

Analytické vlastnosti metod

Krátký název: Analytické vlastnosti

Autor: Ing. Václav Senft

Recenzent: Ing. Miroslav Zábranský

[Odkaz na on-line verzi \(pro off-line použití\)](#)

Obsah: □

[1. Úvod](#)

[2. Preciznost](#)

[3. Pravdivost](#)

[4. Přesnost](#)

[5. Analytická citlivost](#)

[6. Analytická specifická](#)

[7. Nejistota](#)

[8. Návaznost](#)

[9. Další](#)

[9.1. Porovnávání metod](#)

[Bland Altmanův rozdílový graf](#)

[9.2. Analytické vlastnosti a biologická variabilita](#)

[9.3. Kritická diference](#)

[10. Vývoj názvů](#)

[11. Závěr](#) □

1. Úvod

Nadpis kapitoly vymezuje konkrétní oblast metod v klinických laboratořích. Je nutné si ale uvědomit obecnější souvislosti. Výsledky kvantitativního měření čehokoliv a kdekoliv, ať již je to koncentrace, hmotnost, výška, rychlost, aj. jsou vždy spojeny s určitými vlastnostmi, o kterých je třeba vědět a které je nutné respektovat minimálně při vyhodnocování výsledků měření.

***Příklad ze života:** Před nějakou dobou byl parlamentem ČR schválený nový silniční zákon, ve kterém bylo stručně uvedeno, že nejvyšší povolená rychlost v obci je 50 km/hod. Druhý den nastoupila Městská policie na Nepomuckou ulici v Plzni a pokud někomu naměřila 50,1 km/hod, vyměřila okamžitě pokutu 3000 Kč a udělila 2 trestné body. Přitom nepřesnost měření policejního zařízení byla $\pm 10\%$ a nepřesnost rychloměru v kontrolovaném autě byla také $\pm 10\%$. Interval od cca 45 do cca 55 km/hod proto představoval oblast nejistoty a bezprostřední sankce za překročení o 0,1 km/hod byly více než sporné. Ve velmi krátké době se skutečně zvedla ve veřejnosti vlna odporu a policie začala k nepřesnosti měření přihlížet.*

Uvedený příklad převedený do oblasti analytických metod v klinické laboratoři by mohl vypadat

(a bohužel někdy v zdravotnické praxi vypadá) např. takto:

V laboratorní příručce klinické laboratoře by byla u nějakého analytu uvedena horní referenční mez 100 mmol/l v séru.

Při výsledku pacienta 100,2 mmol/l by počítač hvězdičku, která na výsledkovém listu schématicky znázorňuje „normální“ a zvýšené či snížené hodnoty, přesunul za čáru, čili

do oblasti zvýšených hodnot a ošetřující lékař by okamžitě zvolil razantní invazivní terapii typu sternální punkce, se všemi negativními důsledky pro pacienta.

Analytická nepřesnost metody přitom byla $\pm 10\%$, čili výsledek pacienta mohl být kdekoliv v oblasti od cca 90 do cca 110 mmol/l.

Dále je třeba uvážit souvislost s určením a definicí referenčních mezí, které zachycují ne 100, ale jen 95% zdravé populace. Čili ve zdravé populaci může být i jedinec s výsledkem např. 104,5 mmol/l.

Hlavním cílem této kapitoly nazvané „Analytické vlastnosti metod“ (*anglický ekvivalent Analytical performance characteristics*) není naučit zdravotnický personál (zdravotní sestry, lékaře,...) přesné definice, matematické a statistické vzorce, výpočty a terminologii analytické metrologie, ale hlavně je třeba dosáhnout toho, aby uvedení zdravotníků pracovníci zaregistrovali a při interpretaci laboratorních výsledků důsledně respektovali, že laboratorní výsledky jsou vždy spojeny s konkrétními analytickými vlastnostmi typu přesnost a pravdivost a nejistota atd. a nedělali bezprostřední nepřiměřené zásahy bez zvážení např. významnosti překročení horní referenční meze apod.

Vedlejším přínosem bude snazší komunikace mezi zdravotnickým personálem a klinickou laboratoří a zabránění situacím typu vyžadování kvantitativního výsledku v oblasti pod mezí stanovitelnosti či dokonce pod mezí detekce metody apod.

2. Preciznost

Preciznost (*anglický ekvivalent Precision*) je jedna ze základních analytických vlastností metody. Do určité míry, minimálně z hlediska zavádění nové metody a zjišťování její použitelnosti

pro zamýšlené využití, lze říci, že nejdůležitější. Pokud totiž metoda není dostatečně precizní,

tj. výsledky opakovaných stanovení jsou významně rozdílné, není možné spolehlivě zjišťovat a určovat další důležité analytické vlastnosti, tj. pravdivost, citlivost atd.

Preciznost je definována jako těsnost souhlasu (shody) mezi nezávislými výsledky zkoušky získanými za předem stanovených podmínek.

Při využití názorné analogie se střelbou do terče (viz obr. č. 1) je preciznost vyjádřena rozptýleností zásahů na terči.

Těsnost souhlasu (shody) mezi nezávislými výsledky určují **náhodné chyby** (*anglický ekvivalent Random error*), které není možné zcela vyloučit a nespojují se skutečnou hodnotou analyzovaného parametru, např. koncentrací analytu ve vzorku (viz obr. č. 2). Náhodné chyby odchylojí výsledek od skutečné hodnoty nepravidelně oběma směry, tj. k vyšším i k nižším hodnotám.

Lze konstatovat, že precizní metoda je zatížena zanedbatelnými náhodnými chybami.

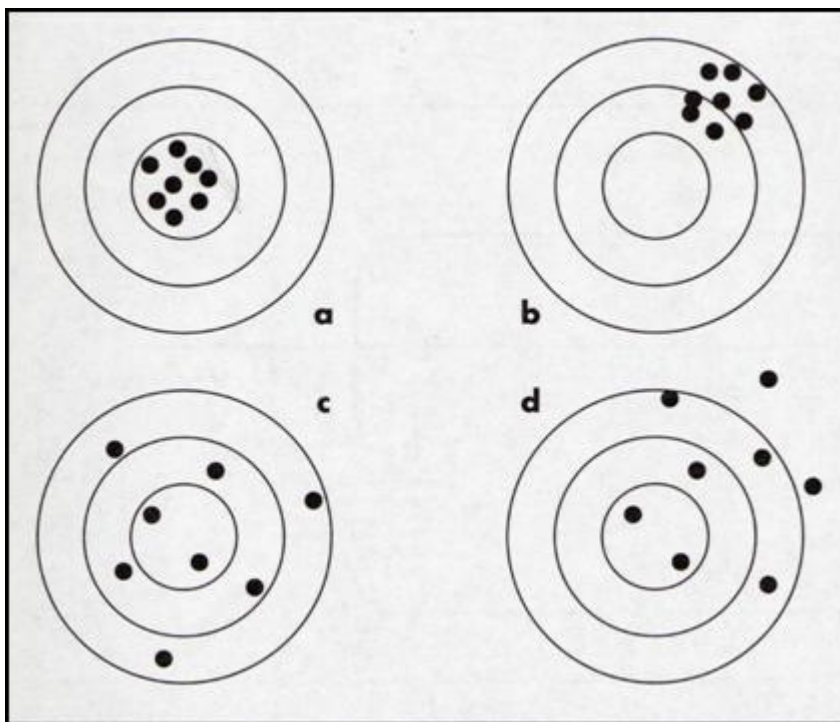
Míra preciznosti se obvykle vyjadřuje jako nepřesnost a počítá se jako **směrodatná odchylka** opakovaných výsledků analýzy. Menší preciznost znamená větší směrodatnou odchylku.

Velmi časté je vyjádření preciznosti termínem **variační koeficient**, což je poměr směrodatné odchylky a průměrné číselné hodnoty výsledků opakovaných analýz (po vynásobení 100 se vyjadřuje v %). Menší preciznost samozřejmě znamená větší variační koeficient.

Uvedené si lze velmi názorně představit na příkladu opakované střelby do terče (obr. č. 1).

Střed terče představuje skutečnou hodnotu, např. koncentraci stanovovaného analytu ve vzorku krve. Jednotlivé zásahy představují výsledky získávané při opakování analýzy.

Pokud jsou zásahy soustředěné v malé oblasti terče – a), resp. b) v obr. č. 1, je střelba, resp. analytická metoda precizní. Pokud jsou zásahy rozptýlené – c), resp. d) v obr. č. 1, je střelba resp. analytická metoda nepřecizní.



Obr. č. 1 Střelba do teče - analogie preciznosti a pravdivosti metody.[[odkaz Racek a kol....](#)]

Část a) znázorňuje optimální a žádoucí situaci, tj. zásahy (výsledky opakovaných analýz) jsou soustředěné v malé oblasti kolem středu terče (skutečné hodnoty stanovovaného analytu

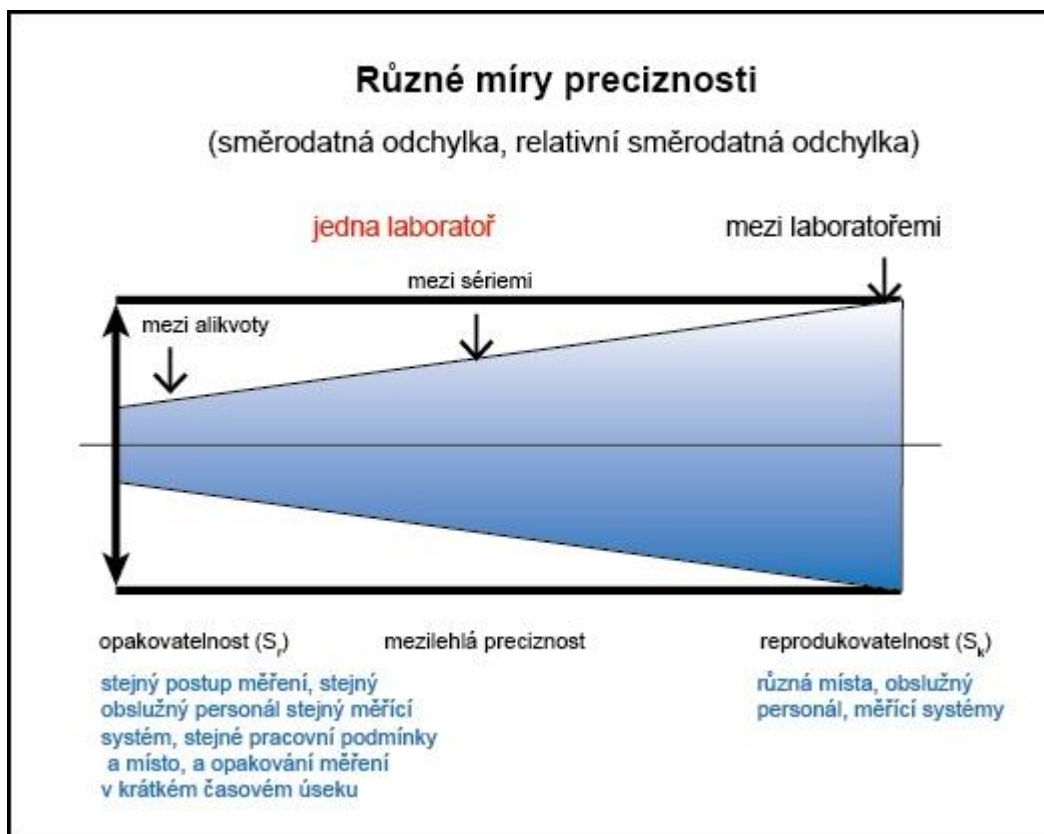
ve vzorku). Metodu lze označit nejen jako precizní ale i pravdivou, čili přesnou – viz příslušné kapitoly (Pravdivost, Přesnost). Metoda je použitelná.

Část b) zachycuje metodu sice precizní, ale zatíženou systematickou chybou, tj. výsledky jsou významně odlišné od skutečné hodnoty – viz kapitolu Pravdivost. Metodu lze použít jen za určitých podmínek a opatření.

Část c) označuje neprecizní metodu, kde se pouze průměr opakovaných analýz (náhodou) přibližuje středu terče (skutečné hodnotě). Metodu nelze použít – není spolehlivá.

Část d) charakterizuje neprecizní metodu, kde i průměr opakovaných analýz je významně odlišný od středu terče (skutečné hodnoty). Metodu je nutné odmítnout.

Rozlišují se různé způsoby získávání dat o preciznosti metody:



a) intralaboratorní (vnitrolaboratorní)

Opakovatelnost (anglický ekvivalent *repeatability*) je preciznost měření za podmínek opakovatelnosti, tj. stejná laboratoř, stejná metoda, stejné reagenty, stejné zařízení, stejný operátor, během krátkého časového intervalu.

Mezilehlá preciznost (anglický ekvivalent *Intermediate precision*) je opakovatelnost téže laboratoře, ale v delším časovém úseku, kdy se může měnit šarže reagentů, kalibrátor i operátor.

b) interlaboratorní (mezilaboratorní)

Reprodukovatelnost (anglický ekvivalent *Reproducibility*) je preciznost měření za specifikovaných podmínek reprodukovatelnosti, tj. stejná metoda, stejné reagenty, ale různé laboratoře, různá zařízení, různí operátoři, různá doba. Vyjadřuje přenositelnost metody mezi laboratořemi.

Poznámka: Nepreciznost metody vyjádřená hodnotou směrodatné odchylky (variačního koeficientu) opakovaných měření je vždy vyšší u reprodukovatelnosti než u mezilehlé preciznosti a samozřejmě i než u opakovatelnosti. Zvýšení nepreciznosti způsobují různé náhodné změny a vlivy, které se neprojeví v krátkém časovém intervalu opakovatelnosti.

Příklad z praxe: V pondělí, kdy se měřila opakovatelnost metody určující aktivitu enzymu byla laboratoř přetopená, zatímco ve středu prasklo topení a v laboratoři bylo velmi chladno. Teplota samozřejmě aktivitu enzymu výrazně ovlivňuje.

3. Pravdivost

Pravdivost (anglický ekvivalent *Trueness*) je druhá nejvýznamnější analytická vlastnost metody. Vyjadřuje, jak těsně se průměr naměřených koncentrací analytu z opakovaných měření shoduje se skutečnou hodnotou koncentrace analytu v měřeném vzorku. Při využití

názorné analogie se střelbou do terče (viz obr. č. 1) je pravdivost vyjádřena vzdáleností zásahů od středu terče.

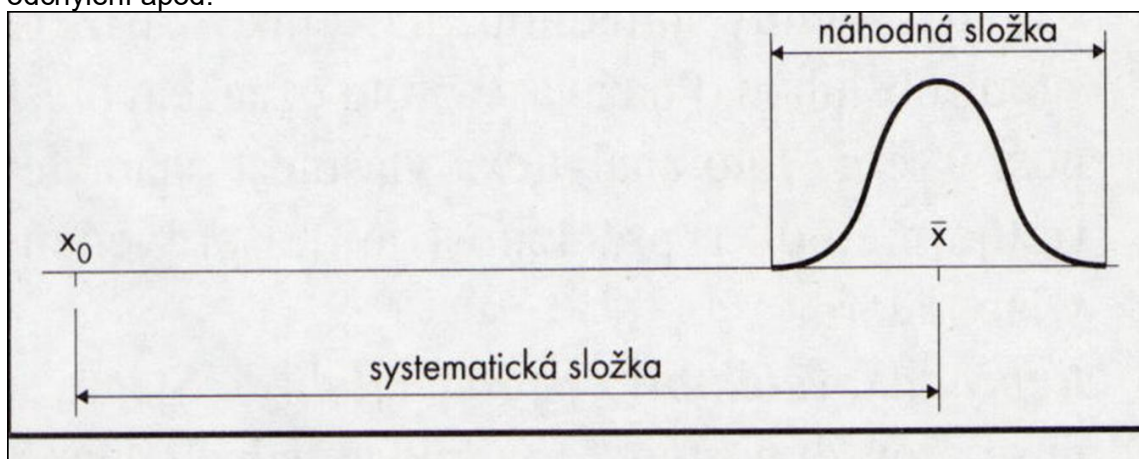
Pozn.: Skutečná hodnota je ve skutečnosti vždy do určité míry neznámá, zastupuje ji dohodnutá referenční hodnota, která se získává opakovanými stanoveními pomocí referenčních metod

ve velkém počtu renomovaných laboratořích.

Kvantitativním vyjádřením míry pravdivosti je velikost odchylky – **bias**.

Pravdivost metody určují **systematické chyby** (anglický ekvivalent *systematic error*), které odchylují výsledek vždy jedním směrem, na rozdíl od náhodných chyb které odchylují výsledek náhodně oběma směry a tím určují preciznost metody (obr. č. 2). Pozitivní systematická chyba zvyšuje hodnotu výsledku, negativní naopak výsledek snižuje.

Systematická chyba může mít nejen konstantní složku, tj. odchýlení je konstantní v celém měřeném rozsahu ale i proporcionální složku, tj. např. se vzrůstající koncentrací vzrůstá odchýlení apod.



Obr. č. 2 Náhodná a systematická složka chyby metody. [odkaz Racek a kol....]

x_0 = skutečná hodnota, odchýlená od průměru výsledků opakovaných stanovení $\bar{x}$.

Lze konstatovat, že pravdivý výsledek je zatížen zanedbatelnými systematickými chybami a precizní výsledek má jen nevýznamné náhodné chyby.

4. Přesnost

Termín přesnost (anglický ekvivalent *Accuracy*) vyjadřuje, že nestačí aby metoda byla jen precizní nebo jen pravdivá. Musí platit obojí současně, tj. metoda musí být současně precizní i pravdivá. Při využití názorné analogie se střelbou do terče (viz obr. č. 1) je přesná metoda znázorněna v části a).

Přesností se tedy míní kombinace preciznosti a pravdivosti. Matematicky se vyjadřuje **celkovou chybou měření** (TE), která se v podstatě rovná součtu náhodné a systematické chyby měření.

Pozn.: Termíny preciznost, pravdivost a přesnost se někdy označují jako "svatá trojice" analytických vlastností metod a jejich vztah lze vyjádřit tak, že přesnost se rovná součtu preciznosti a pravdivosti.

5. Analytická citlivost

K čemu je potřeba znalost analytické citlivosti? Co tato další základní analytická vlastnost metody (anglický ekvivalent *Analytical sensitivity*) vyjadřuje?

***Příklad ze života:** Každý zná běžné osobní váhy, na které si stoupáme, abychom kontrolovali (nebo možná častěji kontrolovaly), zda nám noční vyjídání ledničky nepřidává na hmotnosti, tj. zda místo 70 kg nemáme již 73 kg. Co se ale stane, když na této váze zkusíme odvážit 100 gramů kaka, což nám předepisuje recept na přípravu bábovky. Nestane se nic, respektive ručička osobní váhy se prakticky nepohne, protože nemá dostatečnou citlivost pro vážení gramů. Musíme použít jinou váhu, např. závěsnou kuchyňskou, která si s vážením gramů poradí.*

U analytických metod je to zcela analogické. Určitá analytická metoda dokáže stanovit (má dostatečnou analytickou citlivost) pro koncentrace v řádu miligram/litr, zatímco jiná se nedostane pod gram/litr, což je tisíckrát vyšší koncentrace. Extrémní význam má znalost analytické citlivosti např. v oblasti stanovení stopových prvků, kde jsou koncentrace v řádu mikro až nanogramů/litr.

Znalost analytické citlivosti metody je důležitá především pro určení rozsahu kvantitativně nebo alespoň kvalitativně přímo stanovitelných koncentrací.

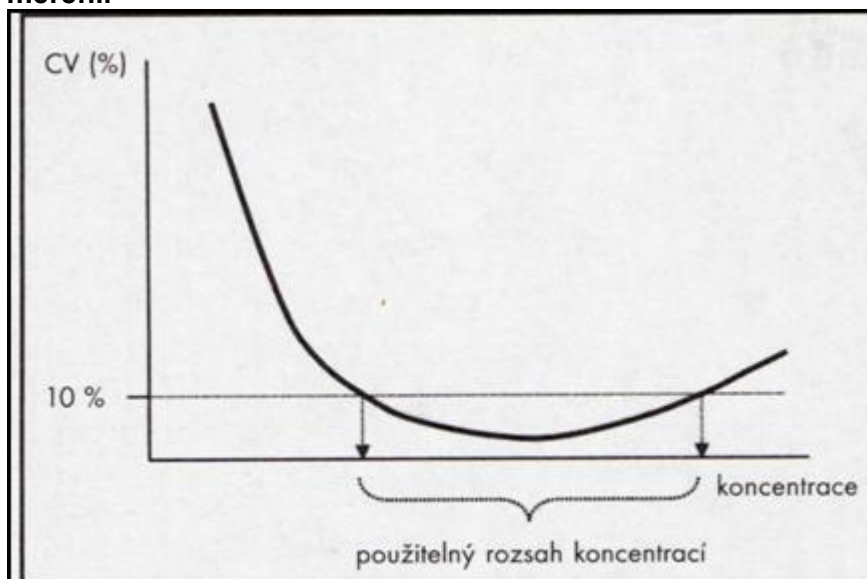
Použitelný rozsah koncentrací se v praxi určuje dvěma hlavními cestami:

1) Pomocí profilu preciznosti

Profil preciznosti vyjadřuje závislost preciznosti metody na koncentraci (obr. č. 3). Preciznost metody totiž není stejná v celém použitelném rozsahu koncentrací. Nejlepší preciznost (nejnižší variační koeficient) obecně bývá zhruba uprostřed koncentračního rozsahu, směrem k vysokým a především nízkým koncentracím se preciznost snižuje (zvyšuje se variační koeficient).

Použitelný rozsah koncentrací se z křivky profilu preciznosti určí jednoduše graficky tak, že se vybere a v grafu na ose preciznosti vyznačí pro daný účel maximálně akceptovatelná nepreciznost (např. $CV = 10\%$). Vodorovná přímka vedená v této maximálně akceptovatelné hodnotě protne křivku profilu preciznosti ve dvou bodech, jejichž promítnutí na osu koncentrace určí minimální a maximální přímo stanovitelnou koncentraci, tj. použitelný rozsah koncentrací.

Někdy se takto určený použitelný rozsah koncentrací označuje jako **funkční citlivost měření**.



Obr. č. 3 Profil preciznosti. [odkaz Racek a kol...]

CV (%) = variační koeficient vyjadřující analytickou preciznost (čím větší je CV, tím horší je preciznost).

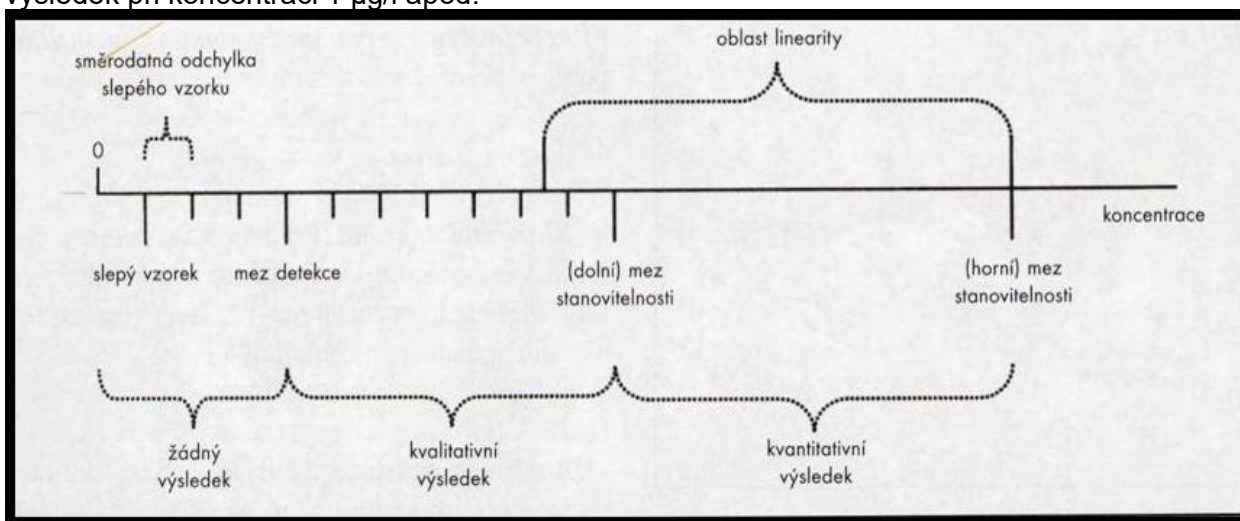
2) Určením základních parametrů spojených s analytickou citlivostí.

Slepý vzorek - obdoba placebo u léků - proběhne kompletně celá analýza, ale místo vzorku biologického materiálu (např. 100 μ l séra) se použije stejný objem roztoku neobsahujícího stanovovanou látku (např. 100 μ l destilované vody).

Mez detekce je definována jako naměřená průměrná hodnota koncentrace slepého vzorku + 3 x směrodatná odchylka opakovaného stanovení slepého vzorku. Vyjadřuje nejnížší naměřenou hodnotu, kterou lze spolehlivě odlišit od náhodného šumu, čili kvalitativně konstatovat přítomnost stanovované látky v analyzovaném vzorku.

Mez stanovitelnosti je definována jako naměřená průměrná hodnota koncentrace slepého vzorku + 10 x směrodatná odchylka opakovaného stanovení slepého vzorku. Vyjadřuje nejnížší naměřenou hodnotu, kterou lze kvantitativně (číselně) vyjádřit.

Na obr. č. 4 je schématicky znázorněno, že při koncentraci stanovované látky ve vzorku nižší než mez detekce nemůže laboratoř vydat žádný výsledek, při koncentraci mezi mezí detekce a mezí stanovitelnosti již lze vydat kvalitativní (např. pozitivní - negativní) výsledek a teprve když je koncentrace vyšší než mez stanovitelnosti, může laboratoř vydat kvantitativní výsledek (např. 100 mmol/l). Znalost těchto faktů je důležitá k tomu aby se na laboratoři nepožadovaly "zázraky", tj. u metody s mezí detekce 100 μ g/l požadovat kvantitativní výsledek při koncentraci 1 μ g/l apod.



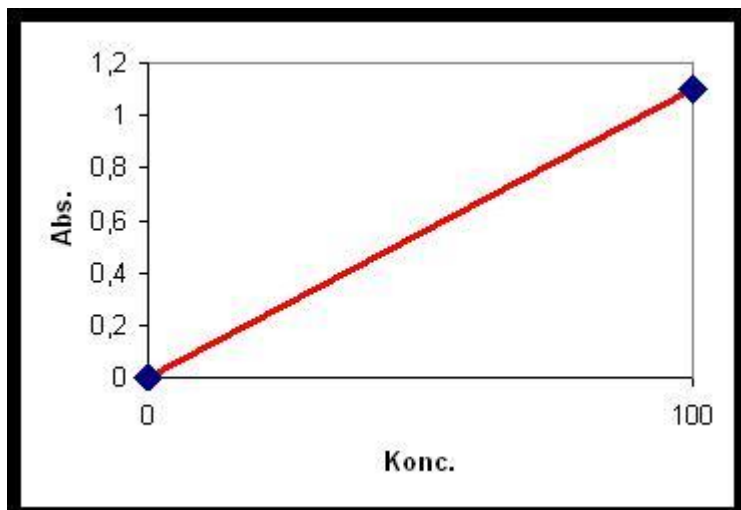
Obr. č. 4 Schéma základních parametrů souvisejících s analytickou citlivostí.

[odkaz Racek a kol....]

Oblast linearity vymezuje oblast koncentrací, ve které platí, že měřený signál (např. optická absorbance) je přímo úměrná koncentraci stanovované látky ve vzorku (tj. že u optických metod platí Lambert-Beerův zákon).

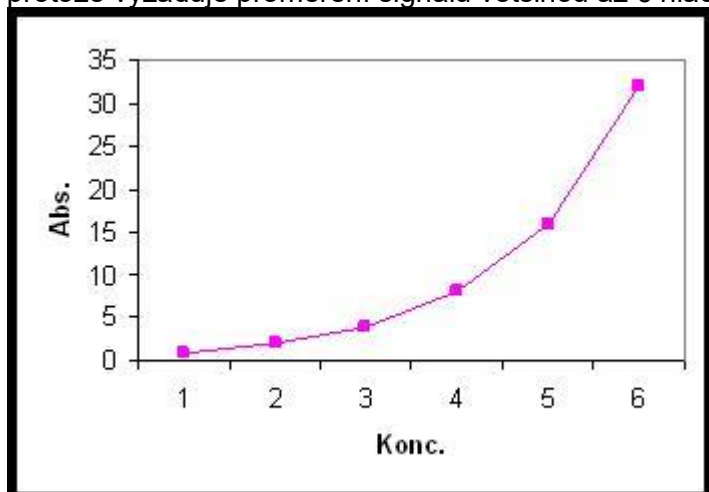
Tato oblast je výhodná (časově i ekonomicky) pro rutinní praktické použití, protože pro konstrukci lineární kalibrační křivky, tj. závislosti hodnoty měřeného signálu (např. absorbance)

na koncentraci stanovované látky ve vzorku (viz obr. č. 5), stačí naměřit signál jen jednoho kalibrátoru a lineárně, tj. přímkou ji spojit s signálem slepého vzorku.



Obr. č. 5 Lineární kalibrace

Konstrukce nelineární kalibrační křivky (viz obr. č. 6) je mnohem náročnější a nákladnější, protože vyžaduje proměření signálu většinou až 6 hladin kalibrátoru.



Obr. č. 6 Nelineární kalibrace.

6. Analytická specifičnost

Pro všechny žadatele o provedení laboratorního vyšetření biologického materiálu je jistě důležité vědět, zda například výsledek označený jako koncentrace koproporfyriu III v moči je skutečně jen koncentrace koproporfyriu III a ne koncentrace směsi kopro, uro a protoporfyriu v moči (zcela zásadní informace pro diferenciální diagnostiku porfyrií). Právě analytická vlastnost metody nazývaná jako analytická specifičnost vyjadřuje schopnost metody stanovovat specificky pouze tu látku, která má být stanovena, tj. zda a do jaké míry je výsledek ovlivněn jinými látkami přítomnými v analyzovaném vzorku.

Důležitý je související termín **analytická interference**, což je systematická chyba způsobená analytickým interferentem, tj. jinou než stanovovanou složkou v analyzovaném vzorku, která způsobuje zvýšení nebo snížení měřeného signálu. Látky způsobující interferenci mohou být endogenní (bilirubin, hemoglobin, triacylglyceroly aj.) ale i exogenní (léky, vitaminy aj.).

Například: Chylozita (zákal) vzorku obvykle zvyšuje měřený signál - absorbanci při fotometrických stanoveních.

Do určité míry souvisí pojem **robustnost metody**, tj. schopnost metody poskytovat přijatelné výsledky i při odchylkách ve složení vzorku (např. vyšší hemoglobin v hemolytickém vzorku séra, aj.) nebo měřicího postupu (např. prodloužení času temperace vzorku apod.).

Často se určuje i **výtěžnost metody** (*anglický ekvivalent recovery*). Zanalyzuje se vzorek bez přídavku a vzápětí vzorek se známým přídavkem stanovené látky. Hodnotí se, jakou část známého přídavku metoda detekovala ve výsledku. Optimální samozřejmě je, když se recovery blíží 100%.

Analytická interference je něco jiného, než **kontaminace**, což je nechtěný nebo nečekaný přídavek stanovené látky do analyzovaného vzorku.

Například pokud by se provedl odběr krve na stanovení aluminia (často prováděné u pacientů

z hemodialýzy) v běžných gumových rukavicích, kontaminoval by talek, kterými jsou rukavice poprášené, vzorek a výsledek by byl až stokrát vyšší, než je skutečná koncentrace Al v séru.

Při výskytu protikladných až nesmyslných výsledků je vždy třeba pamatovat mimo jiné i na možnost analytické nespecifičnosti a dříve než se u pacienta přistoupí k nějakým invazivním zásahům, tuto možnost prověřit např. opakováním stanovení jinou vhodnější metodou, apod.

Samozřejmě je možné postavit analytickou metodu tak, že by byla 100% analyticky specifická. Musely by se ale zařadit různé separační chromatografické kroky a výsledek by sice byl zcela specifický, ale byl by k dispozici např. za dva týdny a stál by např. 10 000 Kč. V praxi se proto podle účelu použití vždy volí kompromis mezi specifičností, cenou a rychlostí provedení.

7. Nejistota

Slovo nejistota znamená obecně pochybnost, neurčitost, jinak řečeno označuje omezenou znalost hodnoty výsledku. Nejistota měření ale v žádném případě neznamená pochybnost o správnosti měření.

Nejistota měření *U* (*anglický ekvivalent Uncertainty*) je parametr (může jím být například směrodatná odchylka) přidružený k výsledku měření, který charakterizuje míru rozptýlení hodnot, které by mohly být důvodně přiřazeny výsledku.

Nejistota určuje interval hodnot, v němž se nachází výsledek s určitou pravděpodobností.

Například koncentrace analytu vyjádřená jako $x \pm U$, konkrétně např. $275 \pm 25 \mu\text{mol/l}$ znamená, že výsledek může být v intervalu 250 - 300 $\mu\text{mol/l}$.

Poznámka: Rozdílný termín představuje **chyba měření**, která je definována jako odchylka jednoho výsledku od skutečné hodnoty.

Nejistota měření sestává z mnoha složek, například nejistota chyby preanalytické fáze (způsob odběru, skladování a transportu), nejistota kalibrátoru (odchylky mezi výrobními šaržemi), mezilehlá preciznost, aj. Některé složky nejistoty mají zanedbatelný vliv, proto se do výpočtu nejistoty nezahrnují (např. nejistota pipetování automatickým analyzátozem), jiné jsou velmi významné (např. mezilehlá preciznost).

Nejistoty typu A se zjišťují laboratorním experimentem (stanovení preciznosti, pravdivosti,...).

Nejistoty typu B se zjišťují z literárních dat (certifikátů, technické dokumentace, tabulek). Nejistoty složek vyjádřené jako směrodatná odchylka nebo variační koeficient se označují jako **standardní nejistoty (u)**.

Kombinovaná standardní nejistota (u_c) pak zahrnuje všechny významné standardní nejistoty.

V klinických laboratořích je kombinací (odmocnina ze součtu čtverců) mezilehlé preciznosti (určené z výsledků interní kontroly kvality), hodnoty a nejistoty vychýlení (bias) a nejistoty kalibrátoru.

Pro většinu účelů se používá **rozšířená kombinovaná standardní nejistota (U)**, která se vypočítá vynásobením kombinované standardní nejistoty faktorem rozšíření (nejčastěji se volí hodnota faktoru = 2, pro 95% hladinu spolehlivosti).

Důležité je uvědomit si, že nejistota není stejná v celém pracovním rozsahu měřených koncentrací. Směrem k nízkým hodnotám se nejistota zvyšuje. Znamená to, že je třeba posoudit nejistotu na více hladinách (v klinických laboratořích obvykle 2 - 3) a určit intervaly nestejných nejistot.

Pro **praktický výpočet nejistoty** v současné době existují dva přístupy:

1. Jednodušší je postup dle doporučení Australské společnosti klinické biochemie, podle něhož se rozšířená kombinovaná standardní nejistota U vypočítá jednoduše jako dvojnásobek variačního koeficientu výsledků vnitřní kontroly kvality metody za období šesti měsíců.
2. Podrobnější je postup podle doporučení České společnosti klinické biochemie, podle něhož se standardní kombinovaná nejistota u. vypočítá jako odmocnina ze součtu čtverců nejistoty mezilehlé preciznosti (získá se z výsledků vnitřní kontroly kvality za 6 měsíců), nejistoty kalibrátoru (bývá uváděn v příbalovém letáku dodavatele) a nejistoty systematické odchylky (určí se proměřením certifikovaného referenčního materiálu nebo z výsledků mezilaboratorní kontroly kvality).
Rozšířená standardní nejistota U je potom dvojnásobek standardní kombinované nejistoty u.

Poznámka: Hodnoty rozšířené kombinované nejistoty U vypočítané oběma způsoby se příliš neliší, čili lze použít oba.

8. Návaznost

Analytická vlastnost označovaná termínem návaznost (*anglický ekvivalent traceability*) by měla vést ke srovnatelnosti výsledků v čase a místě a to nejen v ČR, ale po celém světě. *Když například laboratoř v České republice stanoví pacientovi určitou koncentraci iontů v krvi a pacient vzápětí odletí do USA, kde mu rovněž stanoví koncentraci iontů v krvi, tak při splnění podmínky návaznosti použitých metod by se výsledky získané v ČR neměly významně odlišovat od výsledků v USA.*

Návaznost se zajišťuje řetězcem metrologické návaznosti, který je definován prostřednictvím hierarchie kalibračních materiálů od pracovního kalibrátoru používaného rutinně v laboratoři, přes certifikovaný referenční materiál, až po primární referenční materiál (jednotku měření SI).

Je to do určité míry analogie k platino-iridiovému prototypu metru uloženému ve Francii, na který jsou navázána všechna metrická měřidla po celém světě. Vytvoření tohoto mezinárodního standardu odstranilo dřívější zmatky a potíže způsobené například tím, že Pražský loket byl jinak dlouhý než Pařížský loket apod.

Někdy je problém v tom, že hierarchie kalibračních materiálů má příliš mnoho článků. Například z mezinárodního certifikovaného referenčního materiálu se odvozuje národní referenční materiál, z kterého si jednotlivé firmy nejprve odvodí svůj tzv. Master Calibrator (obvykle se jedná o směsné lidské sérum rozpipetované do lahviček a uchovávané po mnoho let při - 80 ° C). Teprve na ten se naváže hodnota komerčního rutinního firemního kalibrátoru. Protože ale příprava každého článku vnáší určitou nejistotu, může být nejistota rutinního kalibrátoru enormně vysoká.

9. Další

9.1. Porovnávání metod

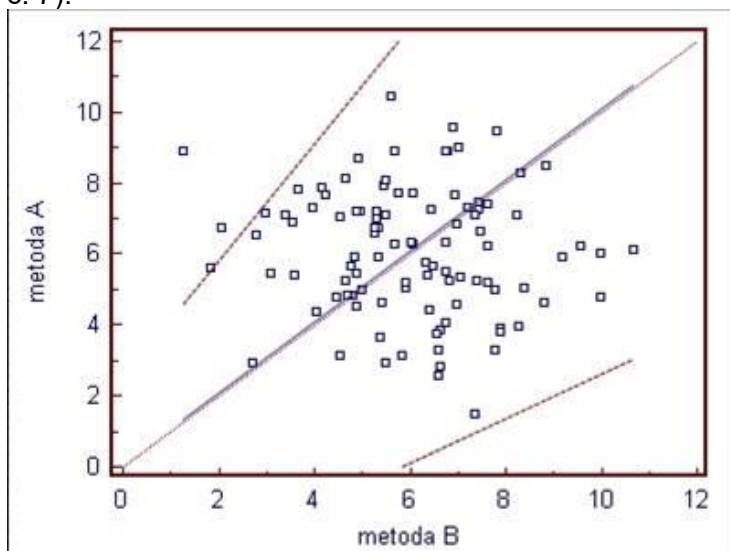
Porovnání dvou metod je v praxi klinických laboratoří poměrně častá záležitost. Jaké jsou možné indikace k provedení této činnosti?

Příklad 1: Laboratoř, která stanovuje Troponin na analyzátoru A, z nějakých důvodů (ekonomických, praktických, organizačních) začne stanovovat Troponin na analyzátoru B.

Příklad 2: Praktický lékař posílá biologický materiál do laboratoře C a pacient má stabilně výsledky kolem 100 mmol/l. Někdo lékaře přesvědčí aby posílal biologický materiál do jiné laboratoře D a pacient má najednou hodnotu 200 mmol/l. Lékař akutně potřebuje rozhodnout, zda je zdvojnásobení výsledku způsobené změnou (zhoršením) zdravotního stavu pacienta nebo je to tím, že laboratoř D realizuje stanovení jinou metodou než laboratoř C.

Porovnání se nejčastěji provádí tak, že se soubor vzorků současně zanalyzuje starou metodou A i novou (jinou) metodou B. Výsledek se vyhodnotí graficky metodami regresní analýzy.

Nejčastěji se pro lineární závislost a pro situaci, kdy se neuvažuje, která ze dvou proměnných je závislá a která nezávislá, využívá **regrese podle Passing-Babloka** (viz obr. č. 7).



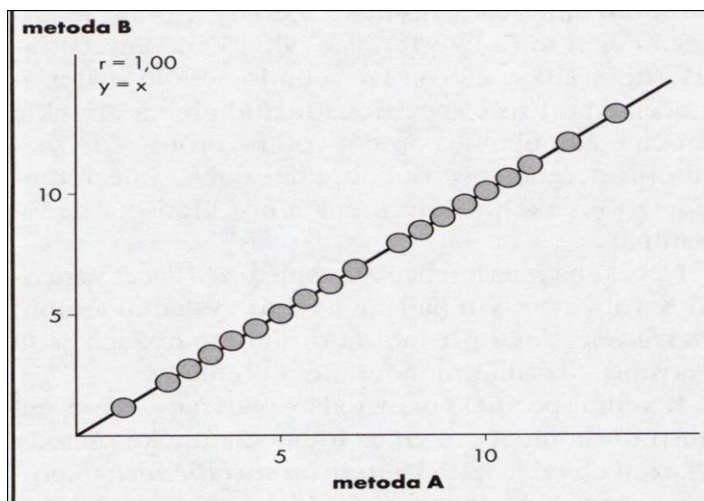
Obr. č. 7 Porovnání metod podle Passing-Babloka.

Hodnotí se, zda je **sklon (směrnice)** proložené přímky významně odlišný od jedničky, která odpovídá úhlu 45° a dále, zda je **intercept** (hodnota ve které proložená přímka protíná osu y) významně odlišný od nuly.

Pokud významná odlišnost obou uvedených údajů není (viz např. situaci znázorněnou na obr. č. 7), znamená to, že nejsou významně odlišné výsledky vydávané metodou A od výsledků vydávaných metodou B a lze napsat, že $A \sim B$.

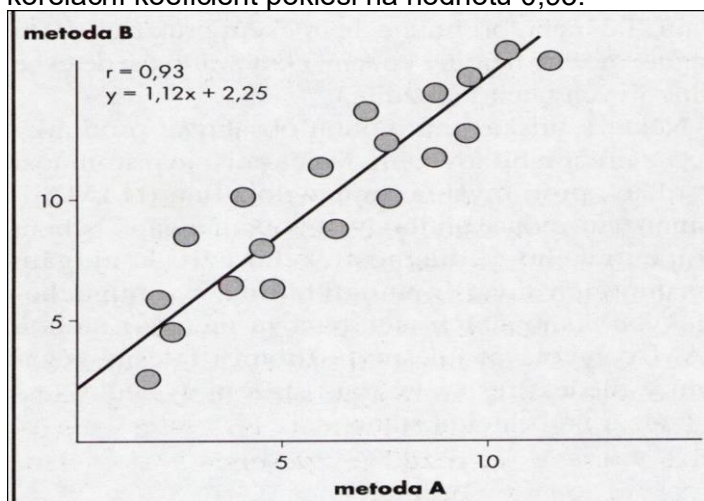
Pokud se významně liší směrnice nebo intercept nebo obojí, musí se proložená přímka popsat obecnou rovnicí přímky ve tvaru: $A = k \times B + q$, kde k = směrnice a q = intercept

Důležitý související termín je **korelační koeficient (r)**, který charakterizuje těsnost naměřených bodů k proložené křivce. Na obr. č. 8 je znázorněná situace, kdy korelační koeficient má hodnotu 1,0. To znamená, že všechny body regresní závislosti leží přesně na proložené přímce.



Obr. č. 8 Regresní závislost s korelačním koeficientem = 1,0 [odkaz Racek a kol....]

Čím více se hodnota korelačního koeficientu snižuje od jedničky k nule, tím více jsou body rozptýlené kolem proložené regresní přímky. Na obr. č. 9 je znázorněna situace, kdy korelační koeficient poklesl na hodnotu 0,93.

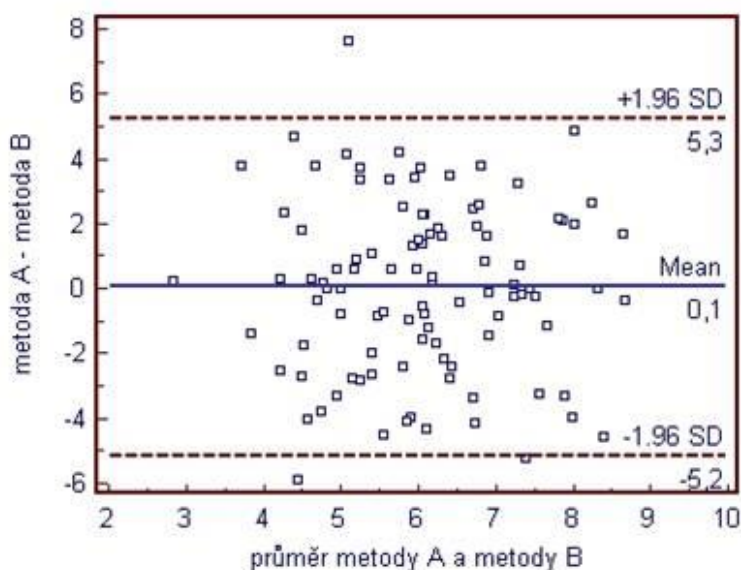


Obr. č. 9 Regresní závislost s korelačním koeficientem = 0,93 [odkaz Racek a kol....]

Pokud je hodnota korelačního koeficientu nižší než cca 0,6 - 0,7, hodnotí se to jako nepřítomnost závislosti, tj. náhodný shluk bodů.

Bland Altmanův rozdílový graf

Regrese podle Passing-Babloka se obvykle doplňuje Bland Altmanovým rozdílovým grafem (viz obr. č. 10).



Obr. č. 10 Bland Altmanův rozdílový graf

Na osu y se vynáší rozdíl mezi výsledky získanými metodou A a výsledky získanými metodou B.

Na osu x se potom vynáší průměr výsledků získaných metodou A a metodou B. Graf dále obsahuje horizontální přímkou znázorňující průměrný rozdíl (Mean) a další dvě vodorovné přímkou zachycující úroveň $+1,96SD$ a $-1,96SD$ (SD = směrodatná odchylka).

Graf lze jednoduše vyhodnotit. Pokud je nula na ose y uvnitř intervalu $+1,96SD$ a $-1,96SD$ lze konstatovat, že mezi metodami A a B není významný rozdíl.

9.2. Analytické vlastnosti a biologická variabilita

Stačí nám znalost analytických vlastností metody (preciznost, pravdivost,...) k tomu abychom mohli prohlásit, že metoda je klinicky použitelná (přínosná)? Bohužel ne, k tomu je ještě zapotřebí znalost biologických variabilit (přirozeného kolísání) stanovovaných analytů. Údaje o nich jsou dostupné v literatuře, např. na webové stránce Westgaard. com. Proč je nutné zahrnout do hodnocení klinické použitelnosti biologické variability? Je to z toho důvodu, že variability různých analytů jsou velmi rozdílné. Např. variability (kolísání) pH nebo iontů v krvi jsou velmi malé, organismus si tvrdě hlídá jejich stabilitu. Pro stanovení pH proto potřebujeme velmi precizní a citlivou metodu schopnou zachytit kolísání pH v setinách. Na druhé straně hladina glukózy v krvi kolísá velmi výrazně a proto stačí metoda s menší precizností a citlivostí.

Rozlišují se:

Biologická variabilita intraindividuální (bv_i)(rozptyl u jednoho člověka v čase). Vyjadřuje se jako variační koeficient VC_i .

Například hladina glukózy v krvi kolísá u každého člověka během dne v závislosti na příjmu potravy, tj. zda konzumuje zeleninu nebo navštíví cukrárnu.

Biologická variabilita interindividuální (bv_m)(rozptyl mezi jednotlivými lidmi v populaci). Vyjadřuje se jako variační koeficient VC_m .

Například v závislosti na genetice a na životním stylu má jeden člověk hladinu cholesterolu v krvi 2,5 mmol/l (aktivní sportovec se správnou životosprávou), zatímco jiný má hladinu 10,4 mmol/l (je prakticky bez pohybu a neustále se cpe vajíčky a tučným masem).

Biologická variabilita celková (bv_c) se vypočítá jako odmocnina ze součtu čtverců variačních koeficientů intra a interindividuální variability.

Pro to, aby byla daná metoda klinicky použitelná musí platit dva jednoduché axiomy:

1) Preciznost metody (vyjádřena jako variační koeficient analytický VC_a) musí být menší než polovina variačního koeficientu intraindividuální variability VC_i . $VC_a < 0,5 VC_i$

2) Pravdivost metody (vyjádřená jako bias) musí být menší než čtvrtina celkové biologické variability.

$\text{Bias} < 0,25 \text{ bv.}$

9.3. Kritická difference

Kritická difference ($CD = \text{critical difference}$) je nejmenší klinicky významná změna mezi dvěma po sobě jdoucími výsledky u téhož pacienta. Hodnocení vývoje po sobě jdoucích výsledků je jedna z nejčastějších činností ošetřujících lékařů, dnes a denně sledují vývoj výsledků u ošetřovaného pacienta. Pro tento termín se používají i další synonyma, jako nejmenší významná změna ($LSC = \text{least significance change}$) nebo referenční změna hodnoty ($RCV = \text{reference change values}$).

Například jeden den se u pacienta naměřila hodnota glukózy v krvi 7 mmol/l. Další den se měření zopakovalo a výsledek byl 8 mmol/l. Hodnotící lékař musí rozhodnout, zda změna hladiny z 7 na 8 mmol/l je klinicky významná a on musí terapeuticky zasáhnout, nebo zda se jedná jen o projev přirozené biologické variability. Zkušený lékař se často rozhoduje intuitivně na základě zkušeností.

Kritickou diferencí lze ale exaktně vypočítat z analytické preciznosti metody (variační koeficient VC_s), pravdivosti (bias) a intraindividuální biologické variability (variační koeficient VC_i).

Pro výše uvedený příklad vyjde $CD = 17,5\%$. Výpočtem $\pm 17,5\%$ ze 7 mmol/l se určí, že pokud bude další výsledek v intervalu od 5,8 do 8,2 mmol/l nebude překročena CD. Změna výsledku uvedená v příkladu, tj. ze 7 na 8 mmol/l proto není významná a není nutné terapeuticky zasahovat.

10. Vývoj názvů

Názvy a termíny používané v metrologii nejsou neměnné, ale čas od času se mění.

Popsaný a v současné době plošně rozšířený a odbornou veřejností akceptovaný popis měření založený na pojmech preciznost a pravdivost neumožňuje charakterizovat celkovou chybu měření jedním pojmem. Proto metrologové v polovině devadesátých let zavedli pojem nejistota. Ta v sobě vlastně zahrnuje preciznost i pravdivost tím, že určuje interval, ve kterém se důvodně může vyskytovat výsledek měření při použití dané analytické metody.

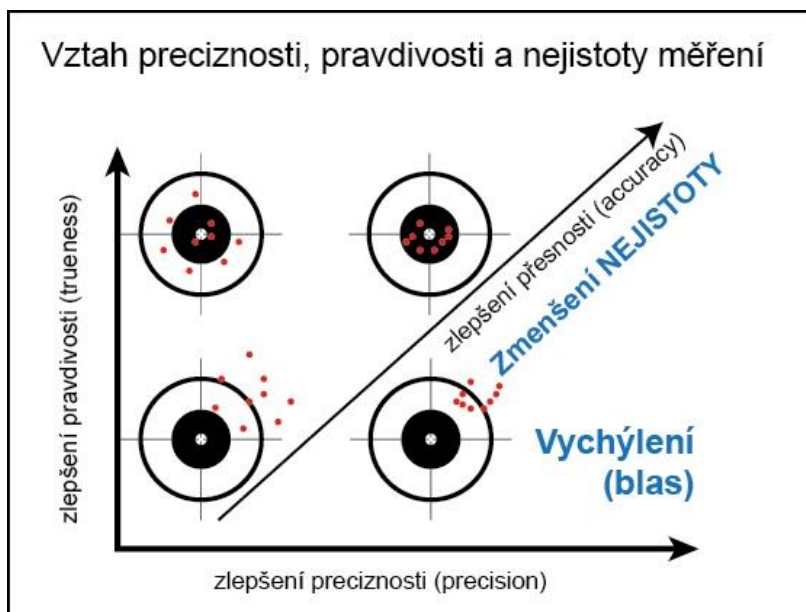
Další důvod k vývoji názvů v metrologii vychází z toho, že původně byla metrologie soustředěná především na oblast strojírenství (dodržování a mezinárodní synchronizace rozměrů různých výrobků, např. šroubů - s cílem aby spolu byly kompatibilní šrouby vyrobené

v jedné zemi s maticemi vyrobenými v jiné zemi.

S tím souvisí problém s překladem anglického termínu určeného pro strojírenství do českého termínu pro analytickou chemii.

Od roku 2009, kdy vyšla nová verze mezinárodního metrologického slovníku (TNI 010115:2009 Mezinárodní metrologický slovník - Základní a všeobecné pojmy a přidružené termíny (VIM)) se v odborné veřejnosti postupně realizují následující navržené změny: Termín přesnost (anglický ekvivalent **precision**) by měl být nahrazen termínem **preciznost**. Termín **pravdivost** (anglický ekvivalent **trueness**) zůstává beze změny. Termín správnost (anglický ekvivalent **accuracy**) by měl být nyní překládán jako **přesnost**.

Když se zlepšují pravdivost (trueness) i preciznost (precision), zlepšuje se i přesnost (accuracy) a tím se zmenšuje nejistota měření.



Metrologové stále hledají, optimalizují a diskutují popis měření. Některá navržená úprava či termín se v praxi ujme, některý návrh se do trvalé praxe vůbec nedostane. Čas ukáže, jak to dopadne s posledními navrženými změnami.

11. Závěr

Problematika analytických vlastností metody úzce souvisí s dalšími tématy jako jsou:

- Principy kontroly kvality - viz například důležité termíny **regulační grafy**, **verifikace metod**, **validace metod**, **interní kontrola kvality (IKK)**, **mezilaboratorní kontrola kvality (EHK)**, aj.
- Klinické vlastnosti metody - viz například **kritická difference**, **referenční meze**, **rozhodovací limity**, aj.

Všechna uvedená témata je třeba chápat jako nedělitelný celek, který se promítá do každého laboratorního výsledku vydávaného klinickou laboratoří.

Jak citovat tento kurz

Ing. Václav Senft: Analytické vlastnosti metody 2017. CEVA [online] 7. únor 2018 , poslední aktualizace 7. únor 2018 [cit. *doplňte aktuální datum*]. Dostupný z WWW: <https://www.ceva-edu.cz/course/view.php?id=404>. ISSN 1803-8999.