

Jak zlepšit výpočet nejistot měření kvantitativních výsledků?

B. Friedecký, J. Kratochvíla

Zásadní problém

Hodnocení odhadu (ISO 15189) nejistot je po řadu let po zdravotnických laboratořích vyžadováno v rámci akreditace, ale jednoznačný, jednoduchý a jasný postup vyhodnocení není podle mínění expertů EFLM dosud vypracovaný. Proces vyhodnocení vyžaduje po pracovníkovi laboratoře orientaci v základech metrologie. K tomu má nově k dispozici inovovanou verzi příručky **Metrologická terminologie ve zdravotnické a analytické laboratoři**, která byla opět připravena ve spolupráci Eurachem-ČR a SEKK (<http://www.sekk.cz/terminologie/index.php>). Nezbytná je invence laboratorních odborníků a solidní znalost analytické chemie. Navazujeme na článek M. Budiny z minulého čísla o nejistotách (FONS 1/2004) <https://www.bulletinfons.cz>.

Zkušenost nás přesvědčila, že kvalitní Doporučení o vyjadřování nejistot měření v zdravotnických laboratořích, dostupné na webu www.cskb.cz a webu www.sekk.cz je vhodné doplnit předloženým jednoduchým manuálem s příklady použití.

Cíl textu

Hlavním podkladem je text Doporučení k vyjadřování nejistot kvantitativních výsledků měření ve zdravotnických laboratořích, publikovaný na stránkách ČSKB v roce 2021. Cílem je pomoc pro rychlou, jednoduchou a bezchybnou aplikaci v rutinních zdravotnických laboratořích, která se zatím nedaří v potřebné míře.

Nejistota a norma ISO 15189:2023

Odstavec 7.3.4 normy ISO 15189 obsahuje požadavky na vyhodnocení a aplikaci nejistot měření. Dále je o nejistotách měření zmínka v odstavci 6.4.3.

Typy nejistot, se kterými se běžně setkáváme

u	standardní nejistota (měření)
$u(x_i)$	standardní nejistota (měření) pro veličinu x_i
u_c	kombinovaná standardní nejistota (měření)
u_{Rw}	nejistota charakterizující mezilehlou preciznost měření
U_{rel}	standardní nejistota (měření) vyjádřená jako relativní (tj. v %)

U	rozšířená nejistota (měření)
U_c	kombinovaná rozšířená nejistota (měření)
U_{rel}	Rozšířená nejistota (měření) vyjádřená jako relativní (tj. v %)
k	koefficient rozšíření používaný pro výpočet rozšířené nejistoty měření

Vypočítat, rozpoznat a nezaměnit je a jejich kombinace navzájem je zcela zásadní.

Standardní nejistota (u, u_{rel})

Stanoví se jako hodnota SD nebo CV za podmínek mezi-lehlé preciznosti měření. Podrobné instrukce podle Doporučení pracovní skupiny EFLM pro praktický přístup k nejistotám jsou: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2022.04.1003> nebo: <https://doi.org/10.1515/cclm-2023-1286>.

Optimální podmínky výpočtu:

- data interní kontroly kvality (IKK)
- jedna šarže komerčního kontrolního materiálu IKK (v praxi osvědčeného výrobce)
- optimálně 300 výsledků měření kontrolního materiálu jedné šarže
- změna šarže kontrolního materiálu (nebo kalibrátoru) vyžaduje přepočítání standardní nejistoty.

Rozšířená nejistota U, U_{rel}

Vypočtená podle vztahu $U = k \times u$

Rozšířená nejistota U je to, co laboratoř uvádí klientům (zákazníkům). Při výpočtu nejistot v rutinních laboratořích se téměř výhradně používá hodnota koeficientu $k = 2$, což odpovídá 95% konfidenční úrovni.

Bias a nejistota

Spolehlivého stanovení bias lze dosáhnout jen u několika desítek standardizovaných laboratorních vyšetření. Proto je započtení příspěvku bias do výpočtu odhadu nejistot často zdrojem problémů a rozdílů výsledků. Původní představa výpočtu nejistot, formulovaná v Pokynu pro vyjadřování nejistoty (GUM 1995) předpokládala hodnoty bias za prakticky kompenzované kalibrací na hodnoty blízké nule a s jejím podílem na nejistotě se vůbec nepočítalo.

V souladu s výše uvedeným Doporučením se ani v tomto textu nezbyváme započítáním bias do odhadu nejistoty.

Kombinovaná nejistota

Při výpočtu se kombinuje standardní nejistota (získaná výše uvedeným postupem z IKK) s nejistotou kalibrátoru výrobce IVD-R u_{cal} . Výpočet se provádí podle Doporuče-

ní ČSKB o výpočtu nejistot kvantitativních měření (www.cskb.cz).

Hodnoty U_c lze získat buď v absolutních hodnotách koncentrací (hodnot množství), nebo (častěji) jako relativní hodnoty (v %).

Hodnota U_{cal} u kalibrátorů dodávaných výrobcí IVD má být vždy k dispozici.

V řadě aktuálních prací, např. <https://doi.org/10.1515/cclm-2023-1325>, se můžeme setkat se vztahem:

$$u_c = (u_{ref}^2 + u_{cal}^2 + u_{Rw}^2)^{1/2}$$

$$U_c = 2 \times u_c$$

Uvedený vztah odkazuje na skutečnost, že základními složkami (příspěvky) nejistoty výsledku měření v laboratoři jsou:

- nejistota referenčního materiálu, který stojí na vrcholu pyramidy metrologické návaznosti (u_{ref})
- nejistota kalibrátoru (u_{cal})
- mezilehlá preciznost měření v laboratoři (u_{Rw})

Tento vztah je však v běžném životě laboratoře těžko použitelný, protože k jeho aplikaci by laboratoř musela mít od výrobce kalibrátoru dvě informace: nejistotu reference, k níž je kalibrátor navázán, a příspěvek nejistoty samotného kalibrátoru. Ve skutečnosti ale výrobci (správně a logicky) uvádějí jen jedno číslo, jednu hodnotu nejistoty kalibrátoru, která zahrnuje i příspěvky všech stupňů, které leží „nad“ kalibrátorem.

Kde najít data o nejistotách

- Výrobci dle IVD-R musí mít stanoveny nejistoty hodnot vlastních kalibrátorů (u_{cal} , resp. U_{cal}) a zdravotnické laboratoře by je měly požadovat. Výrobci IVD je musí mít k dispozici a jsou povinni je na žádost sdělit. Zde ale pozor na typ udané hodnoty a na změny šarží kalibrátorů.
- Zdrojem orientačních velikostí nejistot, kterých dosahují špičkové laboratoře a které lze využít pro srovnání s vlastní nejistotou, spočítanou v laboratoři, může být např. program externího hodnocení kvality (EHK - RELA) pro referenční laboratoře v oblasti laboratorní medicíny IFCC s výsledky celé řady analytů, který organizuje RfB Bonn (Referenzinstitut für Bioanalytik), a jsou dostupné na webové adrese www.dgkl-rfb.de:81. Tam naleznete hodnoty kombinovaných rozšířených nejistot referenčních metod, kalibrovaných certifikovanými referenčními materiály pro řadu standardizovaných analytů v období let 2003 až 2023. Řada z nich poskytuje informace o jinak nedostupných hodnotách U_{ref} . Například pro stanovení proteinů, rutinních analytů a parametrů, lékových koncentrací a hormonů je to cenný srovnávací materiál pro hodnoty nejistot v rutinních laboratořích.
- V databázi EFLM, vytvořené z dat EuBIVAS (<https://www.biologicalvariation.eu>) jsou uvedeny hodnoty po-

žadovaných nejistot, vypočtené z hodnot biologických variabilit. Pro každý z velkého počtu analytů (více než 100) jsou uvedeny tři kategorie hodnot - optimální, žádoucí a minimální. Problémem těchto dat ale je, že u analytů se silnou závislostí na metodě měření (což je většina), jsou data většinou vypočtena pouze jednou metodou a měřena jednou měřicí platformou (nejčastěji Cobas e801). Interpretace těchto hodnot je tímto silně limitována, nicméně alespoň k účelům srovnání je užitečná.

- Rovněž lze ke srovnání vypočtených hodnot v laboratořích použít hodnoty z tabulky 1 práce Panteghiniho <https://doi.org/10.1515/cclm-2023-1325>. Tabulka uvádí hodnoty vypočtené tak, jako v našem textu. U kombinovaných nejistot pozor na skutečnost, že se zde jedná o hodnoty kombinovaných nejistot (u_c) před rozšířením.

Kolik hodnot nejistot počítat a jejich možné numerické hodnoty

Vypočtená hodnota nejistoty U_c nemůže být nižší, než hodnota U_{cal} .

Je-li vypočtená hodnota nejistoty U_c vyšší, než hodnota APS (analytical performance specification) kontrolního limitu externího hodnocení kvality (u_{SEKK} značeno jako maximálně akceptovaná diference od vztažné hodnoty D_{max}), představuje to impuls ke zlepšení.

Expertí EFLM považují za klíčové nejistoty v oblasti referenčních intervalů. Nicméně požadavky na počet a velikost koncentrací (hodnot obsahů), u kterých se výpočet provádí, nejsou definovány. Je-li nejistota měření výrazně závislá na koncentraci (hodnotě obsahu), je vhodné měřicí rozsah rozdělit na části a pro každou z nich deklarovat jinou nejistotu měření tak, jak je to popsáno i v Doporučení k vyjadřování nejistot kvantitativních výsledků měření ve zdravotnických laboratořích (www.cskb.cz).

Výpočet nejistoty výsledku měření - příklady

Příklad 1: vhodný a doporučený postup výpočtu

Glukóza v plazmě s použitím nejistoty pracovního kalibrátoru

Laboratoř určí standardní nejistotu u_{Rw} reprezentující mezilehlou preciznost měření v laboratoři jako hodnotu CV z dat IKK za hodnocené období:

Vzorek	Průměr (mmol/L)	CV (%)
A	4,86	2,2
B	10,95	2,0

Velikosti obou CV jsou si numericky blízké a není tak třeba uvažovat o rozdělení měřicího rozsahu do několika intervalů a pro každý z nich prezentovat nejistotu samostatně.

Použit „Calibrator Roche Cobas“ $U_{\text{cal,rel}} = 0,8 \%$

$$u_{\text{cal,rel}} = U_{\text{cal,rel}}/2 = 0,4 \%$$

Vzorek A
$u_{\text{c,rel}} = (u_{\text{Rw,rel}}^2 + u_{\text{cal,rel}}^2)^{1/2} = [2,2^2 + 0,4^2]^{1/2} = [5,0]^{1/2} = 2,24 \%$
$U_{\text{c,rel}} = 2 \times 2,24 = 4,48 \%$
Vzorek B
$u_{\text{c,rel}} = (u_{\text{Rw,rel}}^2 + u_{\text{ref,rel}}^2)^{1/2} = [2,0^2 + 0,4^2]^{1/2} = [4,16]^{1/2} = 2,04 \%$
$U_{\text{c,rel}} = 2 \times 2,04 = 4,08 \%$

Získali jsme dvě velikosti nejistot a v souladu s Doporučením budeme navenek (klinikům, zákazníkům) prezentovat tu větší z nich, tj. $U_{\text{c,rel}} = 4,5 \%$ (dvě platné číslice zcela postačují).

Tento postup výpočtu je správný proto, že zahrnuje obě základní složky nejistoty.

Příklad 2: možný, ale nevhodný postup výpočtu

Glukóza v plazmě bez znalosti nejistoty kalibrátoru

Standardní nejistotu u_{Rw} reprezentující mezilehlou preciznost měření v laboratoři určí laboratoř stejně jako v příkladu 1.

Nejistota kalibrátoru není k dispozici.

Vzorek A
$u_{\text{c,rel}} = (u_{\text{Rw,rel}}^2)^{1/2} = [2,2^2]^{1/2} = 2,2 \%$
$U_{\text{c,rel}} = 2 \times 2,2 = 4,4 \%$
Vzorek B
$u_{\text{c,rel}} = (u_{\text{Rw,rel}}^2)^{1/2} = [2,0^2]^{1/2} = 2,0 \%$
$U_{\text{c,rel}} = 2 \times 2,0 = 4,0 \%$

Získali jsme dvě velikosti nejistot a v souladu s doporučením budeme navenek (klinikům, zákazníkům) prezentovat tu větší z nich, tj. $U_{\text{c,rel}} = 4,4 \%$ (dvě platné číslice zcela postačují).

A proč je tento postup nevhodný? Protože laboratoř zcela pominula existenci nejistoty kalibrátoru a tuto složku do výpočtu vůbec nezahrnula (usnadnila si práci a nejistotu kalibrátoru nezjistila – často je nutný explicitní dotaz u výrobce kalibrátoru).

Příklad 3: vhodný a doporučený postup výpočtu s menším omezením

Glykovaný hemoglobin HbA_{1c} v krvi se započtením nejistoty kalibrátoru

Laboratoř v rámci IKK měřila jen jeden vzorek a získala CV = 2,8 %.

Hodnota $U_{\text{cal,rel}} = 1,5 \%$, odtud $u_{\text{cal,rel}} = 0,75 \%$ (calibrator C.f.a.s. Roche Cobas HbA_{1c})

$$u_{\text{c}} = (u_{\text{Rw}}^2 + u_{\text{cal}}^2)^{1/2} = [2,8^2 + 0,75^2]^{1/2} = [8,4]^{1/2} = 2,9 \%$$

$$U_{\text{c}} = 2 \times u_{\text{c}} = 5,8 \%$$

Menší omezení tohoto postupu spočívá v tom, že laboratoř nemá informaci o tom, zda se velikost nejistoty výrazně nemění v rámci měřicího rozsahu metody.

Shrnutí

Hodnoty U_{cal}

Je povinností výrobce tyto hodnoty v souladu s IVD-R (In Vitro Diagnostic Medical Device Regulation) sdělit na vyžádání a povinností laboratoře je tyto hodnoty získat. Je třeba věnovat pozornost tomu, v jaké jednotce výrobce nejistotu uvádí (jednotka měření nebo %) a zda jde o standardní nebo rozšířenou nejistotu.

Predikce dalšího vývoje výpočtů nejistot

Je dána rozvojem standardizačních a harmonizačních procesů. Je podmíněna obecnou přístupností dat dle IVD-R o nejistotě kalibrátorů výrobců u_{cal} (resp. U_{cal}). Ze strany laboratoří to vyžaduje průběžnou aktualizaci znalosti těchto procesů a aktivní přístup ke zjišťování nejistot kalibrátorů.

Akribie laboratorních pracovníků

Je zřejmé, že výpočty nejistot jsou principiálně (matematicky) velmi snadné. Nicméně výsledky v laboratořích vykazují velkou četnost zřejmých nerealistických až nesmyslných výsledků. Problémem může být malá pečlivost (nejistoty jsou na okraji zájmu laboratorních pracovníků) a nedostatek znalostí metrologie analytické chemie. Každý omyl při výpočtu vede nutně k chybnému odhadu nejistoty, ať již nereálně nízkému nebo vysokému. Bez smyslu pro pečlivost, důležitost detailu (akribie) a vědomí souvislosti s metrologií a základní statistiky a bez kvalitního jednoduchého kalkulátoru není možné problém výpočtu nejistot vyřešit. Nově je vhodný kalkulátor i s příklady výpočtů publikován třeba zde: <https://doi.org/10.1515/cclm-2023-0740>.

Přehled možných omylů při výpočtu nejistoty

- Záměny nejistot, vyjádřených jednotkami měření s relativními hodnotami v procentech.
- Záměna procent a bezrozměrových jednotek.
- Záměny standardních a rozšířených dílčích nejistot u výpočtů kombinovaných nejistot.
- Nezahrnutí nejistoty kalibrátoru do výpočtu.

Role výrobců kalibrátorů

Výpočty nejistot hodnot kalibrátorů u jednotlivých výrobců nejsou zatím dostatečně harmonizované. Existují např. případy, kdy výrobce do nejistoty kalibrátoru nezahrne nejistotu referenčního materiálu, na který svůj kalibrátor navázal, aniž by tuto skutečnost zákazníkovi sdělil – to vede k neadekvátně nízkým nejistotám hodnot kalibrátorů.

Častou chybou je rovněž to, že výrobce jasně nespecifikuje, zda uvádí standardní nebo rozšířenou nejistotu, po-

případě neuvádí, jaký koeficient rozšíření (k) pro výpočet rozšířené nejistoty použil.

Rovněž dostupnost a způsob prezentace nejistot jsou v řadě případů slabé až žalostné, zejména stále vážne řádné používání termínů dle VIM-3.

Tři zásadní poznatky

- Rozhodující podíl na hodnocení nejistoty má mezilehlá preciznost měření (viz všechny příklady výpočtu).

- Lze doporučit použití kalkulátorů nejistot pro snížení chybovosti výpočtu nejistot (byť vztahy jsou triviální).
- Trend ukazuje, že bez kvalitního výpočtu nejistot se neobejdou procesy řízení kvality, dodržování normy ISO 15189 a validace a verifikace laboratorních měření.