

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

Ambrožová J.<sup>1</sup>, Kratochvíla J.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> OKB-H Nemocnice Prachatice, a.s

<sup>2</sup> SEKK Pardubice

Autoři sdělení „**Preciznost a bias metod měření dle EP15-A3**“, jehož cílem od počátku bylo a je jediné - 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, neb nebylo v jejich silách posunout věci tak, aby tomu byl logicky a smysluplně bylo přesně naopak... Velká řada neblahých problémů valila se totiž na ně ze strany jisté redakční rady, přičemž tím největším se jevil fakt, že navzdory pozitivní vůli všech zainteresovaných, vydavatel odborného časopisu, v němž je již potvrzeno vydání článku, supplementa do svého časopisu fakticky nekládá, navzdory tomu, že je po autorech, jako se stalo i v tomto případě, vyžaduje. Ti nemnozí, kteří se těší, že si oba texty, jak spolu úzce souvisí, dají do potřebné logické souvislosti, tak budou muset učinit s jistým časovým zpožděním, čili řečeno slovy klasika - paušálně výhledově. Ale naděje na to, že se tak letos podaří, snad ještě zcela nevyhasla...

Byl tedy či nebyl, ale spíš byl v lednu 2016 dvěma autory sepsán článek „**Preciznost a bias metod měření dle EP15-A3**“ a toto je jeho **Supplementum**:

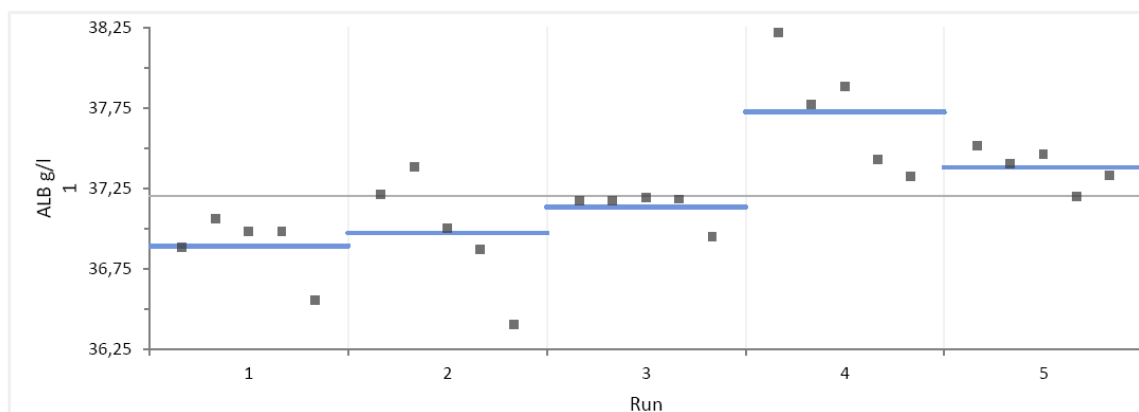
Tabulka č. 1 uvádí záznam souboru naměřených dat v experimentu prováděném v designu 5x5 dle doporučení CLSI EP15-A3 na příkladu stanovení hmotnostní koncentrace albuminu. Tabulka je doprovázena grafickým zpracováním a popisem provedeným doplňkem Analyse-it (verze 4. 51) MS Excel, obrázek č. 2.

**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	<b>37,220</b>
SD						<b>0,389</b>
						<b>Status</b>
Grubbs test: 37,22 +/- G *0,389				<u>38,439</u>		<b>OK</b>
G= 3,135				<u>36,000</u>		<b>OK</b>

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

## 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

### 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 mezi-sériovou (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:

**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 Variator	SS	DF	MS	F	P	F crit
Between-run MS1	2,288816	4	<b>0,5722</b>	8,5106345	0,00035	2,8660814
Within-run MS2	1,34468	20	<b>0,06723</b>			

Následné mezi-výpočty 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  $V_B = 0$ , jinak:

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

kde  $V_B$  znamená „čistou“ mezi-sériovou 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:  $CV_R(\%) = S_R \cdot 100/\bar{x}$  a  $CV_{WL}(\%) = S_{WL} \cdot 100/\bar{x}$ ,

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  $\rho$  („rho“), což je podíl výrobcem požadované WL ( $\sigma_W$ ) a R ( $\sigma_R$ )

odpovídajících hodnotě  $\bar{x}$  průměru v testu naměřených koncentrací daného vzorku následovně:

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

Hodnota  $p$  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:

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

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 mezi-výsledků 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.

**Tab. 4 Albumin example: Calculated output for UVLs calculation**

	PI LL 1	% CV	PI HL 2	% CV
Mean value g/l	27		41	
<b>Repeatability (R)</b>				
$\sigma_R$ 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
<b>Within laboratory precision (WL)</b>				
$\sigma_{WL}$ g/l	0,4	0,6	0,6	1,5
$p$	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

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.

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

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

H0:  $\sigma \leq \sigma_0$

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

H1:  $\sigma > \sigma_0$

The imprecision is greater than the expected imprecision.

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

#### X<sup>2</sup> test

	SD	Expected SD	X <sup>2</sup> 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	$\sigma_{\text{Error}}^2 + 5\sigma_{\text{Run}}^2$
Error	1,345	20	0,067	$\sigma_{\text{Error}}^2$

## Kroky výpočtu odhadů bias a jejich hodnocení

Nechť 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 vzorce použitých viz text výše a níže)

$$df_c = \frac{\left( se_x^2 + se_{RM}^2 \right)}{\frac{se_x^4}{df_x} + \frac{se_{RM}^4}{df_{RM}}} \quad (8)$$

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

4. verifikační interval (**VI**), který s 95% pravděpodobností zahrnuje pravdivý rozdíl **b**. Tento výpočet se děje násobením kombinované standardní chyby **se<sub>c</sub>** „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<sub>c</sub>**

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

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

**Bias (C. Ricos 2014)**  
1,43%

**Trueness**

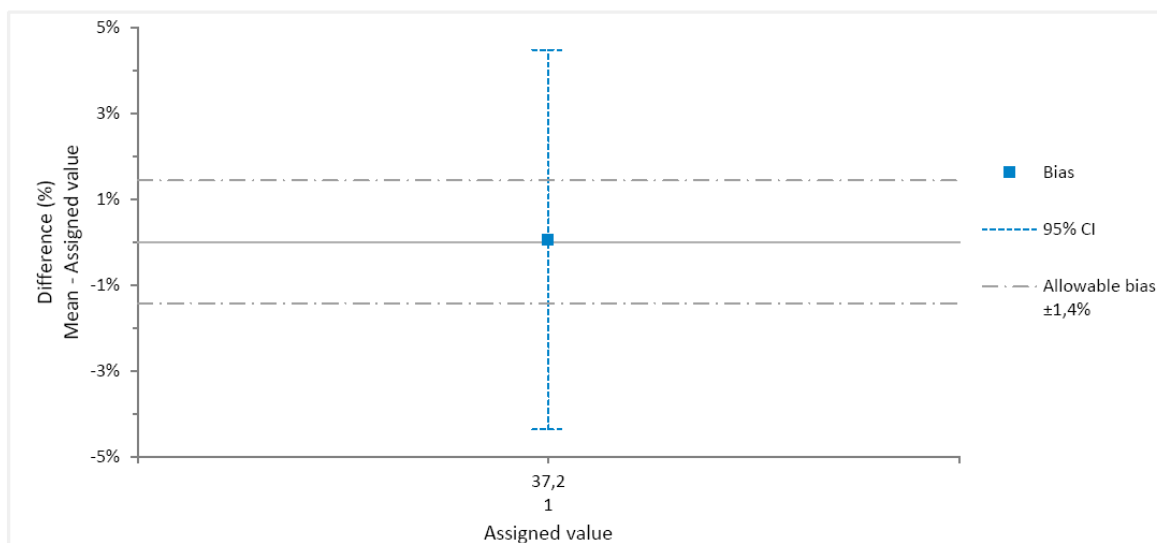
1.	$se_x = \sqrt{\frac{1}{nRun} \left[ s_{WL}^2 - \left( \frac{nRe p - 1}{nRe p} \right) s_R^2 \right]}$	0,151 g/l		
2.	$se_{RM} = U/k$	0,60 g/l	U	k
			1,2	2
3.	$se_c = \sqrt{se_x^2 + se_{RM}^2}$	0,62 g/l		
4.	$\tau = se_{RM} / se_x$	3,966		
5.	$df_x = nRun - 1$	4,00	nRun	5
6.	$df_c = df_x \cdot (se_c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

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:  $\bar{x} - TV$  (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 této odhadu bias poskytovaný software MSA Analyse-it jsou uvedeny na obrázku č. 6, který se týká téhož příkladu stanovení albuminu.

**Figure 6 Albumin example: Trueness by MSA Analyse-it**

## 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 <sup>1</sup>

H0:  $\delta = 0$

The bias is equal to 0.

H1:  $\delta \neq 0$

The bias is not equal to 0.

<sup>1</sup> 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

Případné konkrétní dotazy k vlastnímu postupu je možné konzultovat na adrese:  
[ambrozova@nempt.cz](mailto:ambrozova@nempt.cz)

prim. MUDr. Jaroslava Ambrožová  
 OKB-H Nemocnice Prachatice, a.s.  
 Nebahovská 1015  
 PRACHATICE  
 38301  
 Tel.: 388 600 403; 724 379 722; 602 148 746