

Doporučení k výpočtu nejistot kvantitativních výsledků měření v klinických laboratořích

Datum vydání: 11.11.2014

Obsah

1. Úvod	1
2. Pojem nejistoty	1
3. Vyjadřování nejistoty výsledku měření	2
4. Aplikace nejistoty výsledku měření při jeho interpretaci	2
5. Nejistota výsledku výpočtu	3
6. Frekvence zjišťování nejistot	3
7. Kolik zdrojů nejistot zjišťovat a v jakém rozsahu?	3
8. Počet platných číslic a zaokrouhlování	4
9. Problém zaokrouhlování a nulové nejistoty	4
10. Problém bias (vychýlení)	4
11. Praktické postupy pro výpočty nejistot	5
11.1. Postup č. 1: Jediná dílčí nejistota – mezilehlá preciznost měření (MPM)	5
11.2. Postup č. 2: Kombinace mezilehlé preciznosti měření a měření vzorku se známým obsahem, bias je zanedbatelný	6
11.3. Postup č. 3: Kombinace mezilehlé preciznosti měření a měření vzorku se známým obsahem, bias však není zanedbatelný	7
11.3.1. Bias je zahrnut jako další složka kombinované nejistoty	8
11.3.2. Bias je sloučen s kombinovanou rozšířenou nejistotou (doporučeno v EHK)	9
11.3.3. Bias je přičten ke kombinované nejistotě s respektováním znaménka	9
12. Závěrečné shrnutí	10
13. Seznam zkratk	10
14. Literatura	10

1. Úvod

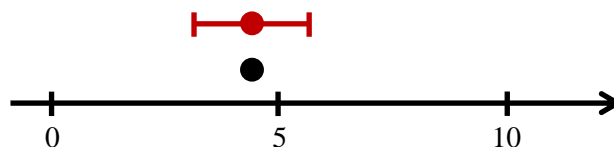
Tento text si klade za cíl poskytnout pracovníkům klinických laboratoří praktický, jednoduchý a přehledný návod k výpočtu nejistoty kvantitativních výsledků měření, a to v nejstručnější možné podobě. Nechce a nemůže být vyčerpávajícím pojednáním o problematice nejistot výsledků (obsáhlý výklad je k dispozici např. v [1], [2] nebo [7]) a je zaměřen na praktické potřeby dané zejména požadavky normy ISO 15189 [3].

2. Pojem nejistoty

Nejistota je parametr přidružený ke každému výsledku měření, který vyjadřuje omezené možnosti (teoretické i praktické) procesu měření. Absolutně přesný výsledek měření (tj. výsledek s nulovou nejistotou) neexistuje. V souladu s definicí nejistoty dle VIM [4] ("*Nejistota je nezáporný parametr charakterizující rozptýlení hodnot veličiny přiřazených k měřené veličině na základě použité informace.*") přítomnost nejistoty znamená, že výsledek měření není bod (jedna hodnota), ale interval (oblast, ve které se výsledek měření nachází s určitou pravděpodobností), jak ukazuje následující obrázek:

Správná představa: Výsledek se nachází v nějakém intervalu s určitou pravděpodobností.

Nesprávná představa: Výsledek je bod.



Obecně platí, že nejistota výsledku (viz úsečka okolo bodu výše) se skládá z několika částí. Můžeme si to představit tak, že proces měření se skládá z celé řady kroků, z nichž každý přispívá k nejistotě výsledku měření určitým dílem – dílčí nejistotou. Proto se nejistota výsledku měření označuje jako kombinovaná nejistota, protože je kombinací řady dílčích nejistot.

Nejistota je vždy přiřazena k výsledku měření (nikoli k metodě, systému apod.).

3. Vyjadřování nejistoty výsledku měření

Standardní nejistota (označuje se **u**), kterou určitá část měřicího procesu přispívá k celkové nejistotě výsledku, je nejistota vyjádřená ve formě směrodatné odchylky (SD). Takto jsou vyjadřovány jednotlivé dílčí nejistoty.

Kombinovaná nejistota (označuje se **u_c**) se vypočte z dílčích nejistot pomocí vzorce, který popisuje šíření (propagaci) nejistot a v nejjednodušším případě aditivního charakteru příspěvků se redukuje na vztah:

$$u_c = \sqrt{u_1^2 + u_2^2 + \dots + u_n^2} \quad (1)$$

kde jsou: u_1 až u_n ... dílčí nejistoty

Rozšířená kombinovaná nejistota (označuje se **U_c**) se vypočte dle vztahu:

$$U_c = k \cdot u_c \quad (2)$$

kde je: k ... koeficient rozšíření

Obvykle se používá hodnota $k = 2$, což odpovídá přibližně 95% intervalu spolehlivosti pro normální rozdělení (pro úplnost: $k = 1$ odpovídá přibližně 68% a $k = 3$ odpovídá přibližně 99%).

Pokud je tedy výsledek měření doprovázen údajem o rozšířené kombinované nejistotě, znamená to, že výsledek se s pravděpodobností 95 % nachází v příslušném intervalu.

Pokud označíme „skutečnou a pravdivou“ hodnotu **X**, výsledek našeho měření **x** a rozšířenou kombinovanou nejistotu našeho výsledku měření označíme **U_c**, pak můžeme výsledek měření zapsat v této podobě: $X = x \pm U_c$

Tento zápis znamená, že skutečná hodnota **X** leží s 95% pravděpodobností v intervalu:

$$\langle x - U_c; x + U_c \rangle, \text{ jinými slovy: } x - U_c \leq X \leq x + U_c$$

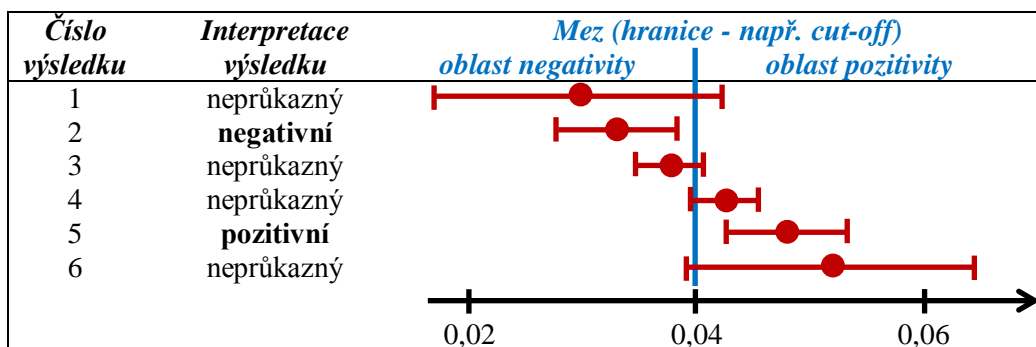
<p>Výsledek měření CRP v krevním séru je vyjádřen takto: 30,0 mg/l ($U_c = 10\%$) nebo 30,0 mg/l ($U_c = 3,0$ mg/l)</p> <p>To znamená, že koncentrace CRP ve vzorku se s pravděpodobností 95 % nachází v intervalu 27 až 33 mg/l. Grafické zobrazení tohoto výsledku je následující:</p> <div style="text-align: center; margin: 10px 0;"> </div> <p>Ekvivalentní zápis pro takový výsledek může vypadat takto: $(30,0 \pm 3,0)$ mg/l (dle [2]). Pak je ale nutné uvést slovy, že „uvedená nejistota je vypočtena s použitím koeficientu rozšíření 2“.</p>	Příklad 1
--	-----------

Nejistotu je možné vyjádřit jako absolutní (v jednotce měření), nebo jako relativní (v %). Pokud je to vhodné, lze tyto nejistoty odlišit i použitou zkratkou ($U_{c,abs}$ resp. $U_{c,rel}$). Upozorňujeme v této souvislosti na záludnost vydávání výsledků měření v % (což sice není vhodné, ale v praxi se tak běžně děje) – zde není možné odlišit absolutní a relativní nejistotu pouhým pohledem na jednotku, a proto je třeba zvolený typ nejistoty jasně specifikovat.

4. Aplikace nejistoty výsledku měření při jeho interpretaci

Je naprosto běžné, že výsledky měření, získané v klinických laboratořích, jsou s něčím srovnávány, např. s výsledkem stejné zkoušky z předchozího dne, s referenčním intervalem, s cut-off apod. Pokud porovnáváme (interpretujeme) výsledek měření s nějakou hraniční hodnotou (např. s cut-off nebo s jednou z mezí referenčního intervalu), měli bychom pamatovat na to, že součástí výsledku je i jeho nejistota.

Následující obrázek ukazuje, že interpretace výsledku závisí nejenom na výsledku samotném, ale také na jeho nejistotě. Z 6 zobrazených výsledků, které jsou uspořádány od nejmenšího k největšímu, je jen jeden negativní (č. 2) a jeden pozitivní (č. 5). Ostatní jsou neprůkazné (všimněte si, že v kontextu nejistotního přístupu je označení *hraniční* nevhodné – tyto výsledky vůbec nemusí ležet „na hranici“).



Je zřejmé, že v případě ignorování existence nejistot by byly výsledky 1 až 3 negativní a zbylé 3 pozitivní. V tomto příkladu zanedbáváme to, že i mez (hranice) má určitou nejistotu (pak to není „čára“ ale „proužek“) – podrobnější výklad naleznete v případě zájmu v [5].

5. Nejistota výsledku výpočtu

V řadě případů jsou výsledky měření dále zpracovávány, např. násobeny konstantou, vzájemně děleny apod. Je tedy na místě otázka, jak se nejistota výsledku měření promítá do výsledku takového aritmetického výpočtu. Základní postupy ukazuje následující tabulka, kde A a B jsou výsledky měření, $U_{A,abs}$ a $U_{B,abs}$ jsou jejich rozšířené kombinované nejistoty vyjádřené absolutně (v jednotce měření) a $U_{A,rel}$ a $U_{B,rel}$ jsou jejich rozšířené kombinované nejistoty vyjádřené relativně (v %). C je výsledek příslušné matematické operace a $U_{C,abs}$ je rozšířená kombinovaná nejistota tohoto výsledku vyjádřená absolutně a $U_{C,rel}$ je jeho rozšířená kombinovaná relativní nejistota.

Operace s výsledky	Výpočet nejistoty	Poznámka
$C = k \cdot A$	$U_{C,abs} = k \cdot U_{A,abs}$ $U_{C,rel} = U_{A,rel}$	Násobení konstantou k.
$C = A + B$ $C = A - B$	$U_{C,abs} = \sqrt{U_{A,abs}^2 + U_{B,abs}^2}$	Pozor! Počítá se s absolutními nejistotami!
$C = A \cdot B$ $C = A/B$	$U_{C,rel} = \sqrt{U_{A,rel}^2 + U_{B,rel}^2}$	Pozor! Počítá se s relativními nejistotami!

Poznámka: Se standardními (nerozšířenými) nejistotami se pracuje úplně stejně. V jednom vztahu (výpočtu) ale není možné kombinovat rozšířené a nerozšířené nejistoty – vždy je třeba pracovat s jedním typem nejistot.

6. Frekvence zjišťování nejistot

Situace v rutinních laboratořích je zcela odlišná od situace v kalibračních nebo dokonce referenčních laboratořích. V těch je běžné, že každý vydávaný výsledek je doprovázen nejistotou, která byla vypočtena právě pro tento jeden konkrétní výsledek měření.

Naproti tomu v prostředí rutinních laboratoří produkují výkonné automatizované měřicí systémy tisíce výsledků denně a nejistoty nejsou vypočítávány individuálně pro každý jednotlivý výsledek. Rozumná praxe je taková, že laboratoř provede výpočet nejistoty výsledku měření na svém systému a předpokládá, že výsledky získané na daném systému za srovnatelných podmínek mají přibližně stejnou nejistotu jako ty, které byly naměřeny v rámci úvodního experimentu. Takto odhadnuté nejistoty jsou pak v pravidelných intervalech (např. 1x ročně) nebo při významných změnách v měřicím systému verifikovány.

7. Kolik zdrojů nejistot zjišťovat a v jakém rozsahu?

S výše uvedeným úzce souvisí otázka, zda pro jednu zkoušku (laboratorní vyšetření) experimentálně stanovit jednu nebo více nejistot (např. na více hladinách). Nelze jistě bez důkazu očekávat, že nejistota výsledků měření bude konstantní v celém měřicím rozsahu. Proto lze obecně doporučit výpočet nejistoty alespoň ve 3 oblastech měřicího rozsahu: poblíž meze stanovitelnosti, ve střední části a poblíž horní meze. Samozřejmě je nutné zohlednit i skutečně měřené vzorky pacientů a hodnoty, které jsou klinicky významné (meze referenčních intervalů, hodnoty cut-off apod.) a nejistotu určit i v těchto důležitých bodech. Nemá však smysl určovat nejistoty v oblastech, ve kterých se výsledky patientských vzorků prakticky nevyskytují, i když je měření možné provést.

Dílejší složkou nejistoty, kterou zjišťujeme vždy, je mezilehlá preciznost měření (podrobně viz kapitola 11.1). Pokud provedeme stanovení mezilehlé preciznosti měření (MPM) pro h různých vzorků, získáme pro ně relativní nejistoty $u_{MPM1,rel}$, $u_{MPM2,rel}$, ... $u_{MPMh,rel}$, které nejsou ničím jiným, než variačními koeficienty jednotlivých množin výsledků ($u_{MPM1,rel} = CV_1$ atd.). Pokud mají tyto nejistoty podobnou velikost, můžeme provést výpočet jedné průměrné nejistoty pro celý měřicí rozsah:

$$CV_{MPM} = u_{MPM,rel} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^h CV_i^2}{h}} \quad (3)$$

kde je: h ... počet měřených vzorků (hladin)

Dále již namísto CV_1 až CV_h pracujeme s průměrnou hodnotou CV_{MPM} a získáme tak jednu nejistotu pro celý měřicí rozsah.

8. Počet platných číslic a zaokrouhlování

Jen zcela výjimečně najdeme v klinické laboratoři situaci, kdy bychom museli nejistotu vyjádřit na více než 2 platné číslice. Proto doporučujeme uvádět absolutní i relativní nejistoty **na 2 platné číslice**.

Výsledek měření je vhodné zaokrouhlit tak, aby byl v souladu s nejistotou.

Výsledek měření fibrinogenu:		Příklad 2
	2,82 g/l ($U_c = 0,23$ g/l)	
nebo	2,82 g/l ($U_c = 8,2$ %)	
nebo	(2,82 ± 0,23) g/l	

Poznámka: Mezi platné číslice se počítají všechny číslice zaokrouhleného čísla kromě nul, které stojí před první nenulovou číslicí a nul na konci čísla, které vznikly zaokrouhlením.

9. Problém zaokrouhlování a nulové nejistoty

Existují měřicí systémy, které vydávají výsledky měření zaokrouhlené (např. na 2 platné číslice), což obvykle téměř dokonale maskuje přítomnost náhodných chyb. V takovém případě může např. série 20 měření, jejichž výsledky vyjdou identické, vést k mylnému závěru, že výsledky měření mají nulovou nejistotu. Jde o stav, kdy stupnice (display) přístroje neumožňuje zaznamenat data, která by mohla být použita pro výpočet nejistoty (zdání nulové nejistoty je tedy důsledkem nedostatku informací). V takovém případě je třeba převzít údaj o nejistotě z dokumentace výrobce, a pokud takový údaj chybí, odhadnout nejistotu jako 1 dílek stupnice přístroje (podrobně viz [1]).

Při výpočtech vždy zaokrouhľujte až konečný výsledek, nikoli dílčí výsledky, které získáváte v průběhu výpočtu.

10. Problém bias (vychýlení)

Řada prací, které se zabývají problematikou nejistot výsledků měření, existenci bias vůbec nepředpokládá a nepracuje s ním. Očekává se totiž, že bias bude zcela eliminován nebo zmenšen na zanedbatelnou velikost provedením řádné kalibrace (resp. že jsou eliminovány všechny známé signifikantní systematické vlivy – viz např. [1], odstavec 3.2.4). V klinických laboratořích bohužel není mnoho zkoušek, u kterých by existoval nepřerušovaný řetězec metrologické návaznosti a bylo možné zjistit bias přímo měřením certifikovaného referenčního materiálu. Ale i tam, kde reference existuje, je možné často pozorovat bias i přesto, že kalibrace byla řádně provedena. Tento bias se navíc může v čase měnit v závislosti na použitých šaržích kalibrátorů a souprav. Pokud se přidržíme původních zásad metrologie, pak bias může být vždy identifikován a eliminován a při výpočtu nejistoty výsledku se tak bias nemusíme zabývat a soustředíme se pouze na náhodné chyby. Tento přístup však bohužel v klinických laboratořích často selhává a představuje velkou překážku pro aplikaci základních metrologických principů v klinických laboratořích. **Nekorigovaný/významný bias** však bezpochyby ovlivňuje „kvalitu“ výsledku a nelze jej proto při konstrukci nejistoty výsledku pominout, byť se jedná o „nenáhodnou“ složku.

Bias se vždy zjišťuje měřením vzorku o známém obsahu/koncentraci za podmínek MPM. Obecně lze říci, že **bias je nevýznamný** (tzn. že jej při výpočtu nejistoty můžeme zanedbat) na 95% hladině spolehlivosti tehdy, pokud platí (podrobně viz [11]):

$$|b_{abs}| \leq 2 \sqrt{u_{ref,abs}^2 + u_{xp,abs}^2} \quad (4)$$

kde je: b_{abs} ... bias vyjádřený v jednotce měření (viz rovnice 13)

$u_{ref,abs}$... standardní nejistota hodnoty vzorku o známém obsahu

$u_{xp,abs}$... standardní nejistota průměru výsledků měření vzorku o známém obsahu (dle vztahu (11))

Bias je možné zanedbat i tehdy, pokud je mnohem menší než nejistota vypočtená z mezilehlé preciznosti (je-li například bias menší než třetina mezilehlé preciznosti měření, pak ke kombinované nejistotě přispívá méně než 5 % a je tedy obvykle možné jej zanedbat).

11. Praktické postupy pro výpočty nejistot

V následujících odstavcích naleznete praktické postupy výpočtu nejistoty, které začínají od nejjednoduššího, tj. zahrnujícího nejméně dílčích nejistot. Je třeba si uvědomit, že čím méně dílčích nejistot zahrneme do výpočtu kombinované nejistoty, tím menší (tj. optimističtější, líbivější) nejistotu dostaneme. Paradoxně tedy stav, kdy výpočtu bylo věnováno nejméně úsilí, vede k lépe vypadajícím nejistotám – vždy je v kompetenci odpovědného pracovníka aby zvážil, které dílčí nejistoty je nutné, vhodné a možné do výpočtu zahrnout.

Z praktického hlediska je rovněž vhodné mít na paměti, že nejistota určená některým z dále uvedených postupů je většinou podhodnocena, protože do výpočtu prováděného v laboratoři se některé dílčí nejistoty z praktických důvodů nezahrnují (např. dílčí nejistoty preanalytické fáze – vliv odběru, doby a teploty transportu aj.).

Nejistoty vypočtené postupy uvedenými v následujících kapitolách se z pohledu příslušné laboratoře stávají odhady nejistot, které přisoudí svým výsledkům měření až do provedení následné verifikace nejistot (viz kapitola 6). Proto se často mluví o „odhadech nejistot“ – laboratoř nevypočítává nejistotu každého vydávaného výsledku (výsledek se vydává na podkladě jednoho měření) a nejistota, kterou pro daný výsledek laboratoř uvádí, je odhadem založeným na některém z dále uvedených postupů.

11.1. Postup č. 1: Jediná dílčí nejistota – mezilehlá preciznost měření (MPM)

Kdy tento postup použít: Když nemáme k dispozici žádné referenční materiály ani jiné materiály s ověřenými vztažnými hodnotami (např. komerční vzorky, vzorky použité v systému EHK). Tudiž nemůžeme určit bias.

Vzorky: V takovéto situaci jsou nejčastěji používány vzorky VKK (vzorky pacientů, popřípadě komerční vzorky). Matrice takového vzorku musí být shodná nebo se maximálně blížit matici rutinních vzorků.

Postup: Provedeme alespoň 15 opakovaných měření jednoho vzorku za podmínek mezilehlé preciznosti – sem patří zejména: stejný postup měření, stejné místo a opakování měření na stejném objektu v rozšířeném časovém úseku, v ideálním případě i s vystřídáním obsluhy. Ve výjimečných případech lze provést i méně měření (krátká stabilita vzorku, velmi vysoká cena stanovení), nikdy však méně než 10. Důležitý je rozšířený časový úsek – rozhodně se nejedná o opakovatelnost, tj. měření v sérii! Časový úsek měření je vhodné volit podle stability měřeného vzorku a vlastností měřicího systému (alespoň hodiny, optimálně dny). Podmínky měření by měly odpovídat rutinnímu provozu laboratoře.

Z výsledků měření vypočteme aritmetický průměr (x_{MPM}):

$$x_{MPM} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (5)$$

kde je: n ... počet výsledků
 x_i ... jednotlivé výsledky měření

Výběrovou směrodatnou odchylku (SD_{MPM}):

$$SD_{MPM} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - x_{MPM})^2} \quad (6)$$

A variační koeficient (CV_{MPM}):

$$CV_{MPM} = 100 \cdot \frac{SD_{MPM}}{x_{MPM}} \quad [\%] \quad (7)$$

Protože již nemáme žádné další dílčí složky, které bychom do kombinované nejistoty zahrnuli, spočteme nejistotu výsledku velmi jednoduše:

$$u_{c,abs} = u_{MPM,abs} = SD_{MPM} \quad (8)$$

a

$$u_{c,rel} = u_{MPM,rel} = CV_{MPM} \quad [\%] \quad (9)$$

Samozřejmě lze diskutovat o tom, zda takto spočtenou nejistotu lze označit jako kombinovanou – z praktického hlediska se však jedná o akademickou debatu.

<p><i>Tento příklad dokumentuje praktické a překvapivé výsledky měření počtu leukocytů v krvi v oblasti meze stanovitelnosti (výrobce systému udává mez stanovitelnosti $0,01 \cdot 10^9/l$). Výsledky naměřené u vzorku pacienta s nízkým počtem leukocytů, který byl opakovaně měřen 12x s rozestupem přibližně 7 minut mezi jednotlivými měřeními, jsou následující:</i></p>												
Měření	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Výsledek	0,051	0,069	0,093	0,076	0,097	0,079	0,114	0,116	0,098	0,102	0,102	0,122
Dle výše uvedených vztahů (5) až (7) dostáváme:							$x_{MPM} = 0,093 \cdot 10^9/l$ $SD_{MPM} = 0,021 \cdot 10^9/l$ $CV_{MPM} = 23 \%$					
Odtud již snadno dle (8) a (9) získáme nejistotu:							$u_{c,abs} = 0,021 \cdot 10^9/l$ $u_{c,rel} = 22,5 \%$					
Vynásobením koeficientem rozšíření dle (2) dostaneme rozšířenou nejistotu:									$U_{c,abs} = 0,042 \cdot 10^9/l$ $U_{c,rel} = 45 \%$			
<p><i>Jde o názornou ukázkou toho, že v krajních oblastech měřicího rozsahu může být nejistota překvapivě vysoká (několikanásobek nejistoty výsledků v oblasti referenčního intervalu).</i></p>												

Příklad 3

11.2. Postup č. 2: Kombinace mezilehlé preciznosti měření a měření vzorku se známým obsahem, bias je zanedbatelný

Kdy tento postup použít: Když máme k dispozici materiály s ověřenými vztažnými hodnotami (např. komerční vzorky vybavené potřebnými údaji, vzorky použité v systému EHK, CRM). Předpokladem použití tohoto postupu je zanedbatelný bias (viz kapitola *Problém bias (vychýlení)* na straně 4).

Vzorky: Pro určení bias jsou nejčastěji používány komerční vzorky vybavené potřebnou dokumentací (hodnoty obsahu včetně nejistot) nebo vzorky, které prošly nějakým cyklem EHK (poskytovatelé EHK mají zveřejňovat i údaje o nejistotách vztažných hodnot). Matrice takového vzorku by měla být shodná nebo se maximálně blížit matici rutinních vzorků. Výhodou bývá řádově lepší stabilita těchto vzorků (ve srovnání s patientskými), nevýhodou je, že matrice vzorku je jen výjimečně shodná s nativními vzorky pacientů.

Postup: Vzorek, který použijeme pro určení bias (studie vychýlení), měříme za podmínek opakovatelnosti. Výsledná relativní kombinovaná nejistota ($u_{c,rel}$) se bude skládat ze 3 složek – dílčích relativních nejistot – takto:

$$u_{c,rel} = \sqrt{u_{MPM,rel}^2 + u_{ref,rel}^2 + u_{x_p,rel}^2} \quad [\%] \quad (10)$$

kde je: $u_{MPM,rel}$... nejistota vypočtená z mezilehlé preciznosti měření (viz výše v kapitole 11.1)
 $u_{ref,rel}$... nejistota obsahu/koncentrace použitého vzorku se známým obsahem
 $u_{x_p,rel}$... nejistota průměru měření (x_p) vzorku se známým obsahem

Nejistotu hodnoty obsahu/koncentrace použitého vzorku ($u_{ref,rel}$) získáme z protokolu, který jsme spolu s tímto vzorkem obdrželi (např. certifikát v případě CRM, atest u ostatních komerčních vzorků, validační protokol nebo odpovídající statistické údaje pro vzorky EHK).

Relativní nejistotu průměru ($u_{x_p,rel}$) vypočteme z absolutní nejistoty průměru výsledků měření ($u_{x_p,abs}$) vzorku o známém obsahu/koncentraci dle vztahu:

$$u_{x_p,abs} = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

$$u_{x_p,rel} = 100 \cdot \frac{u_{x_p,abs}}{x_p} \quad [\%] \quad (11)$$

kde je: x_p ... aritmetický průměr spočtený dle (5)
 SD ... výběrová směrodatná odchylka spočtená dle (6)
 n ... počet měření

Měření koncentrace glukózy v krevním séru. Pro výpočet dílčí nejistoty příslušející mezilehlé preciznosti měření (MPM) byly použity 2 vzorky z VKK. Každý vzorek byl měřen 15x za podmínek mezilehlé preciznosti a z výsledků měření byly spočteny následující údaje (dle vztahů 5, 6 a 7):

průměry $x_{MPM1} = 4,23 \text{ mmol/l}$ $x_{MPM2} = 8,26 \text{ mmol/l}$
 variační koeficienty $CV_{MPM1} = 3,0 \%$ $CV_{MPM2} = 2,8 \%$

V dalším výpočtu bude použita průměrná hodnota $u_{MPM,rel}$ vypočítaná ze vztahu (3):

$$u_{MPM,rel} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^h CV_i^2}{h}} = \sqrt{\frac{3,0^2 + 2,8^2}{2}} = 2,90 \%$$

Pro výpočet bias byl použit vzorek ze systému EHK. Poskytovatel EHK v dokumentaci uvádí tyto údaje:

vztažná hodnota: $c_{ref} = 5,359 \text{ mmol/l}$ rozšířená nejistota ($k = 2$): $U_{ref} = 0,054 \text{ mmol/l}$

Odtud vypočítáme relativní nerozšířenou nejistotu vztažné hodnoty:

$$u_{ref,rel} = 100 \cdot \frac{U_{ref}}{2 \cdot c_{ref}} = 0,504 \%$$

Vzorek EHK byl v laboratoři proměřen a z výsledků měření byly dle (5), (6) a (11) spočteny následující údaje:

$x_p = 5,40 \text{ mmol/l}$ $SD = 0,19 \text{ mmol/l}$ $n = 10$ $u_{xp,rel} = 1,11 \%$

Ověříme, zda bias (b) můžeme zanedbat dosažením údajů vyjádřených v mmol/l do vztahu (4):

$$0,041 \leq 2 \sqrt{0,027^2 + \left(\frac{0,19}{\sqrt{10}}\right)^2}$$

$$0,041 \leq 0,132 \quad \text{bias tedy lze zanedbat}$$

Po dosažení těchto dílčích nejistot do vztahu (10) dostáváme kombinovanou relativní nejistotu:

$$u_{c,rel} = \sqrt{2,90^2 + 0,504^2 + 1,11^2} = 3,14 \%$$

Vynásobením koeficientem rozšíření dle (2) dostaneme rozšířenou nejistotu: $U_{c,rel} = 6,3 \%$

11.3. Postup č. 3: Kombinace mezilehlé preciznosti měření a měření vzorku se známým obsahem, bias však není zanedbatelný

Přítomnost (nekorigovatelného) bias můžeme označit za jedno z podstatných úskalí aplikace metrologických principů v klinických laboratořích. Jedná se o známý a široce diskutovaný problém. Pokud jde o řešení – tj. zohlednění přítomnosti bias ve výsledku (který je uveden včetně nejistoty) vydaném laboratoří, existuje řada doporučení a přístupů, z nichž některé uvádíme v následujících kapitolách. Podrobnější informace najdete např. v [6], [7], [8], [10], [12].

Výchozí podmínky pro použití následujících postupů jsou stejné jako v kapitole 11.2 a jediný rozdíl spočívá v tom, že bias není zanedbatelný (není korigován, viz kapitola *Problém bias (vychýlení)* na straně 4).

Základní úvaha, která nás nutí bias do nejistoty výsledku zapracovat, je následující:

Mějme výsledek měření x , který je doprovázen kombinovanou rozšířenou nejistotou U_c . Potom v souladu s obecným konceptem nejistot očekáváme, že skutečný výsledek se s 95% pravděpodobností nachází v intervalu $x \pm U_c$. Pokud však je výsledek zatížen významným nekorigovaným bias, který není zohledněn v nejistotě, pak se skutečný výsledek v uvedeném intervalu téměř jistě nenachází, resp. nachází se v něm s úplně jinou pravděpodobností. Někteří autoři ve snaze eliminovat paradigma „nejistota X nekorigovaný bias“ dokonce doporučují uvádět bias jako další součást výsledku (tedy uvádět: výsledek měření, bias a nejistotu, která nezahrnuje bias) a ponechat na příjemci výsledku (klinikovi), aby si tyto informace „přebral“. Tento postup považujeme za naprosto nevhodný, zejména pro klinické laboratoře (samostatné údaje o velikosti bias i nejistoty bez zahrnutého bias musí mít laboratoř k dispozici pro své interní potřeby).

Práce [6] uvádí 3 pragmatické a dobře použitelné postupy pro začlenění nekorigovaného bias do rozšířené nejistoty výsledku měření:

1.	Bias je zahrnut jako další složka kombinované nejistoty	viz kapitola 11.3.1
2.	Bias je sloučen s kombinovanou rozšířenou nejistotou	viz kapitola 11.3.2
3.	Bias je přičten ke kombinované nejistotě s respektováním znaménka	viz kapitola 11.3.3

Následující kapitoly ukazují praktické použití každého z nich.

Všechny 3 postupy mají společný první krok: Nejprve vypočítáme nejistotu výsledku měření dle vztahu (10), tedy postupem, který je popsán v kapitole 11.2 (tj. jako by byl bias zanedbatelný, i když víme, že není – do nejistoty jej zatím nijak nepromítáme) – takto získanou nejistotu níže označujeme $u_{(bez\ bias),rel}$, tedy:

$$u_{(bez\ bias),rel} = \sqrt{u_{MPM,rel}^2 + u_{ref,rel}^2 + u_{x_p,rel}^2} \quad [\%] \quad (12)$$

kde je: viz popis u rovnice (10)

Dále vypočítáme absolutní bias (b_{abs}) a relativní bias (b_{rel} , vyjádřený v %) z výsledků měření vzorku o známém obsahu/koncentraci dle následujícího vztahu:

$$b_{abs} = x_p - c_{ref}$$

$$b_{rel} = 100 \cdot \frac{b_{abs}}{c_{ref}} \quad [\%] \quad (13)$$

kde je: x_p ... aritmetický průměr výsledků měření vzorku o známém obsahu/koncentraci
 c_{ref} ... hodnota obsahu/koncentrace v měřeném vzorku (deklarovaná v certifikátu, atestu)

11.3.1. Bias je zahrnut jako další složka kombinované nejistoty

Při tomto postupu zahrneme bias do rozpočtu nejistot jako další složku kombinované nejistoty (v originální práci [6] je tento postup označován root-sum-of-squares (RSSu)). Pokud výsledek měření zapíšeme obvyklým způsobem jako:

$$X = x \pm U_{RSSu}$$

pak kombinovanou rozšířenou U_{RSSu} spočteme takto:

$$U_{RSSu} = U_{c,rel} = k \cdot \sqrt{u_{(bez\ bias),rel}^2 + b_{rel}^2} \quad (14)$$

kde je: k ... koeficient rozšíření dle (2)
 $u_{(bez\ bias),rel}$... nejistota bez zahrnutého bias dle (12)
 b_{rel} ... relativní bias dle (13)

Tento postup se shoduje s postupem, který byl uveden v doporučení k určení odhadu nejistot z roku 2005. Výhodou tohoto postupu je skutečnost, že nejistota zůstává symetrická, což samozřejmě podstatně zjednodušuje její uvádění a interpretaci. Na druhé straně bias vždy představuje vychýlení pouze na jednu stranu a oboustranné rozšíření nejistoty je tudíž neefektivní, navíc je při výpočtu rozšířené nejistoty i příspěvek bias násoben koeficientem rozšíření.

*Použijeme zadání příkladu 4 (viz kapitola 11.2), které modifikujeme takto:
Vzorek EHK byl v laboratoři proměřen a z výsledků měření byly dle (5), (6) a (11) spočteny následující údaje:*

$x_p = 5,53 \text{ mmol/l}$ $SD = 0,19 \text{ mmol/l}$ $n = 10$ $u_{x_p,rel} = 1,09 \%$

Ověříme, zda bias (b) můžeme zanedbat dosazením údajů vyjádřených v mmol/l do vztahu (4):

$$0,171 \leq 2 \sqrt{0,027^2 + \left(\frac{0,19}{\sqrt{10}}\right)^2}$$

výše uvedený vztah neplatí, protože:
 $0,171 > 0,132$ *bias tedy nelze zanedbat*

Proto vypočítáme relativní bias (b_{rel}) dle vztahu (13):

$$b_{rel} = 100 \cdot \frac{x_p - c_{ref}}{c_{ref}} = 100 \cdot \frac{5,53 - 5,359}{5,359} = 3,19 \%$$

Po dosazení všech dílčích nejistot do vztahu (14) dostáváme (pozor, počítáme přímo rozšířenou relativní nejistotu):

$$U_{RSSu} = U_{c,rel} = 2 \cdot \sqrt{2,90^2 + 0,504^2 + 1,09^2 + 3,19^2} = 9,0 \%$$

Příklad 5

11.3.2. Bias je sloučen s kombinovanou rozšířenou nejistotou (doporučeno v EHK)

Při tomto postupu zahrneme bias do rozpočtu nejistot tak, že jej sloučíme s rozšířenou kombinovanou nejistotou $u_{(bez\ bias),rel}$ (v originální práci [6] je tento postup označován RSSU). Pokud výsledek měření zapíšeme obvyklým způsobem jako:

$$X = x \pm U_{RSSU}$$

pak kombinovanou rozšířenou U_{RSSU} spočteme takto:

$$U_{RSSU} = U_{c,rel} = \sqrt{(k \cdot u_{(bez\ bias),rel})^2 + b_{rel}^2} \quad (15)$$

Výhodou tohoto postupu je skutečnost, že nejistota zůstává symetrická, což samozřejmě podstatně zjednodušuje její uvádění a interpretaci. V porovnání s postupem z kapitoly 11.3.1 je zde eliminováno násobení příspěvku bias koeficientem rozšíření a díky tomu je výsledná nejistota menší. Je však třeba poznamenat, že takto modifikovaný nejistotní interval pokrývá skutečnou hodnotu měření s nižší pravděpodobností než předpokládaných 95 %, i když je širší než interval vymezený rozšířenou nejistotou $\pm 2 \cdot u_{(bez\ bias),rel}$ (je-li vychýlení větší než $2 \cdot u_{(bez\ bias),rel}$, klesá pokrytí pod 80 %).

Tento postup doporučujeme používat pro výpočet nejistot, které uvádějí účastníci EHK.

<p>Použijeme zadání příkladu 5 (viz kapitola 11.3.1), které ponecháváme zcela beze změn, pouze provedeme výpočet dle nového postupu.</p> <p>Po dosazení všech dílčích nejistot do vztahu (15) dostáváme (pozor, počítáme přímo rozšířenou relativní nejistotu):</p> $U_{RSSU} = U_{c,rel} = \sqrt{(2 \cdot \sqrt{2,90^2 + 0,504^2 + 1,09^2})^2 + 3,19^2} = 7,0 \%$	Příklad 6
--	-----------

11.3.3. Bias je přičten ke kombinované nejistotě s respektováním znaménka

Nejistota (nejistotní interval) se vždy skládá ze dvou částí: horní (leží nad výsledkem měření), dále v textu ji značíme U_+ , a dolní (leží pod výsledkem měření), dále značené U_- . Pokud jsou obě části stejné, tj. $U_+ = U_- = U$, je tento interval rozložen symetricky kolem výsledku měření.

Při tomto postupu, který byl navržen v [6], se zjištěný bias přičítá k rozšířené nejistotě s respektováním znaménka dle následujících pravidel:

$$\begin{aligned} \text{„horní“ část nejistoty } U_+ &= \begin{cases} k \cdot u_{(bez\ bias)} - b & \text{je-li } k \cdot u_{(bez\ bias)} - b > 0 \\ 0 & k \cdot u_{(bez\ bias)} - b \leq 0 \end{cases} \\ \text{„dolní“ část nejistoty } U_- &= \begin{cases} k \cdot u_{(bez\ bias)} + b & \text{je-li } k \cdot u_{(bez\ bias)} + b > 0 \\ 0 & k \cdot u_{(bez\ bias)} + b \leq 0 \end{cases} \end{aligned} \quad (16)$$

kde je: k ... koeficient rozšíření dle (2)

$u_{(bez\ bias)}$... nejistota (absolutní nebo relativní) bez zahrnutého bias dle (12)

b ... bias (absolutní nebo relativní) dle (13)

Není možné kombinovat např. absolutně vyjádřenou nejistotu s relativním bias – vždy je nutné počítat buď s absolutním, nebo s relativním vyjádřením všech složek.

Výsledek měření pak vyjádříme jako: $X = x \begin{cases} +U_+ \\ -U_- \end{cases}$

Nevýhodou tohoto postupu je to, že výsledná nejistota je asymetrická, což komplikuje vyjádření výsledku, který je touto nejistotou doprovázen. Takto vyjádřená nejistota má ale bezpochyby realističtější tvar a oba předešlé modely překonává. Její praktické použití však vzhledem ke komplikovanosti zápisu výsledku nepovažujeme za vhodné pro rutinní použití v klinických laboratořích, avšak může být užitečná např. při validacích nebo porovnávání metod nebo srovnávání výsledku se stanovenou mezí/hranicí (viz kapitola 4).

<p>Použijeme zadání příkladu 5 (viz kapitola 11.3.1), které ponecháváme zcela beze změn, pouze provedeme výpočet dle nového postupu.</p> <p>Po dosazení dílčích nejistot do vztahů (16) dostáváme (pozor, počítáme přímo rozšířenou relativní nejistotu):</p> $U_+ = 2 \cdot 3,14 - 3,2 = 3,1 \%$ $U_- = 2 \cdot 3,14 + 3,2 = 9,5 \%$ <p>Rozšířená kombinovaná nejistota výsledku U_c je tedy asymetrická -9,5 % až +3,1 %.</p>	Příklad 7
--	-----------

12. Závěrečné shrnutí

Výpočet nejistoty bude v klinické laboratoři nejčastěji probíhat:

- Dle kapitoly 11.1 (nejjednodušší případ, nemáme vzorky s dokumentovanou vztažnou hodnotou).
- Dle kapitoly 11.2 (známe bias, který je zanedbatelný).
- Dle kapitoly 11.3.2 (známe bias, který není zanedbatelný).

Výsledkem výpočtu by vždy měla být kombinovaná rozšířená nejistota výsledku měření, která má být uváděna a používána při interpretaci tohoto výsledku (viz kapitola 4).

Posouzení, zda je nejistota výsledku měření „přijatelně velká“ vždy závisí na zamýšleném způsobu použití tohoto výsledku. Obecný přehled o nejistotách výsledků (numericky, tj. jejich skutečné velikosti v laboratořích) lze získat například v závěrečných zprávách programů EHK, ve kterých účastníci uvádějí nejistoty svých výsledků.

Aplikace v EHK: Je-li rozšířená kombinovaná nejistota (U_c) výsledku měření rovna D_{max} , pak má účastník 95% šanci, že pro konkrétní vzorek získá očekávaný výsledek a v cyklu, kde jsou použity 2 vzorky má přibližně 90% šanci na úspěch v dané zkoušce systému EHK (musí uspět u obou vzorků). Je-li $U_c < D_{max}$, pak šance na úspěch samozřejmě roste.

13. Seznam zkratk

Symbole a zkratky použité ve vzorcích jsou vždy vysvětleny přímo u příslušných vzorců.

CRM	Certifikovaný referenční materiál
CV	Variační koeficient (viz rovnice (6))
D_{max}	Přijatelný rozdíl v procentech (kritérium používané pro hodnocení výsledků v EHK)
EHK	Externí hodnocení kvality
k	Koeficient rozšíření (viz rovnice (2))
MPM	Mezilehlá preciznost měření (viz kapitola 11.1)
SD	Směrodatná (standardní) odchylka (viz rovnice (5))
U	Rozšířená nejistota (obecný symbol)
U_c	Rozšířená kombinovaná nejistota
$U_{c,rel}$	Rozšířená kombinovaná nejistota – relativní (v %)
$U_{c,abs}$	Rozšířená kombinovaná nejistota – absolutní (v jednotce měření)
u	Standardní (tj. nerozšířená) nejistota (obecný symbol, obvyklé označení dílčích nejistot) – možné indexy a jejich význam jsou shodné s výše uvedenou rozšířenou nejistotou
\bar{x}_{MPM}	Průměr výsledků měření získaných za podmínek mezilehlé preciznosti (viz rovnice (4))
\bar{x}_p	Průměr měření vzorku o známém obsahu/koncentraci (výpočet je shodný se vztahem (4))

14. Literatura

- 1 Guide for the expression of uncertainty in measurement. ISO Geneva 1993. (Reprinted 1995: Reissued as ISO Guide 98-3 (2008)).
Český překlad: TNI 01 4109-3 Nejistoty měření - Část 3: Pokyn pro vyjádření nejistoty měření (GUM:1995) (Pokyn ISO/IEC 98-3).
- 2 Stanovení nejistoty analytického měření. Kvalimetrie 19. (Pokyn Eurachem/CITAC Guide 2012). Eurachem ČR 2014.
- 3 ČSN EN ISO 15189 ed. 2 Zdravotnické laboratoře - Požadavky na kvalitu a způsobilost.
- 4 TNI 01 0115:2009 Mezinárodní metrologický slovník – Základní a všeobecné pojmy a přidružené termíny (VIM).
- 5 ILAC-G8:03/2009 - Guidelines on the Reporting of Compliance with Specification
- 6 Phillips S D, Eberhardt K R, and Parry B.: Guidelines for Expressing the Uncertainty of Measurement Results Containing Uncorrected Bias, J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol. 102, 577 (1997).
- 7 CLSI C51A. Expression of Measurement Uncertainty in Laboratory Medicine. CLSI, Wayne, PA 2012.
- 8 Webová adresa: www.westgard.com
- 9 Použití informací o nejistotě k posuzování shody. Kvalimetrie 15. (Pokyn Eurachem/CITAC Guide 2007). Eurachem 2008.

- 10 Synek V.: Attempts to include uncorrected bias in the measurement uncertainty, Talanta 65, 829-837 (2005).
- 11 EURACHEM-ČR: Metodický list 3 - Porovnání výsledků s certifikovanou hodnotou CRM, 2007. Dostupné na: www.eurachem.cz/publikace.php
- 12 Magnusson B, Ellison SLR.: Treatment of uncorrected bias in uncertainty estimation for chemical measurements. Anal,Bioanal.Chem. 390, 201 – 213 (2008).

Zpracovali (abecedně):

Ing. Vladimír Bartoš, Ph.D.
 Ing. Marek Budina
 RNDr. Bedřich Friedecký, Ph.D.
 RNDr. Josef Kratochvíla
 Ing. Drahomíra Springer, Ph.D.
 Doc. RNDr. Kristian Šafarčík, Ph.D.

Recenzenti (abecedně):

Supervizoři programů EHK:

Doc. MUDr. Pavel Adam, CSc.
 Doc. RNDr. Ctirad Andrýs, Ph.D.
 MUDr. Alena Buliková, Ph.D.
 RNDr. Luděk Dohnal
 RNDr. Marcela Drahošová
 Prim. MUDr. Pavel Fabian, Ph.D.
 RNDr. Ingrid Hrachovinová, Ph.D.
 RNDr. Ing. Petr Kelbich
 Prim. MUDr. Petr Kessler
 MUDr. Petr Kocna, CSc.
 RNDr. Vlastimil Král, CSc.
 MUDr. Petr Kubáč
 RNDr. Ivo Lochman, CSc.
 RNDr. Gustav Louženský
 Doc. MUDr. Daniel Lysák, Ph.D.
 Prof. MUDr. Vladimír Maisnar, Ph.D., MBA
 PharmDr. Eva Malířová
 MUDr. Helena Marečková, CSc.
 Mgr. Jan Martinek
 MUDr. Miloslava Matýšková, CSc.
 MUDr. Dana Mikulenková
 MUDr. Rudolf Nenutil, CSc.
 Ing. Dalibor Novotný, Ph.D.
 Prof. MUDr. Vladimír Palička, CSc.
 Doc. RNDr. Miroslav Pecka, CSc.
 MUDr. Martin Písačka
 RNDr. Jitka Pohořská
 RNDr. Ivana Půtová
 Prof. MUDr. Aleš Ryška, Ph.D.
 Doc. MUDr. Petr Schneiderka, CSc.
 Ing. Věra Spěváčková, CSc.
 Ing. Ivana Stiborová, Ph.D.
 Ing. Jana Špírková
 Ing. Luděk Šprongl
 MUDr. Ivan Šubrt
 Ing. Jaroslava Vávrová, Ph.D.
 Prof. MUDr. Jiří Vencovský, DrSc.
 PharmDr. Doris Vokurková, Ph.D.
 Prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc., MBA

Ústav anorganické chemie AV ČR:
 Doc. Ing. Zbyněk Plzák, CSc.