 - Odhadnout nejistotu měření jako míru toho, že bylo dosaženo požadované výpovědní hodnoty výsledku.
- Nejistota měření je parametrem, který významně specifikuje charakter měřicí metody již při jejím výběru a je součástí samotného výsledku měření.

1. 4 Nejistota a Směrnice IVD 98/79 EC

Do českého právního řádu je Směrnice 98/79 EC [5] implementována ve formě vládního nařízení č. 453/2004 Sb. Součástí tohoto nařízení (odstavec 1. 1. 11. 2), stejně jako součástí normy ISO 18112-1 [6], jsou seznamy dat, která musí výrobce IVD poskytnout jeho uživatelům. Nejistota hodnot pracovních kalibrátorů tam není explicitně nikde zmíněna, implicitně je však obsažena v požadavku, že pracovní kalibrátory výrobků IVD musí vykazovat návaznost na referenci vyššího řádu (odstavec 1. 1. 11. 2 u NV 453 a odstavec 7. 6 u ISO 18112-1). Podle normy ISO 17511 (odstavec 4. 41) [2] musí však mít kalibrátor přiřazenou hodnotu koncentrace/obsahu analytu i s nejistotou měření. Norma ISO 17511 je pro realizaci Směrnice 98/79 EC naprosto zásadní, takže nejistotu kalibrátoru musí výrobce dávat koncovému uživateli (tj. klinické laboratoři) k dispozici, ačkoliv to ani NV 453, ani ISO 18112-1 výslovně neuvádějí.

1. 5 Způsoby vyhodnocování nejistot

Způsobem (postupem) typu A jsou nejistoty vyhodnocovány na podkladě vlastních měření s použitím statistických metod.

Způsobem (postupem) typu B jsou nejistoty odhadovány z údajů převzatých z dokumentace výrobců, odborné literatury, certifikátů referenčních materiálů, ale také mohou být formulovány zkušenostmi.

Oba postupy poskytnou odhady dílčích nejistot, které se potom slučují podle statistického zákona o slučování nejistot (propagace nejistot).

Výčet dílčích nejistot a možné způsoby jejich zpracování jsou popsány velmi dobře na základní úrovni (např. ISO-GUM 1995 [8], EURACHEM/CITAC 2000 [15], ISO 21748 [14] a dlouhá řada dalších pramenů). Problémem může být jejich poměrně obecný charakter, velmi malá orientace na problémy laboratorní medicíny i nejednotnost jejich aplikace v praxi. V klinických laboratořích je vhodné důsledně využívat i následující zdroje dat:

- experimentální data získávaná v rámci pravidelné a běžné laboratorní činnosti (vnitřní kontrola kvality, externí posuzování kvality, validace a verifikace, analýz kontrolních/referenčních materiálů, údajů z pravidelného provádění kalibrací);
- nejistoty, poskytované výrobcí, referenčními a kalibračními laboratořemi (údaje z certifikátů a pracovní dokumentace s tím, že tyto údaje budou od výrobců důsledně vyžadovány).

1. 6 Standardní, kombinovaná a rozšířená nejistota

Standardní nejistota

Její číselná hodnota je vyjádřena jako směrodatná odchylka (SD).

Kombinovaná nejistota – pravidlo šíření (propagace) nejistot

Podle tohoto pravidla provádíme výpočet kombinované standardní nejistoty:

$$u_c^2 = u_1^2 + u_2^2 + \dots + u_n^2$$

kde u_1 až u_n jsou odhady dílčích standardních nejistot měření.

Rozšířená kombinovaná nejistota U_c

Rozšíření se provádí s použitím jednoduchého vztahu:

$$U_c = k \cdot u_c$$

Obvykle se používá hodnota $k = 2$ (odpovídá přibližně 95% intervalu spolehlivosti pro normální rozdělení).

1. 7 Dílčí nejistoty v klinických laboratořích

Dlouhodobá přesnost (reprodukovatelnost, intermediate precision)

Základem odhadu nejistoty měření v klinické laboratoři je dlouhodobá přesnost (reprodukovatelnost) měření. Zdrojem dat jsou výsledky vnitřní kontroly kvality.

Pokud laboratoř vede v rámci vnitřní kontroly regulační diagramy, lze získávat údaje o dlouhodobé přesnosti (reprodukovatelnosti) z výsledků tohoto sledování průběžně.

Časový interval pochopitelně nelze pro všechny laboratoře a všechny metody stanovit jednotně. Krajiní akceptovatelnou mezí je četnost 1krát ročně, avšak 15 nezávislých měření jako naprosté minimum. Právě aktualizace hodnoty nejistoty měření může být chápána jako rozhodující krok periodické verifikace.

Mírou dlouhodobé přesnosti (reprodukovatelnosti) je relativní směrodatná odchylka (CV, %).

Systematická odchylka (vychýlení, bias) a výtěžnost

Vychýlení metody (měřicího postupu) se stanovuje experimentálně a je to rozdíl mezi průměrem výsledků měření a správnou (referenční) hodnotou. Předmětem měření je vhodný referenční materiál, který musí být vždy doprovázen údajem o referenční hodnotě a její nejistotě. Průměr měření se zásadně stanovuje za podmínek opakovatelnosti měření (v sérii). Pro potřeby klinické laboratoře je možné akceptovat v případě nedostupnosti certifikovaných referenčních materiálů kontrolní materiály s výrobcem prokázanou návazností na vyšší metrologický standard a s určeným odhadem nejistoty této hodnoty.

Přijatelná velikost série sestává z minimálně deseti měřených vzorků ($n = 10$). Pro výpočty celkové nejistoty je často výhodné vyjadřovat systematickou složku nejistoty, namísto hodnoty vychýlení hodnotou výtěžnosti. Jde jen o různý způsob vyjádření stejného parametru se stejně platnými číselnými hodnotami. Zatímco vychýlení je rozdíl mezi průměrem a referenční hodnotou, výtěžnost je poměrem stejných čísel.

Nejistota vychýlení a výtěžnosti

Obě hodnoty, ze kterých se počítá vychýlení metody nebo výtěžnost, mají svou nejistotu. První je nejistota referenční hodnoty uvedená v certifikátu. Druhá je nejistota hodnoty průměru, daná opakovatelností měření a jejich počtem (SD/\sqrt{n}). Z těchto nejistot lze pomocí zákona o propagaci nejistot vypočítat nejistotu hodnoty vychýlení metody, popř. výtěžnosti.

Nejistoty hodnot kalibrátorů

Nejistota kalibrátorů bývá udávána nejčastěji formou rozšířené nejistoty U_{cal} s faktorem rozšíření $k = 2$. V různých publikacích lze nalézt různé způsoby zahrnutí nejistoty kalibrátoru do rozpočtu nejistot v závislosti na použitém modelu měření. V tomto doporučení předpokládáme, že nejistota kalibrátoru je v rámci analytického procesu implicitně zahrnuta do výpočtu jakékoli hodnoty obsahu/množství/koncentrace, tedy i do vychýlení (bias). Nejistota kalibrátoru proto není zahrnuta jako samostatná složka do rozpočtu nejistot.

Nejistoty certifikovaných referenčních materiálů

Tyto nejistoty jsou povinnou součástí certifikátů referenčních materiálů. Jsou většinou uváděny formou rozšířené kombinované nejistoty U_{ref} .

2 Odhad kombinované nejistoty výsledku na základě vlastních experimentů

Tento postup vychází z předpokladu, že systematická odchylka měřicí metody i dlouhodobá vnitrolaboratorní přesnost (reprodukovatelnost) získaná z VKK (vnitřní kontrola kvality) jsou konstantní v prověřovaném rozmezí hodnot obsahu, množství či koncentrace. Vzhledem k tomu, že rozsah měření v klinických oborech obvykle není extrémně široký, můžeme z konstantnosti nejistot vycházet. Pokud tomu tak není, je třeba zjistit obsahovou/koncentrační závislost obou hlavních složek nejistoty, tj. systematické odchylky a dlouhodobé vnitrolaboratorní přesnosti (reprodukovatelnosti).

Poznámka: Doporučuje se určit odhad nejistot na dvou a více hodnotách obsahu nejlépe v mezích referenčního intervalu a nad jeho horní nebo pod jeho dolní mezí (podle významnosti).

Doporučuje se, použít různých matričně vhodných kontrolních materiálů. Další informace naleznete např. v [7].

2.1 Vztah mezi výtěžností a systematickou odchylkou (měřicí metody)

Výtěžnost (recovery) je definována rovnicí:

$$R = \frac{C_{meas}}{C_{ref}} \quad (1)$$

Systematická odchylka (vychýlení, bias) – v případě, že se jedná o průměr výsledků měření – je definována rovnicí:

$$B = C_{meas} - C_{ref} \quad (2)$$

Relativní hodnota téže veličiny:

$$B_r = \frac{C_{meas} - C_{ref}}{C_{ref}} \quad (3)$$

Z rovnic (1) a (3) můžeme odvodit vztah:

$$B_r = R - 1 \quad (4)$$

nebo při vyjádření v procentech:

$$B_r = R - 100 \quad [\%] \quad (5)$$

Z rovnice (4), respektive (5), plyne přímo vztah pro rovnost standardních nejistot relativní systematické odchylky a výtěžnosti:

$$u_{B_r} = u_R \quad (6)$$

Varování!

Rovnost (6) neplatí pro hodnoty relativní standardní nejistoty u_r obou veličin vyjádřené v procentech.

2.2 Odhad podílu kombinované nejistoty měření odvozeného ze stanovení systematické odchylky (vychýlení, bias) vlastními experimenty

Můžeme postupovat dvěma způsoby:

- Máme k dispozici referenční materiál s certifikovanou hodnotou koncentrace (obsahu, množství) a odhadem její nejistoty. Podmínkou je prokázání návaznosti certifikované hodnoty podle normy ISO 17511 [2]. Referenční materiály musí být tedy pořízeny od výrobců schopných tuto návaznost prokázat (např. NIST, IRMM, LGC, BAM, NIBSC aj.). Za výběr referenčního materiálu je plně odpovědná laboratoř, podrobně viz citaci [3].
- Metoda přídatku se standardem. Pro stanovení použijeme kalibrátor, kterým obohacujeme (spikujeme) vzorek příslušné matrice (např. moč, plná krev atd.). Vzorek může obsahovat malé množství nativní substance, jejíž hodnotu obsahu, množství či koncentraci nemusíme znát.

Pozor! Bod b) v sobě nese složitou oblast obohacování (spikování) koloidní suspenze, jakou je plná krev. Je zde potřeba dodržovat zásady koloidní chemie. V případě plné krve se nejedná o pravý roztok.

Výpočet ad a)

Danou metodou změříme signál (např. absorbanci, plochu píku, čas atd.) odpovídající zvolenému referenčnímu materiálu a z jeho hodnoty odvodíme odečtem z kalibrační závislosti koncentraci nebo hodnotu obsahu sledovaného analytu, substance či parametru (x_i). Měření opakujeme alespoň n krát ($n = 10$) za podmínek opakovatelnosti (krátký časový interval, stejný operátor, stejný přístroj). Ze získaných n hodnot měření vypočteme aritmetický průměr x_p , výběrovou směrodatnou odchylku SD a určíme standardní nejistotu průměru (někdy se též nazývá směrodatnou chybou odhadu průměru) jako:

$$x_p = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i \quad (7)$$

$$SD = \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - x_p)^2} \quad (8)$$

$$u_{x_p} = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (9)$$

popř. relativní standardní nejistotu průměru $u_{r, xp}$ v procentech:

$$u_{r, xp} = \frac{u_{x_p}}{x_p} \cdot 100 \quad [\%] \quad (10)$$

Výtěžnost R (%) se vypočte dle vztahu:

$$R = \frac{x_p}{c_{ref}} \cdot 100 \quad [\%] \quad (11)$$

a relativní systematická odchylka (vychýlení, bias) B_r (%)

$$B_r = R - 100 \quad [\%] \quad (12)$$

Relativní nejistotu obsahu/koncentrace referenčního materiálu $u_{r, ref}$ (%):

$$u_{r, ref} = \frac{u_{ref}}{c_{ref}} \cdot 100 \quad [\%] \quad (13)$$

Odhad dílčí kombinované relativní nejistoty vychýlení v % odpovídající kombinaci vlivu systematické odchylky, vlivu nejistoty obsahu/koncentrace referenčního materiálu a vlivu nejistoty průměru změřených hodnot je dán vztahem:

$$u_{r, B_r} = \sqrt{B_r^2 + u_{r, ref}^2 + u_{r, x_p}^2} \quad [\%] \quad (14)$$

Příklad

Mějme tyto údaje:

$x_p = 2,565$ a. u.; $SD = 0,019$ a. u.; $n = 10$: odtud podle (9) a (10) $u_{x_p} = 0,006$ a. u. a $u_{r, xp} = 0,23$ %

$c_{ref} = 2,50$ a. u.;

$u_{ref} = 0,1$ a. u.: odtud podle (13) $u_{r, ref} = 4,0$ %

Podle (11) a (12) vypočteme $B_r = 2,6$ % a nakonec podle (14) vypočteme odhad dílčí kombinované nejistoty:

$$u_{r, B_r} = \sqrt{2,6^2 + 4^2 + 0,23^2} = 4,8 \quad \%$$

Někteří autoři dávají přednost tomu, že předpokládají, že systematická odchylka (vychýlení, bias) má rovnoměrné rozdělení a dosazují do vztahu pro výpočet odhadu kombinované nejistoty hodnotu $\frac{B_r}{\sqrt{3}}$.

Pro náš příklad má pak odhad nejistoty u_{r, B_r} hodnotu:

$$u_{r, B_r} = \sqrt{\frac{2,6^2}{3} + 4^2 + 0,23^2} = 4,3 \quad \%$$

Nejvýznamnější složkou odhadu nejistoty systematické odchylky (vychýlení, bias) je v tomto případě nejistota referenčního materiálu (> 80%).

Výpočet ad b)

Za předpokladu využití metody přidavku se standardem danou metodou změříme odezvu vzorku (absorbance, plocha píku, čas atd.) s nativním obsahem sledované substance (může být i tzv. blank matrice, u které předpokládáme, že koncentrace, obsah sledovaného analytu se blíží k nule) a z kalibrační závislosti nebo pomocí zvolené kalibrační metodiky (např. metoda vnitřního standardu) pak odečteme odpovídající koncentraci c_{vz} a koncentraci vzorku obohaceného stejným množstvím čisté substance $c_{vz+spike}$. Koncentraci čisté substance (obohacení, spike) c_{spike} známe.

Výtěžnost R (%) se vypočte podle vztahu:

$$R = \frac{c_{vz+spike} - c_{vz}}{c_{spike}} \cdot 100 \quad [\%] \quad (15)$$

Za předpokladu lineární závislosti můžeme výtěžnost vypočítat z hodnot signálů (S):

$$R = \frac{S_{vz+spike} - S_{vz}}{S_{spike}} \cdot 100 \quad [\%] \quad (16)$$

Dále postupujeme ve výpočtu stejně jako v předchozím případě včetně opakovaného měření pro výpočet odhadu nejistoty průměru (minimálně 10 měření za podmínek opakovatelnosti). Odhad nejistoty obsahu, množství či koncentrace spikující čisté substance, ze které se připraví spikovaný vzorek, musíme určit z nejistoty, kterou udává výrobce či dodavatel čisté substance (např. pro kalibrátor). Při tomto způsobu určení výtěžnosti a její nejistoty je nutno také zvážit odlišnost některých matic (krev) a upravit experimentální postup kvalifikovaným způsobem.

2. 3 Odhad podílu kombinované nejistoty měření odvozeného ze stanovení vnitrolaboratorní dlouhodobé přesnosti (reprodukovatelnosti) vlastními experimenty

Tento postup je v souladu s normou ISO 5725-3 [4]. (Doporučujeme použití originální anglické verze, protože český překlad používá nevhodnou terminologii!)

Postup vychází z validačních údajů laboratoře o dané metodě (měřicím postupu). Vnitrolaboratorní dlouhodobá přesnost (reprodukovatelnost) zahrnuje i randomizovanou systematickou odchylku laboratoře, nikoli randomizovanou systematickou odchylku metody nebo postupu (vychýlení, bias metody).

Experimentální plán a výpočet

Experimentální plán spočívá ve změření signálu a následném výpočtu hodnot obsahu, koncentrace (pomocí různých kalibračních metodik) pro minimálně 15 časově odlišených měření. Používáme k tomu jeden komutabilní maticový vzorek (*komutabilita = maticí příměření*), který musí být stabilní v průběhu časově odlišených měření. Nemusíme znát obsah (koncentraci) daného analytu, parametru, substance, neboť odhadujeme pouze proměnlivost/variabilitu měření.

Příklad časově odlišených měření (např. každý den jedno měření) je ukázán v tabulce 1.

Tabulka 1. Časově odlišená měření

Měření	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Hodnota	2,51	2,56	2,54	2,51	2,49	2,48	2,5	2,56	2,54	2,53	2,52	2,57	2,55	2,51	2,49

Tabulka 2. Časově odlišené hodnoty koncentrací

Měření	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Hodnota 1	2,51	2,56	2,54	2,51	2,49	2,48	2,50	2,56	2,54	2,53	2,52	2,57	2,55	2,51	2,49
Hodnota 2	2,53	2,51	2,53	2,52	2,50	2,53	2,54	2,57	2,50	2,51	2,54	2,59	2,51	2,51	2,52

Tabulka 3. ANOVA (analysis of variance)

Zdroj variability	SS	Stupně volnosti	MS	F	Hodnota P	F _{krit}
Mezi výběry	0,013987	14	0,000999	2,36	0,055	2,42
Všechny výběry	0,00635	15	0,000423			
Celkem	0,020337	29				

*V Excelu se zobrazí „Rozdíli“, což je nevhodný termín (nesprávný překlad při lokalizaci).

MSB = parametr výpočtu ANOVA (Mean of Squares Between groups) = mezi výběry

MSW = parametr výpočtu ANOVA (Mean of Squares Within groups) = všechny výběry

Vypočteme průměr x_p : podle vztahu (7); směrodatnou odchylku SD_{repro} : podle vztahu (8) a variační koeficient CV_{repro} (%):

$$CV_{repro} = \frac{SD_{repro}}{x_p} \quad [\%] \quad (17),$$

kde: $x_p = 2,524$, $SD_{repro} = 0,0285$, $CV_{repro} = 1,13\%$

Pokud měříme duplikátně, musíme pro vyhodnocení použít metodu analýzy rozptylu! Experimentální plán a vyhodnocení (např. pomocí Excelu) jsou patrné z následujícího postupu. Opět musíme získat 15 časově odlišených hodnot koncentrací (obsahu) jednoho stabilního vzorku, tentokrát v duplicitním modu (tab. 2).

Použitím analýzy dat v Excelu (Anova: jeden faktor) dostáváme hodnoty uvedené v tabulce 3.

$$SD_{repro} = \sqrt{MSW + \left(\frac{MSB - MSW}{2}\right)} =$$

$$= \sqrt{0,000423 + \left(\frac{0,000999 - 0,000423}{2}\right)} = 0,027$$

$$x_p = 2,526$$

$$CV_{repro} = 1,07 \%$$

Při použití kteréhokoli z výše uvedených postupů získáváme:

$$u_{repro} = SD_{repro}$$

a

$$u_{r, repro} = CV_{repro}$$

2. 4 Zobecnění postupu – odhad kombinované nejistoty

Zobecníme-li výše uvedený postup, pak odhad relativní kombinované nejistoty výsledku měření (%) bude vyjádřen pomocí zákona o propagaci nejistot a za použití odhadů jednotlivých složek (podle kapitol 2. 2 a 2. 3) takto:

$$u_{r, tot} = \sqrt{u_{r, repro}^2 + u_{r, B_r}^2} = \sqrt{u_{r, repro}^2 + B_r^2 + u_{r, ref}^2 + u_{r, x_p}^2} \quad [\%] \quad (18)$$

Není-li k dispozici referenční materiál (nebo alespoň materiál s prokázanou návazností hodnoty obsahu na vyšší metrologický standard a s udanou nejistotou této hodnoty), není možné určit odhad podílu nejistoty plynoucí ze systematické odchylky (vychýlení, bias). Pak je třeba vycházet z neověřeného předpokladu, že systematická odchylka (vychýlení, bias) je rovna nule. V takovém případě máme k dispozici pouze údaje o vlastní dlouhodobé přesnosti (reprodukovatelnosti) – viz kapitola 2. 3. Výsledný vzorec pro odhad relativní kombinované nejistoty má potom tvar:

$$u_{r, tot} = \sqrt{u_{r, repro}^2} = u_{r, repro} \quad [\%] \quad (19)$$

Vzhledem k neověřenému předpokladu nulového systematické odchylky (vychýlení, bias) (viz výše) bude tento odhad kombinované nejistoty v řadě případů pravděpodobně podhodnocený. Typickými oblastmi použití této „zjednodušené“, avšak v řadě případů zřejmě jediné možné, varianty výpočtu jsou tumorové markery, některé hormony, hematologické parametry, hemokoagulace aj.

Rozšířená kombinovaná nejistota $U_{r, tot}$ se vypočte podle obvyklého vztahu s použitím koeficientu rozšíření k (koeficient rozšíření se obvykle volí $k = 2$ pro normální rozdělení, oboustranný test, $\alpha = 5 \%$):

$$U_{r, tot} = k \cdot u_{r, tot} \quad [\%] \quad (20)$$

Tabulka 4. Základní charakteristiky

Opakovatelnost	Přesnost za podmínek opakovatelnosti [1]	Within laboratory repeatability nebo Within assay variability nebo Intra assay variability
Reprodukovatelnost	Přesnost za podmínek reprodukovatelnosti [1]	Within laboratory reproducibility nebo Between assay variability nebo Uniformity
Pravdivost	Těsnost souhlasu mezi průměrnou hodnotou získanou z velkého počtu výsledků měření a [1]	Trueness
Výtěžnost	Podíl z množství analytu, přítomného v analyzovaném vzorku zkoušeného materiálu nebo přidaného k němu, který je extrahován a podrobován měření [1]	Recovery

3 Odhad kombinované nejistoty na základě údajů výrobců

V tomto textu máme na mysli výrobce testovacích souprav a analytických měřicích systémů, přičemž předpokládáme, že souprava či analytický systém vyhovuje direktivě IVD MD [5] a normě ISO 18112–1 [6].

Výrobci testovacích souprav a analytických měřicích systémů pro laboratorní medicínu jsou povinni uvádět některé výkonové charakteristiky testovacích souprav a analytických systémů, ze kterých může být odhadnuta nejistota výsledku měření.

Ze základních charakteristik to mohou být zejména opakovatelnost a dlouhodobá přesnost (reprodukovatelnost) – viz tabulka 4.

Ve značení výrobců často není jednotnost a je třeba z kontextu návodu a ze zkušenosti zjistit, o jaký druh odhadu nejistoty se jedná. V každém případě můžeme pro výpočet odhadu kombinované nejistoty použít pouze ty údaje, které návod (technická/pracovní dokumentace výrobce) obsahuje. Pokud nějaké chybí a je v silách laboratoře provést dodatečné validační experimenty, potom použijeme vlastní výsledky pro zpracování rozpočtu (bilanci) odhadu podílů nejistot.

V testovacích soupravách a analytických měřicích systémech jsou rovněž uvedeny hodnoty kalibrátorů (odhady jejich nejistot), jejich odezvy při použití v dané metodě a kontrolní vzorky s deklarovanou odezvou nebo interpretací. Do odhadu nejistoty výsledku měření musí být zahrnuty i odhady nejistot kalibrace.

Příklad

Semiquantitative detection of specific IgM antibodies to *Mycoplasma pneumoniae*
Manual Savyon® Diagnostic Ltd.

u_r (intra assay) – certifikát: 3,40 %

u_i (uniformity) – certifikát: 3,85 %

Podle návodu byla metoda kalibrována, odhadnutá relativní nejistota pomocí „bracketing“ kalibrace byla 2,55 %.

Odhad kombinované relativní nejistoty je pro tento případ dán vztahem:

$$u_{r, \text{tot}} = \sqrt{3,4^2 + 3,85^2 + 2,55^2} = 5,7 \%$$

Použité zkratky:

- a. u. – absorbanční jednotka
 - B – systematická odchylka (vychýlení, bias)
 - B_r – relativní systematická odchylka (vychýlení, bias)
 - c_{cal} – je udaná hodnota množství, obsahu nebo koncentrace sledovaného analytu, parametru, substance v kalibrátoru
 - c_{meas} – změřená hodnota množství, obsahu nebo koncentrace sledovaného analytu, parametru, substance
 - c_{ref} – je referenční hodnota množství, obsahu nebo koncentrace sledovaného analytu, parametru, substance
 - CV – variační koeficient
 - F – statistika F (Anova)
 - k – koeficient rozšíření
 - MS – podíl SS/stupně volnosti (Anova)
 - n – počet
 - P – hodnota P udává nejmenší hladinu, na níž by šlo příslušný test zamítnout (Anova)
 - R – výtěžnost (recovery)
 - S – hodnota signálu
 - SD – směrodatná odchylka (výběrová)
 - SD_{repro} – směrodatná odchylka získaná z dlouhodobé přesnosti (reprodukovatelnosti) (výběrová)
 - SS – součet čtverců (sum of squares) (Anova)
 - u_{cal} – nejistota kalibrátoru
 - $u_{r, x}$ – relativní nejistota veličiny x [%]
 - $U_{r, x}$ – rozšířená relativní nejistota veličiny x [%]
 - u_{ref} – nejistota referenčního materiálu
 - u_x – nejistota veličiny x
 - U_x – rozšířená nejistota veličiny x
 - u_{xp} – standardní nejistota průměru x_p (směrodatná chyba odhadu průměru)
 - x_i – naměřená hodnota obsahu/koncentrace
 - x_p – průměrná hodnota
- Další zkratky uvedené v textu jsou podrobně popsány v literatuře [1].

Literatura

1. **Plzák, Z., Koruna, I., Friedecký, B., Kratochvíla, J.** *Metrologická terminologie v analytické laboratoři*. In Budina, M. (Ed.), CD ROM publikace. Vydal SEKK ve spolupráci s Eurachem-ČR v roce 2003 (dostupné na webové adrese <http://www.sekk.cz>).
2. *ISO 17 511:2003*. Measurement of quantities in samples of biological origin – Metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials (ISO Geneve 2003).
3. *Návaznost chemických měření. Používání referenčních materiálů v chemické analýze*. Kvalimetrie 14. M. Suchánek (Ed.), EURACHEM-ČR, Praha 2004.
4. *ISO 5725-3:2001*. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method (ISO Geneve 1994).
5. 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.
6. *ISO/CD TR 18112-1:2004*. In vitro diagnostic medical devices – Information supplied by the manufacturer (ISO Geneve 2004).
7. **Stöckl, D., Van Uytanghe, K., Cabaleiro, D. R., Thienpont, L. M.** Calculation of Measurement Uncertainty in Clinical Chemistry. *Clin. Chem.*, 2005, 51, 1, p. 276–277.
8. Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM). ISO Geneva, 1993 (1995), International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology (VIM) 3th Edition, FDIS April 2004.
9. *ISO 15 195:2003*. Clinical Laboratory Medicine – Requirement for Reference Measurement Laboratories (ISO Geneve 2003).
10. *ČSN EN ISO/IEC 17025:2000*. Všeobecné požadavky na způsobilost zkušebních a kalibračních laboratoří (ČSN Praha 2000).
11. *ČSN EN ISO 15189:2004*. Zdravotnické laboratoře – Zvláštní požadavky na jakost a způsobilost (ČSN Praha 2004).
12. *ISO 18 153:2002*. Measurement of quantities in samples of biological origin – Metrological traceability of assigned value for catalytic concentration of enzymes in calibrators and control materials (ISO Geneve 2002).
13. *ISO/TS 21748:2004*. Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty estimation (ISO Geneve 2004).
14. *Eurachem/CITAC Guide*. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. Second Edition 2000. Přeloženo jako Stanovení nejistoty analytického měření. Kvalimetrie 11. M. Suchánek (Ed). EURACHEM-ČR, Praha 2001.
15. **White, G. H., Farrance, I. et al.** Uncertainty of Measurement in Quantitative Medical Testing. AACB November 2004.

Příloha: Praktické příklady odhadů nejistot

Příklad 1: Stanovení koncentrace glukózy v krevním séru

1. 1 Odhad podílu dílčích nejistot

1. 1. 1 Dlouhodobá přesnost (reprodukovatelnost, intermediate precision, $u_{r, repro}$)

Byla stanovena vyhodnocením výsledků vnitřní kontroly kvality za rok 2004.

Kontrolní materiál 1: průměr $x_p = 5,4 \text{ mmol.l}^{-1}$ $CV_{repro} = 2,3 \%$

Kontrolní materiál 2: průměr $x_p = 13,4 \text{ mmol.l}^{-1}$ $CV_{repro} = 1,7 \%$

V dalším výpočtu bude použita průměrná hodnota $u_{r, repro}$:

$$u_{r, repro} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n CV_{repro, i}^2}{n}} = \sqrt{\frac{2,3^2 + 1,7^2}{2}} = 2 \%$$

1. 1. 2 Nejistoty hodnot certifikovaných referenčních materiálů

Hodnota systematické odchylky (vychýlení, bias) byla stanovena analýzou certifikovaného referenčního materiálu CRM DGKL 02702 výrobce Referenzinstitut für Bioanalytik DGKL (Bonn, DE), který byl použit v programech EQA v Německu a Česku (v Česku byl dostupný jako validovaný kontrolní materiál SEKK 1362).

V certifikátu tohoto materiálu je uveden vedle certifikované hodnoty koncentrace glukózy ($c_{ref} = 8,75 \text{ mmol.l}^{-1}$) i odhad rozšířené kombinované nejistoty $U_{r, ref} = 0,6 \%$ pro koeficient rozšíření $k = 2$.

To představuje kombinovanou nejistotu

$$u_{r, ref} = U_{r, ref} / 2 = 0,3 \%$$

1. 1. 3 Systematická odchylka (vychýlení, bias)

Výsledky měření referenčního materiálu za podmínek opakovatelnosti:

Počet měření: $n = 10$

Průměr měření: $x_p = 8,79 \text{ mmol.l}^{-1}$

Referenční certifikovaná hodnota: $c_{ref} = 8,75 \text{ mmol.l}^{-1}$

Pak se výtěžnost R a vychýlení B_r vypočte podle vztahů (11) a (12):

$$R = \frac{x_p}{c_{ref}} \cdot 100 = \frac{8,79}{8,75} \cdot 100 = 100,5 \%$$

$$B_r = R - 100 = 100,5 - 100 = 0,5 \%$$

1. 1. 4 Nejistota systematické odchylky (vychýlení, bias)

Výběrová směrodatná odchylka a standardní nejistota průměru se vypočte:

$$SD = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - x_p)^2} = 0,114 \text{ mmol.l}^{-1}$$

$$u_{x_p} = \frac{SD}{\sqrt{n}} = 0,036 \text{ mmol.l}^{-1}$$

$$u_{r, x_p} = \frac{u_{x_p}}{x_p} \cdot 100 = \frac{0,036}{8,79} \cdot 100 = 0,41 \%$$

1. 2 Kombinace odhadů dílčích nejistot do relativní kombinované a rozšířené nejistoty ($u_{r, tot}$ a $U_{r, tot}$)

Kombinací dílčích nejistot podle vztahu (18) dostáváme:

$$u_{r, tot} = \sqrt{u_{r, repro}^2 + B_r^2 + u_{r, ref}^2 + u_{r, x_p}^2} = \\ = 2^2 + 0,5^2 + 0,3^2 + 0,41^2 = 2,1 \%$$

$$U_{r, tot} = 2 \cdot u_{r, tot} = 4,2 \%$$

Pro koeficient rozšíření ($k = 2$) je tedy kombinovaná rozšířená nejistota stanovení glukózy v krevním séru:

$$U_{r, tot} = 4,2 \%$$

Příklad 2: Stanovení katalytické koncentrace enzymu AST (aspartátaminotransferázy) v krevním séru

2. 1 Odhad podílu dílčích nejistot

2. 1. 1 Dlouhodobá přesnost (reprodukovatelnost, intermediate precision $u_{r, repro}$)

Byla stanovena vyhodnocením výsledků vnitřní kontroly kvality za rok 2004.

Kontrolní materiál 1:

průměr $x_p = 2,1 \mu\text{kat} \cdot \text{l}^{-1}$ $CV_{repro} = 2,7 \%$

Kontrolní materiál 2:

průměr $x_p = 3,4 \mu\text{kat} \cdot \text{l}^{-1}$ $CV_{repro} = 3,1 \%$

V dalším výpočtu bude použita průměrná hodnota $u_{r, repro}$:

$$u_{r, repro} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n CV_{repro, i}^2}{n}} = \sqrt{\frac{2,7^2 + 3,1^2}{2}} = 2,9 \%$$

2. 1. 2 Nejistoty hodnot certifikovaných referenčních materiálů

Hodnota systematické odchylky (vychýlení, bias) byla stanovována analýzou certifikovaného referenčního materiálu CRM DGKL 02702 výrobce Referenzinstitut für Bioanalytik DGKL (Bonn, DE), který byl použit v programech EQA v Německu a Česku (v Česku byl dostupný jako validovaný kontrolní materiál SEKK 1362).

V certifikátu tohoto materiálu je uveden odhad hodnoty katalytické koncentrace AST ($c_{ref} = 2,54 \mu\text{kat} \cdot \text{l}^{-1}$) a jeho rozšířené kombinované nejistoty $U_{r, ref} = 4,2 \%$ pro koeficient rozšíření $k = 2$.

To představuje standardní nejistotu

$$u_{r, ref} = U_{r, ref} / 2 = 2,1 \%$$

2. 1. 3 Systematická odchylka (vychýlení, bias)

Výsledky měření katalytické koncentrace AST v referenčním materiálu za podmínek opakovatelnosti:

Počet měření: $n = 10$

Průměr měření: $x_p = 2,38 \mu\text{kat} \cdot \text{l}^{-1}$

Referenční certifikovaná hodnota: $c_{ref} = 2,54 \mu\text{kat} \cdot \text{l}^{-1}$

Pak se výtěžnost R a vychýlení B_r vypočte podle vztahů (11) a (12):

$$R = \frac{x_p}{c_{ref}} \cdot 100 = \frac{2,38}{2,54} \cdot 100 = 93,7 \%$$

$$B_r = R - 100 = 93,7 - 100 = -6,3 \%$$

2. 1. 4 Nejistota systematické odchylky (vychýlení, bias)

Výběrová směrodatná odchylka a standardní nejistota průměru se vypočte:

$$SD = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - x_p)^2} = 0,023 \mu\text{kat.l}^{-1}$$

$$u_{x_p} = \frac{SD}{\sqrt{n}} = 0,007 \mu\text{kat.l}^{-1}$$

$$u_{r, x_p} = \frac{u_{x_p}}{x_p} \cdot 100 = \frac{0,007}{2,38} \cdot 100 = 0,29 \%$$

2. 2 Kombinace odhadů dílčích nejistot do relativní kombinované a rozšířené nejistoty ($u_{r, tot}$ a $U_{r, tot}$)

Kombinací dílčích nejistot podle vztahu (18) dostáváme:

$$u_{r, tot} = \sqrt{u_{r, repro}^2 + B_r^2 + u_{r, ref}^2 + u_{r, x_p}^2} = \\ = \sqrt{2,9^2 + (-6,3)^2 + 2,1^2 + 0,29^2} = 7,3 \%$$

$$U_{r, tot} = 2 \cdot u_{r, tot} = 14,6 \%$$

Pro koeficient rozšíření ($k = 2$) je tedy kombinovaná rozšířená nejistota stanovení AST v krevním séru:

$$U_{r, tot} = 14,6 \%$$

Příklad 3: Stanovení koncentrace TSH (thyreotropinu) v krevním séru

Použit analytický měřicí systém XYZ, notifikovaný podle Směrnice rady 98/79 EC a opatřený značkou „CE“.

3. 1 Odhad podílu dílčích nejistot

3. 1. 1 Dlouhodobá přesnost (reprodukovatelnost, intermediate precision $u_{r, repro}$)

Byla stanovena vyhodnocením výsledků vnitřní kontroly kvality po dobu sledování jedné výrobní šarže kontrolních materiálů:

Kontrolní materiál 1:
 průměr $x_p = 0,42 \text{ mU} \cdot \text{l}^{-1}$ $CV_{\text{repro}} = 12,5 \%$
 Kontrolní materiál 2:
 průměr $x_p = 3,30 \text{ mU} \cdot \text{l}^{-1}$ $CV_{\text{repro}} = 4,2 \%$
 Kontrolní materiál 3:
 průměr $x_p = 19,2 \text{ mU} \cdot \text{l}^{-1}$ $CV_{\text{repro}} = 5,4 \%$

Z výsledků měření kontrolních materiálů je zřejmá poměrně velká závislost přesnosti měření na koncentraci. Pro výpočet nejistoty měření v oblasti koncentrací nad $3 \text{ mU} \cdot \text{l}^{-1}$ bude v dalším výpočtu použita průměrná hodnota $u_{r, \text{repro}}$:

$$u_{r, \text{repro}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n CV_{\text{repro}, i}^2}{n}} = \sqrt{\frac{4,2^2 + 5,4^2}{2}} = 4,8 \%$$

3. 1. 2 Odhad nejistoty hodnot certifikovaných referenčních materiálů

Pro TSH existuje několik materiálů z řady WHO International Biological Standards and Reference Materials připravovaných NISBC (např.: 2nd IRP for TSH 80/558, nebo 3rd IS for TSH, 81/565). Obsah TSH v těchto materiálech je definován v mIU bez další metrologické návaznosti. Nejistota deklarovaného obsahu je tak dána pouze proměnlivostí obsahu jednotlivých ampulí obsahujících tento materiál.

Žádný z těchto materiálů nebyl v laboratoři k dispozici.

3. 1. 3 Systematická odchylka (vychýlení, bias)

S ohledem na skutečnosti uvedené v odstavci 3. 1. 2 lze k získání odhadu podílu systematické chyby použít pouze výsledky měření validovaného kontrolního materiálu, který byl použit v systému EHK. Žádný jiný kontrolní materiál stejné či vyšší metrologické třídy není dostupný (zřejmě stejnou kvalitou deklarace obsahu TSH by měl i komerční kontrolní materiál s koncentrací TSH deklarovanou pro použitý analytický systém XYZ). Tento postup lze použít i z toho důvodu, že je k dispozici dostatek nezávislých výsledků měření získaných stejným analytickým měřicím systémem ($n_{\text{XYZ}} = 156$) a výsledek stanovení TSH získaný těmito analytickými systémy XYZ $c_{\text{valid}} = 13,7 \text{ mU} \cdot \text{l}^{-1}$ se významně neliší od celkového průměru všech výsledků všech měření TSH $c_{\text{ALTM}} = 13,8 \text{ mU} \cdot \text{l}^{-1}$ získaných v EHK pomocí všech analytických systémů (celkový počet analytických měřicích systémů $n_{\text{systém}} = 10$ a celkový počet výsledků $n_{\text{výsl}} = 1089$).

Výsledky měření validovaného kontrolního materiálu provedené za podmínek opakovatelnosti:

Počet měření: $n = 10$

Průměr měření: $x_p = 14,0 \text{ mU} \cdot \text{l}^{-1}$

Validovaná hodnota: $c_{\text{valid}} = 13,7 \text{ mU} \cdot \text{l}^{-1}$

Validovaná hodnota byla získána jako průměr $ConV$ výsledků účastníků EHK, používajících analytický měřicí systém XYZ po vyloučení odlehlých hodnot (počet výsledků $n_{\text{XYZ}} = 156$).

Odhad standardní nejistoty hodnoty c_{valid} uvedený ve validačním protokolu $u_{r, \text{valid}} = 4,8 \%$.

Pak se výtěžnost R a vychýlení B_r vypočte podle vztahů (11) a (12):

$$R = \frac{x_p}{c_{\text{valid}}} \cdot 100 = \frac{14,0}{13,7} \cdot 100 = 102,2 \%$$

$$B_r = R - 100 = 102,2 - 100 = 2,2 \%$$

3. 1. 4 Nejistota systematické odchylky (vychýlení, bias)

Výběrová směrodatná odchylka a standardní nejistota průměru se vypočte:

$$SD = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - x_p)^2} = 0,23 \text{ mU} \cdot \text{l}^{-1}$$

$$u_{x_p} = \frac{SD}{\sqrt{n}} = 0,072 \text{ mU} \cdot \text{l}^{-1}$$

$$u_{r, x_p} = \frac{u_{x_p}}{x_p} \cdot 100 = \frac{0,072}{14} \cdot 100 = 0,5 \%$$

3. 2 Kombinace odhadů dílčích nejistot do relativní kombinované a rozšířené nejistoty ($u_{r, \text{tot}}$ a $U_{r, \text{tot}}$)

Vycházíme z toho, co bylo uvedeno výše: Certifikovaný ani jiný referenční materiál není k dispozici. Namísto něj byl použit validovaný kontrolní materiál EHK s udanou validovanou hodnotou c_{valid} a její relativní nejistotou $u_{r, \text{valid}}$.

Kombinací dílčích nejistot podle vztahu (18) dostáváme:

$$u_{r, \text{tot}} = \sqrt{u_{r, \text{repro}}^2 + B_r^2 + u_{r, \text{ref}}^2 + u_{r, x_p}^2} = \sqrt{4,8^2 + 2,2^2 + 4,8^2 + 0,5^2} = 7,2 \%$$

$$U_{r, \text{tot}} = 2 \cdot u_{r, \text{tot}} = 14,4 \%$$

Pro koeficient rozšíření ($k = 2$) je tedy kombinovaná rozšířená nejistota stanovení TSH v krevním séru:

$$U_{r, \text{tot}} = 14,4 \%$$

Tento odhad nejistoty však může být použit pouze pro koncentrace TSH $\geq 3,0 \text{ mU} \cdot \text{l}^{-1}$.

3. 3 Odhad nejistot měření pro koncentrace TSH pod hodnotou $3,0 \text{ mU} \cdot \text{l}^{-1}$

V tomto případě je jediným spolehlivým údajem hodnota $CV_{\text{repro}} = 12,5 \%$.

Jediným kvalifikovaným závěrem je, že odhad celkové kombinované nejistoty měření koncentrací TSH pod $3,0 \text{ mU} \cdot \text{l}^{-1}$ analytickým systémem XYZ může být odhadnut na hodnotu $U_{r, \text{tot}} \geq 2 \cdot u_{r, \text{repro}} = 25 \%$. Takto provedený odhad je i tak v daném případě a za daného stavu v souladu s normou ISO 15189.

3. 4 Závěr

Hodnota kombinované rozšířené nejistoty ($U_{r, \text{tot}} = 14,4 \%$) je jistě jen přibližným odhadem nejistoty sta-

novení TSH. Zřejmě bude podhodnocena, ale vzhledem k omezeným možnostem rutinní klinické laboratoře nelze bohužel jiný způsob výpočtu asi použít, a ani doporučit. Kvalifikovaný odhad rozšířené kombinované nejistoty stanovení TSH v klinické laboratoři na výše uvedeném analytickém systému XYZ lze provést JEN pro hodnoty koncentrace TSH > 3 mU · l⁻¹!

V případě nižších hodnot TSH je hodnota odhadu nejistoty měření výrazně vyšší, a odpovídá tak horší dlouhodobé přesnosti metody v oblasti nízkých koncentrací. V praxi je někdy vhodné uvádět několik údajů o nejistotě měření v závislosti na koncentraci.

Příklad 4: Stanovení koncentrace fibrinogenu v krevní plazmě

Optický koagulometr, výrobce XY. Použit homogenní analytický měřicí systém XY, notifikovaný podle Směrnice rady 98/79 EC a opatřený značkou „CE“.

4. 1 Odhad podílu dílčích nejistot

4. 1. 1 Dlouhodobá přesnost (reprodukovatelnost, intermediate precision $u_{r, repro}$)

Byla stanovena vyhodnocením výsledků vnitřní kontroly kvality za první pololetí roku 2005.

Kontrolní materiál 1: průměr $x_p = 1,8 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$; $CV_{repro} = 2,5 \%$
 Kontrolní materiál 2: průměr $x_p = 2,9 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$; $CV_{repro} = 2,1 \%$
 V dalším výpočtu bude použita průměrná hodnota $u_{r, repro}$:

$$u_{r, repro} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n CV_{repro, i}^2}{n}} = \sqrt{\frac{2,5^2 + 2,1^2}{2}} = 2,3 \%$$

4. 1. 2 Nejistoty hodnot certifikovaných referenčních materiálů

Hodnota vychýlení/bias byla stanovena analýzou certifikovaného referenčního materiálu CRM International standard for fibrinogen NIBSC Code 98/612; Version 04 Dated 07 May 2004.

Certifikát tohoto materiálu uvádí vedle certifikované hodnoty koncentrace fibrinogenu ($c_{ref} = 2,50 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) i odhad rozšířené kombinované nejistoty $U_{r, ref} = 8 \%$ ($u_{ref} = 0,1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) pro koeficient rozšíření $k = 2$.

To představuje standardní nejistotu

$$u_{r, ref} = U_{r, ref} / 2 = 4,0 \%$$

4. 1. 3 Systematická odchylka (vychýlení, bias)

Výsledky měření referenčního materiálu CRM NIBSC 98/612 za podmínek opakovatelnosti:

Počet měření: $n = 10$

Průměr měření: $x_p = 2,57 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$

Referenční certifikovaná hodnota: $c_{ref} = 2,50 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$

Pak se výtěžnost R a vychýlení B_r vypočte podle vztahů (11) a (12):

$$R = \frac{x_p}{c_{valid}} \cdot 100 = \frac{2,57}{2,5} \cdot 100 = 102,8 \%$$

$$B_r = R - 100 = 102,8 - 100 = 2,8 \%$$

4. 1. 4 Nejistota systematické odchylky (vychýlení, bias)

Výběrová směrodatná odchylka a standardní nejistota průměru se vypočte:

$$SD = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - x_p)^2} = 0,048 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$$

$$u_{x_p} = \frac{SD}{\sqrt{n}} = 0,015 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$$

$$u_{r, x_p} = \frac{u_{x_p}}{x_p} \cdot 100 = \frac{0,015}{2,57} \cdot 100 = 0,58 \%$$

4. 2 Kombinace odhadů dílčích nejistot do relativní kombinované a rozšířené nejistoty ($u_{r, tot}$ a $U_{r, tot}$)

Kombinací dílčích nejistot podle vztahu (18) dostáváme:

$$u_{r, tot} = \sqrt{u_{r, repro}^2 + B_r^2 + u_{r, ref}^2 + u_{r, x_p}^2} = \sqrt{2,3^2 + 2,8^2 + 4,0^2 + 0,58^2} = 5,4 \%$$

$$U_{r, tot} = 2 \cdot u_{r, tot} = 10,8 \%$$

Pro koeficient rozšíření ($k = 2$) je tedy kombinovaná rozšířená nejistota stanovení fibrinogenu v krevní plazmě:

$$U_{r, tot} = 10,8 \%$$

4. 3 Závěr

Vyšší hodnota $U_{r, tot}$ je dána jednak problémy s dlouhodobou stabilitou analytu a také složitostí určení vlastní referenční hodnoty referenční institucí NIBSC zvolenou referenční metodou.

Příklad 5: Stanovení počtu/koncentrace leukocytů (WBC) v krvi

Použit homogenní analytický měřicí systém (automatický počítač krvinek) XY, notifikovaný podle Směrnice rady 98/79 EC a opatřený značkou „CE“. Namísto dosud používaných jednotek $10^9 \cdot \text{l}^{-1}$ jsou v textu uváděny správné nl^{-1} ; číselná hodnota parametru je však stejná.

5. 1 Odhad podílu dílčích nejistot

5. 1. 1 Dlouhodobá přesnost (reprodukovatelnost, intermediate precision $u_{r, repro}$)

Byla stanovena vyhodnocením výsledků vnitřní kontroly kvality za první pololetí roku 2005 podle doporučení hematologické společnosti „Kontrola kvality měření krevních obrazů na hematologických analyzátoch“ (dostupné na webové adrese <http://www.sekk.cz> v oddíle „Infoservis“).

Kontrolní materiál 1: průměr $x_p = 2,9 \text{ nl}^{-1}$ $CV_{repro} = 3,3 \%$

Kontrolní materiál 2: průměr $x_p = 7,5 \text{ nl}^{-1}$ $CV_{repro} = 2,9 \%$

Kontrolní materiál 3: průměr $x_p = 12,7 \text{ nl}^{-1}$ $CV_{repro} = 2,7 \%$

V dalším výpočtu bude použita průměrná hodnota $u_{r, repro}$:

$$u_{r, repro} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n CV_{repro, i}^2}{n}} = \sqrt{\frac{3,3^2 + 2,9^2 + 2,7^2}{3}} = 3 \%$$

5. 1. 2. Nejistoty hodnot certifikovaných referenčních materiálů

Hodnota vychýlení/bias byla stanovena analýzou referenčního materiálu RM 245 DGKL–PTB výrobce/dodavatel Referenzinstitut für Bioanalytik DGKL Bonn. Referenční protokol/certifikát vyhotovil Physikalisch–technische Bundesanstalt – PTB Braunschweig (dle norem DIN 58931 – 4:2004). Tento RM byl použit v programech EHK DGKL Bonn (Německo). V certifikátu tohoto materiálu RM DGKL–PTB je uveden vedle certifikované hodnoty počtu/koncentrace leukocytů ($c_{ref} = 7,66 \text{ nl}^{-1}$) i odhad rozšířené kombinované nejistoty $U_{r, ref} = 4,1\%$ ($U_{ref} = 0,31 \text{ nl}^{-1}$) pro koeficient rozšíření $k = 2$.

To představuje standardní nejistotu

$$u_{r, ref} = U_{r, ref} / 2 = 2,1 \%$$

5. 1. 3 Systematická odchylka (vychýlení, bias)

Výsledky měření referenčního materiálu za podmínek opakovatelnosti:

Počet měření: $n = 10$

Průměr měření: $x_p = 7,45 \text{ nl}^{-1}$

Referenční certifikovaná hodnota: $c_{ref} = 7,66 \text{ nl}^{-1}$

Pak se výtěžnost R a vychýlení/bias B_r vypočte podle vztahů (11) a (12):

$$R = \frac{x_p}{c_{valid}} \cdot 100 = \frac{7,45}{7,66} \cdot 100 = 97,3 \%$$

$$B_r = R - 100 = 97,3 - 100 = -2,7 \%$$

5. 1. 4 Nejistota systematické odchylky (vychýlení, bias)

Výběrová směrodatná odchylka a standardní nejistota průměru se vypočte:

$$SD = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - x_p)^2} = 0,19 \text{ nl}^{-1}$$

$$u_{x_p} = \frac{SD}{\sqrt{n}} = 0,06 \text{ nl}^{-1}$$

$$u_{r, x_p} = \frac{u_{x_p}}{x_p} \cdot 100 = \frac{0,06}{7,45} \cdot 100 = 0,8 \%$$

5. 2 Kombinace odhadů dílčích nejistot do relativní kombinované a rozšířené nejistoty ($u_{r, tot}$ a $U_{r, tot}$)

Kombinací dílčích nejistot podle vztahu (18) dostáváme:

$$u_{r, tot} = \sqrt{u_{r, repro}^2 + B_r^2 + u_{r, ref}^2 + u_{r, x_p}^2} =$$

$$= 3^2 + (-2,7)^2 + 2,1^2 + 0,8^2 = 4,6 \%$$

$$U_{r, tot} = 2 \cdot u_{r, tot} = 9,2 \%$$

Pro koeficient rozšíření ($k = 2$) je tedy kombinovaná rozšířená nejistota stanovení počtu leukocytů v krvi:

$$U_{r, tot} = 9,2 \%$$

5. 3 Závěr

Odhad rozšířené kombinované nejistoty hodnoty koncentrace/počtu leukocytů je zřejmě reálný. Vývoj referencie je v této oblasti zatím v plenkách, o metrologické návaznosti ani nemluvě. Svědčí o tom i to, že zatím jen jeden stát EU má referenční laboratoř (akreditovanou podle normy ISO 15195), která na základě vlastní národní normy DIN a za pomoci národního metrologického institutu a jeho orgánů uvedenou referenci měření počtu leukocytů provádí (její data jsme také použili v příkladu).