

Annex článku „Preciznost a bias metod měření dle EP15-A3“

Ambrožová J., Kratochvíla J.

Autoři sdělení „Preciznost a bias metod měření dle EP15-A3“, jehož cílem od počátku bylo a je jedině - dát případným českým zájemcům představu, jak se v krocích provádí a jak se v české praxi osvědčila verifikace metod podle aktualizovaného mezinárodního doporučení CLSI EP15-A3, se tímto čtenářům omlouvají, že níže je uvedeno pouze Supplementum zmíněné české publikace, a že vydání annexu zřejmě časově předejde tisk vlastního článku.

Článek „Preciznost a bias metod měření dle EP15-A3“ sepsaný v lednu 2016 bude letos publikován samostatně ve čtvrtém čísle časopisu Klinická biochemie a metabolismus (ISSN: 12107921). Níže předkládáme jeho Supplementum.

Všechna zde prezentovaná data byla naměřena na analyzátoru Abbott ARCHITECT c8000.

Tabulka č. 1 uvádí záznam souboru naměřených dat v experimentu prováděném v designu 5x5 dle doporučení CLSI EP15-A3 na příkladu stanovení hmotnostní koncentrace albuminu. Tabulka je doprovázena grafickým zpracováním a popisem provedeným doplňkem Analyse-it (verze 4. 51) MS Excel, obrázek č. 2.

Kroky výpočtů preciznosti

Odhady preciznosti měření *opakovatelnosti* (R) a *celkové (inter-laboratorní) preciznosti* WL pro každý vzorek provádí ANOVA tak, že celkovou variabilitu souborů dat rozdělí na dvě základní frakce: sériovou (MS1) a mezisériovou (MS2), kde skupinový faktor představují série. Tabulka 2 uvádí obecný ANOVA formát výstupů analýzy.

Tab. 2 Generalized one-way ANOVA, Summary table format

Variation Source	SS	DF	MS
Between-run	SS1	DF1	MS1
Within-run	SS2	DF2	MS2
Total	SStotal	DFtotal	

Legend: DF – degrees of freedom; MS mean squares, SS sum of squares

Tabulka č. 3 zobrazuje na vybraném příkladu výpočet preciznosti nástrojem ANOVA programu Excel:

Následné mezivýpočty potřebné k verifikaci podmnožin preciznosti lze manuálně v pěti krocích provést dle [1] následovně:

$$V_w = MS2 \quad (1)$$

kde V_w odpovídá variabilitě za podmínek opakovatelnosti (R)

Je-li $MS1 \leq MS2$, což se v designu 5x5 stává poměrně zřídka, rovná se $VB = 0$, jinak:

$$V_B = (MS1 - MS2)/n_0 \quad (2)$$

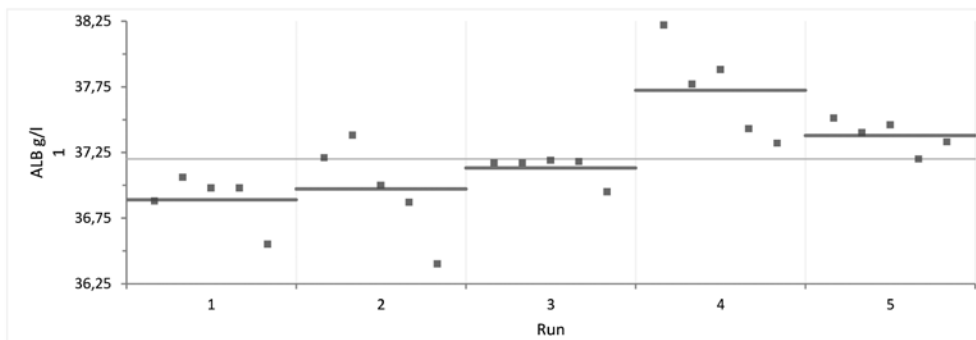
Tab. 1 Own albumin example: Own raw data listing

Albumin (g/l), level 1 ERM-DA470k/IFCC No.13755						
TV 37,2 g/l (Uncertainty U 1,2 g/l)	Run 1	Run 2	Run 3	Run 4	5. Run	Grand Mean
Replicate 1	36,88	37,21	37,17	38,22	37,51	
Replicate 2	37,06	37,38	37,17	37,77	37,40	
Replicate 3	36,98	37,00	37,19	37,88	37,46	
Replicate 4	36,98	36,87	37,18	37,43	37,20	
Replicate 5	36,55	36,40	36,95	37,32	37,33	
Mean	36,890	36,972	37,132	37,724	37,380	37,220
SD						0,389

Grubbs test: 37,22 +/- G *0,389
G= 3,135

Status
38,439 OK
36,000 OK

Descriptives



N	25			
Design	1 x 5 x 5			
Measuring interval	37,200 to 37,200			
Sample	Assigned value	Uncertainty SE	DF	
1	37,200	0,6000	4	
Sample	N	Mean	Mean SE	Recovery
1	25	37,220	0,1513	100,1%
Sample	Run	N	Mean	SD
1	1	5	36,890	0,200
1	2	5	36,972	0,375
1	3	5	37,132	0,102
1	4	5	37,724	0,361
1	5	5	37,380	0,121

Figure 2 Albumin example: Data description by MSA Analyse-it

Tab. 3 Albumin example: One-way ANOVA

Anova: one factor						
Factor						
Data set	Number	Suma	Mean	Variation		
Run 1	5	184,45	36,89	0,0402		
Run 2	5	184,86	36,972	0,14037		
Run 3	5	185,66	37,132	0,01042		
Run 4	5	188,62	37,724	0,13053		
Run 5	5	186,9	37,38	0,01465		
ANOVA						
Source of Variation	SS	DF	MS	F	P	F crit
Between-run MS1	2,288816	4	0,572204	8,5106345	0,000351737	2,866081402
Within-run MS2	1,34468	20	0,067234			

kde V_B znamená „čistou“ mezisériovou variabilitu korigovanou o příspěvek sériové variability a n_0 představuje „průměrný“ počet výsledků v sérii.

Suma obou částí variabilit (V_W a V_B) odpovídá vnitřní laboratorní preciznosti WL. Následným odmocněním odhadů variabilit za daných podmínek získáme příslušné odhady podmnožin precizností R, B, a WL vyjádřené v hodnotách SD:

$$S_R = \sqrt{V_W} \quad (3)$$

$$S_B = \sqrt{V_B} \quad (4)$$

$$S_{WL} = \sqrt{(V_W + V_B)} \quad (5)$$

Odpovídající výpočty relativních hodnot jsou: CVR (%) = $SR \cdot 100/\bar{x}$ a CVWL(%) = $SWL \cdot 100/\bar{x}$, kde \bar{x} je „velký“ průměr, tj. průměr všech výsledků všech měření daného vzorku.

Hodnocení výsledků preciznosti, testy porovnání s požadavky výrobců a UVL

Výpočty UVL se provádějí dle [1] tak, že se nejprve po řadě určí stupně volnosti, df , přičemž df_R je označení stupňů volnosti pro opakovatelnost (R) a df_{WL} stupňů volnosti pro vnitřní laboratorní preciznost (WL):

$df_R = N - k$, kde N je celkový počet výsledků a k je počet sérií, čili df_R v designu 5x5 se rovná 20

df_{WL} se odvodí z hodnoty ρ („rho“), což je podíl výrobcem požadované WL (σ_W) a R (σ_R) odpovídajících hodnotě \bar{x} průměru v testu naměřených koncentrací daného vzorku následovně:

$$\rho = \sigma_{WL} / \sigma_R = CV_{WL} / CV_R \quad (6)$$

Hodnota ρ je základem zjištění faktoru F (funkce stupňů volnosti df_R , df_{WL} a počtu měřených vzorků), jehož je zapotřebí k výpočtu horních verifikačních limitů (UVL) z příslušné tabulky dle [1] tak, že UVL jsou násobkem faktoru F a požadavků výrobce:

Tab. 4 Albumin example: Calculated output for UVLs calculation

	PI LL 1	% CV	PI HL 2	% CV
Mean value g/l	27		41	
Repeatability (R)				
σ_R g/l	0,1	0,5	0,2	0,6
dfR	20		20	
F (1 sample 20 dfR)	1,25		1,25	
UVLR g/l	0,125	0,625	0,25	0,75
Within laboratory precision (WL)				
σ_{WL} g/l	0,4	0,6	0,6	1,5
ρ	1,2		2,5	
dfWL	15		5,5	
F (1 sample; DF 5,5)	1,29		1,47	
UVLR g/l	0,516	0,774	0,882	2,205

Tab. 5 Albumin example: SD or %CV between-run (R), within-run (B) and within-laboratory (WL) variance components calculation; UVLs based on PI precision claims

Precision:	SD	%CV		PI- HL 2		
				%CVR	UVLR	Status
SR = $\sqrt{MS2}$	0,259	0,697	R	>0,6%	<0,75%	OK
SB = $\sqrt{(MS1-MS2)/n0}$	0,318	0,854	B	%CVWL	UVLWL	
SWL = $\sqrt{(MS2+(MS1-MS2)/5)}$	0,410	1,102	WL	<1,5%	<2,205%	OK

$$UVL = F \cdot \sigma \text{ nebo } UVL (\%) = F \cdot CV \quad (7)$$

Laboratorní odhady preciznosti $R (S_R)$ a $WL (S_{WL})$ uživatele se pak znovu porovnávají s příslušnými hodnotami UVL.

Tabulka č. 4 uvádí na daném konkrétním příkladu zvlášť přehled mezivýsledků potřebných k výpočtům UVL a tabulka č. 5 shrnuje všechny kroky výpočtů podmnožin preciznosti R , B a WL a umožňuje jejich srovnání s příslušnými požadavky výrobce a odpovídajícími UVL vypočtenými právě na základě provozních charakteristik uvedených výrobcem v PI.

Závěr platný k příkladu verifikace měření hmotnostní koncentrace albuminu: Při verifikaci metody byly poskytnuty objektivní důkazy, že dané položky splňují specifikované požadavky (VIM 2.44) Přiměřenost požadavků zamýšlenému účelu vychází z plné validace metody výrobcem dle 2.45 VIM pro provozní charakteristiky: opakovatelnost a celková mezilehlá preciznost.

Obrázek č. 5 představuje sumarizaci všech kroků výpočtu tak, jak jej poskytuje software Analyse-it.

Kroky výpočtu odhadů bias a jejich hodnocení

Necht' pak \bar{x} je průměr všech výsledků experimentu měření vzorku, který (v designu 5x5 odpovídá průměru z 25 měření tzv. studie výtěžnosti (recovery) a DF odpovídající počet kombinovaných stupňů volnosti, běžně označovaný a počítaný jako:

$$df_c = nRun - 1$$

(čili obvyklá hodnota při 5 sériích měření činí 4). Pouze, a to velmi zřídka, se DF přesně počítá pomocí tzv. Satterthwaitské aproximace uvedené v [1] v následující podobě (vysvětlení zkratk ve vzorci použitých viz text výše a níže)

Odhady bias uživatele se dějí ve čtyřech krocích, v nichž se dle [1] počítá:

1. se_x jako standardní chyba velkého (celkového) průměru \bar{x}
2. bias (b) jako rozdíl mezi pravdivou hodnotou TV a velkým průměrem \bar{x} ,
3. se_c jako kombinovaná standardní chyba odhadu bias

Precision

Sample	Mean	SD / CV	95% familywise CI (95% individual CI)	Allowable imprecision
1	37,220	1,1%	0,7% to 2,1%	1,6%

Abbreviated components

Mean	Within Run CV	Within Run SD	Total CV	Total SD
37,220	0,7%	0,259	1,1%	0,410

Sample 1

Detailed components

Component	CV	Exact / Satterthwaite		SD	Expected SD / CV	p-value
		95% CI				
Within Run	0,7%	0,5% to 1,0%		0,259	0,6%	0,1363 ¹
Between Run	0,9%			0,318		
Total	1,1%	0,7% to 2,1%		0,410	1,5%	0,8274 ¹

$$H_0: \sigma \leq \sigma_0$$

The imprecision is less than or equal to the expected imprecision.

$$H_1: \sigma > \sigma_0$$

The imprecision is greater than the expected imprecision.

¹ Do not reject the null hypothesis at the 5% familywise (5% individual) significance level.

X² test

	SD	Expected SD	X ² statistic	DF	p-value
Within Run	0,259	0,223	26,96	20	0,1363
Total	0,410	0,558	4,32	8	0,8274

ANOVA

Effect	SS	DF	MS	Expected MS
Run	2,289	4	0,572	$\sigma_{Error}^2 + 5\sigma_{Run}^2$
Error	1,345	20	0,067	σ_{Error}^2

Figure 5 Albumin example: Precision output by MSA Analyse-it

4. verifikační interval (VI), který s 95% pravděpodobností zahrnuje pravdivý rozdíl b. Tento výpočet se děje násobením kombinované standardní chyby se_c „faktorem pokrytí“ k

$$VI = k \cdot se_c \quad (9)$$

kde faktor „k“ má obvykle hodnotu 2 nebo 3 odpovídající 95% nebo 99% hladině pravděpodobnosti.

Verifikační interval pro danou TV se pak dle [1] počítá:

$$VI = TV \pm (m \cdot se_c) = TV \pm (\tau_{0,975} df_c \cdot se_c) \quad (10)$$

kde m je multiplikátor Studentova t kvantilu pro danou pravděpodobnost korespondující se zvolenou hladinou spolehlivosti a zjištěnou hodnotou kombinovaných stupňů volnosti df_c

Tabulka č. 6 je sumarizací všech kroků jedné varianty výpočtu odhadu bias.

Závěr platný k odhadu bias měření

Pozorovaný průměr 37,22 g/l leží v příkladu albuminu uvnitř verifikačního intervalu VI (od 35,99 do 38,41 g/l). Výpočet odhad bias: -TV (37,22 g/l - 37,2 g/l) a činí 0,02 g/l ($\approx 0,1\%$ TV, tj. získaná hodnota odhadu bias je nižší než přípustná hodnota bias $\pm 2,1\%$).

Odpovídající grafika a souhrn všech výpočtů z téhož odhadu bias poskytovány software MSA Analyse-it jsou uvedeny na obrázku č. 6, který se týká téhož příkladu stanovení albuminu.

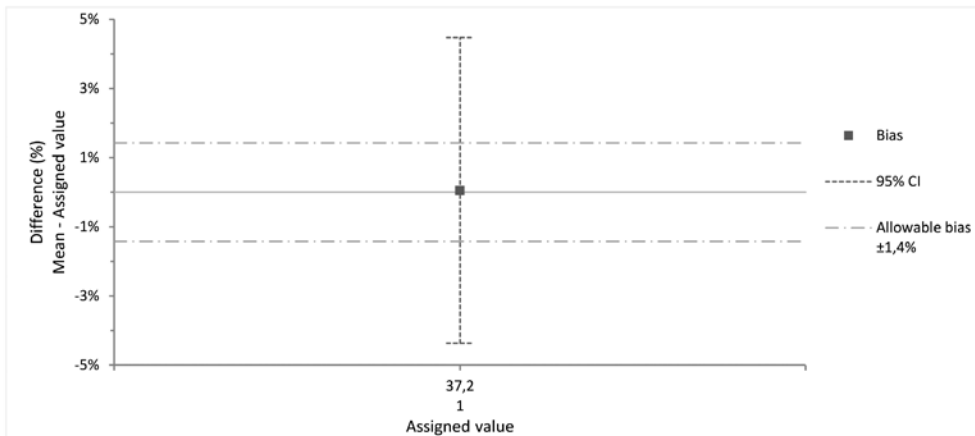
Poděkování závěrem za poskytnutí prostoru k publikaci Supplementa článku „Preciznost a bias metod měření dle EP15-A3“ adresují autoři firmě Abbott Laboratories s.r.o.

Případné konkrétní dotazy kvlastnímu postupu je možné konzultovat na adrese: ambrozova@nempt.cz

Tab. 6 Albumin example: Bias estimation, Calculation steps by Excel

Trueness		Bias (C. Ricos 2014)	
		1,43%	
1.	$se_x = \sqrt{\frac{1}{nRun} \left[s_{WL}^2 - \left(\frac{nRe p - 1}{nRe p} \right) s_R^2 \right]}$	0,151 g/l	
2.	$se_{RM} = U/k$	0,60 g/l	U = 1,2 k = 2
3.	$se_c = \sqrt{se_x^2 + se_{RM}^2}$	0,62 g/l	
4.	$\tau = se_{RM} / se_x$	3,966	
5.	$df_x = nRun - 1$	4,00	nRun = 5
6.	$df_c = df_x \cdot (se_c / se_x)^4$	1119	
7.	$m = t(1-\alpha/2; nSam; v) = t(1-0,05/2; df_c) = (0,975; 1119)$		
8. VI	T.INV.2T	1,962	TV
	$TV \pm (m \cdot se_c)$	38,414	37,2 g/l
		35,986	LL
9. Bias estimate	$\bar{x} - TV$	0,02 g/l	\bar{x}
		0,05 %	37,22 g/l

Trueness



Assigned value	Mean	Bias	95% CI	Allowable bias	p-value
37,200	37,220	0,1%	-4,4% to 4,5%	±1,4%	0,9761 ¹

H0: $\delta = 0$

The bias is equal to 0.

H1: $\delta \neq 0$

The bias is not equal to 0.

¹ Do not reject the null hypothesis at the 5% significance level.

Student's t-test

Assigned value	Difference	SE	t statistic	DF	p-value
37,200	0,020	0,619	0,03	4,5	0,9761

Figure 6 Albumin example: Trueness by MSA Analyse-it