

Statistika a chemometrie v klinické biochemii

(S jakými aplikacemi statistiky pracujeme v laboratoři klinické biochemie nejčastěji?)

P. Breinek

PF_statistika a chemometrie 2011

1

Kvalita (jakost)

• Definice kvality je orientována na splnění požadavků zákazníka (ordinujícího lékaře)

- Normy řízení kvality
- ISO 17025
- ISO 15189

Tři základní procesy:

Validace a verifikace
Návaznost
Nejistota

4

Oblasti, ve kterých nejčastěji používáme v klinické biochemii statistické a chemometrické postupy

- Vnitřní (interní) a externí kontrola kvality (IKK a EHK)
- Verifikace a validace metod
- Zavádění nových metod
 - analytických znaků metody
 - referenční hodnoty/intervaly a rozhodovací kritéria (cut-off)
 - pravděpodobnost určení diagnózy pomocí laboratorního testu (klinická sensitivita a specifita, ROC, ...)
 - srovnání metod
 - kritéria IKK

2

Akreditace, certifikace, audit

■ **AKREDITACE** = oficiální uznání, že laboratoř je způsobilá provádět zkoušky (norma ISO 17025 a ISO 15189)

Akreditační orgán v ČR: ČIA, Český institut pro akreditaci

- **CERTIFIKACE** neboli ověření fungování vybudovaného systému řízení (ISO 9001)
- **Audit I a II** (NASKL, Národní autorizační středisko klinických laboratoří ČLS JEP)

5

Systémy vnitřní a externí kontroly kvality



- Často vnímáme kvalitu subjektivně
- **Kvalitu musíme prokazovat** (požadavek plátců zdravotní péče = ZP)
- Požadavky na kvalitu se mění
- Chyby nevznikají jen v laboratoři

3

Další informace



- www.cskb.cz
- www.sekk.cz

6

Vnitřní kontrola kvality (IKK)

Postupy uplatňované pracovníky laboratoře s cílem získat co největší míru pravděpodobnosti, že vydávané výsledky jsou maximálně věrohodné

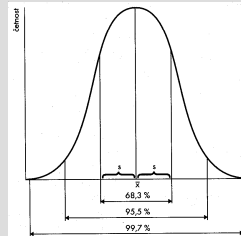
Vyšetřovaný vzorek analyzujeme 1x výjimečně 2x (dvojmo).

7

Přesnost

Přesnost je statistickým vyhodnocením náhodných chyb

- Je to míra shody mezi výsledky získanými opakovanou analýzou téhož vzorku za předem stanovených podmínek



Výsledky opakovaných analýz jsou rovnoměrně rozptýleny kolem průměrné hodnoty, přičemž četnost jednotlivých výsledků vykazuje normální rozložení (Gaussovo rozložení)

10

Je kontrolována/sledována

- Přesnost měření (nyní: **mezilehlá přesnost**) **náhodné chyby**
- Pravdivost měření (správnost) (nyní: **vychýlení/ bias**) **systematická chyba**
- Cílová **nejistota** měření TMU (Target Measurement Uncertainty)

8

Průměr, s, VK (CV)

- Mírou rozptylu výsledků (s^2) je **směrodatná odchylka (s, SD)**
- Je vyjadřována ve stejných jednotkách jako měřená veličina
- Čím je menší, tím je vyšší přesnost

Aritmetický průměr (\bar{x})

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

kde x_i je jednotlivý výsledek a n je počet měření

Směrodatná odchylka (s)

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^n x_i)^2}{n}}{n-1}}$$

11

Detekce laboratorních chyb

- Vnitřní kontrola kvality (IKK)**
 - Software - řídicí jednotka analyzátorů
 - LIS
 - externí programy
- Externí hodnocení kvality (EHK)**
 - Detekce bias
 - Srovnání s jinými laboratořemi

9

- Směrodatná odchylka (s, SD) závisí na měřené hodnotě, proto se obvykle uvádí jako **relativní směrodatná odchylka, tzv. variační koeficient (CV%)**

Přesnost (variační koeficient) (VK)

$$VK = \frac{s}{\bar{x}} (\times 100)$$

(po přenásobení 100 je výsledek v %)

12

Výpočty: mezilehlá přesnost

3.1. Aritmetický průměr (AM)

$$AM = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

kde:
AM je aritmetický průměr
 x_i je jednotlivý nezávislý výsledek měření kontrolního vzorku
n je počet k výpočtu použitých měření

3.2. Směrodatná odchylka (SD)

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - AM)^2}{n - 1}}$$

kde:
SD je směrodatná odchylka reprodukovatelnosti
 x_i je jednotlivý nezávislý výsledek měření kontrolního vzorku
AM je aritmetický průměr
n je počet k výpočtu použitých měření

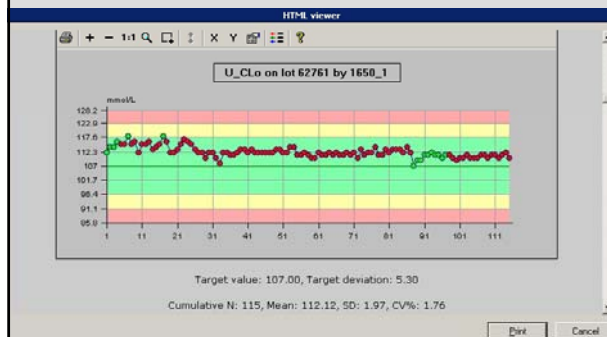
3.3. Variační koeficient (CV)

$$CV = 100 \cdot \frac{SD}{AM} \quad [\%]$$

kde:
CV je variační koeficient vyjádřený v %
SD je směrodatná odchylka
AM je aritmetický průměr

13

Regulační diagramy



Vychýlení (bias, dříve správnost)

= těsnost shody mezi průměrnou hodnotou získanou z velkého počtu výsledků měření (\bar{x}) a dohodnutou referenční hodnotou (x_0)

- Mírou pravdivosti je velikost vychýlení:
bias = $\bar{x} - x_0$ absolutní chyba
bias = $[(\bar{x} - x_0) / x_0] \cdot 100$ (%)relativní chyba
- Kladná nebo záporná hodnota

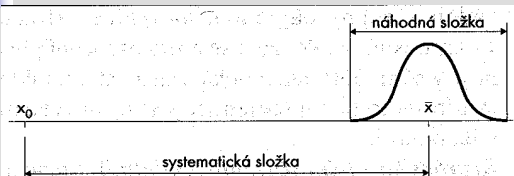
14

Stanovení požadavků na kvalitu

- Empiricky (state of art)
- Biologické variability, TE_{biol}
- Klinické požadavky
- Doporučení odborných společností
- Data výrobců IVD
- Systém six sigma (6σ)
- Celková analytická chyba, TE_a

17

Vztah mezi bias a přesností



15

Příklad: Výpočet TMU (cílové nejistoty měření) z biologické variability pro stanovení S-kreatininu

Intraindividuelní biologická variabilita	5,3	Přesnost odvozená z biologických variabilit	2,7
Interindividuální biologická variabilita	14,2	Bias odvozený z biologických variabilit	3,8
celková biologická variabilita	15,2	Celková chyba odvozená z biologických variabilit	8,2
www.vestgard.com		Teoretická TMU(%)	8,2

18

Volba kontrolních materiálů

- s návazností
- jedna šarže
- stabilita
- nejlépe v kapalně formě
- atesty s ohledem na měřené hodnoty

19

- rychlost: (nejčastěji 100 - 2 000 analýz/ h
- objemy: analyzovaných vzorků 1 - 30 ul
reakční směsi 80 - 300 ul
- mycí stanice (kyvety,dávkovače, míchadla)
- řídicí jednotka (PC)
- speciální software
- odvíčkování, centrifugace, alikvotace, identifikace, uskladnění vzorků

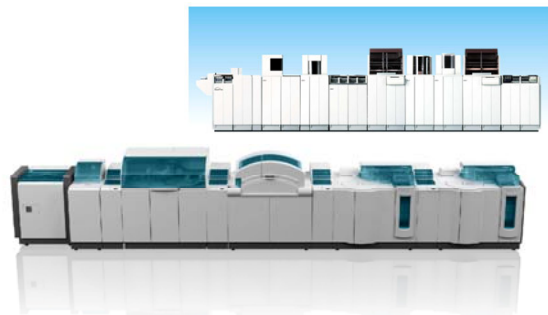
22

Frekvence

- Všechny hladiny (většinou 2) minimálně jednou za analytickou sérii, která odpovídá jedné pracovní směně. Maximální přípustná doba analytické série je 24h.
- Krevní plyny: všechny 3 hladiny denně, nejlépe vždy po 8h jedna hladina
- Imunochemie: optimem 3 hladiny denně, minimálně střídavě jedna hladina denně
- Další podmínka: vždy po výměně reagensií, po kalibraci, po upozornění kontrolního systému, servisním zásahu,.....

20

Cobas 8000 (Roche)



Automatizace v klinické biochemii

Analyzátory:

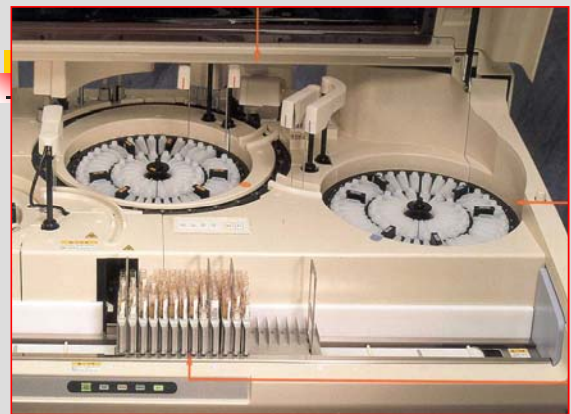
Selektivní = provádějí jen požadované analýzy

Programovatelné (řízené PC, tj. postup analýzy, údržba, výpočty, QC,...)
identifikace reagensií i vzorků čárovými kódy

Komunikace analyzátoru on-line s LIS

Možnost spojení s preanalytickými procesy

21



Rozdělení automatických analyzátorů

- **CHEMICKÉ** (homogenní analýza)
- **IMUNOCHEMICKÉ** (heterogenní analýza)
- Jiné:
CHROMATOGRAFICKÉ
MOČOVÉ
POCT

25

Organizátoři EHK

SEKK (Systém externí kontroly kvality, ČR)
DGKL (Německá společnost klinických laboratoří)
INSTAND (Německý institut standardizace)
NEQAS (Velká Británie)
atd.

28



26

Organizace EHK

- Kontrolní cykly (podle časového plánu)
- Dodání neznámých vzorků (většinou 2) s příslušnými informacemi
- Měření/stanovení (laboratorní dokumentace) počet měření musí být roven počtu měření vykonávaných u reálných vzorků pacienta, obvykle $n=1$
- Vyplnění formulářů a zaslání organizátorovi
- Organizátor vyhodnotí výsledky měření a rozešle výsledky vyhodnocení

29

Externí kontrola kvality (EHK)

- Je součástí procesu zajištění kvality měření
- Principem je provádění mezilaboratorních porovnávacích zkoušek
- Doplnuje jiné prvky zajišťování kvality (validace, verifikace, vnitřní kontrola kvality, návaznost, ...)
- Přispívá k odhadu nejistoty výsledků měření

27

Výsledky jsou srovnány s cílovými hodnotami daného analytu získanými:

- Referenčními metodami/postupy (RMP)
- Validovanými metodami v kalibračních laboratořích výrobců (AV)
- Jako průměr výsledků měření všech účastníků po vyloučení odlehlých hodnot (ALTM)
- Jako průměr měření stejnorodých skupin účastníků po vyloučení odlehlých hodnot (ConV)

30

Zprávy pro účastníka

- Vyhodnocení vlastních výsledků
- Souhrnné statistické vyhodnocení všech účastníků
- Přehled metod a postupů
- Kritéria pro posuzování výkonnosti účastníků, obvykle formou tolerančních rozmezí s cílovými nejistotami měření
- Kontakty na odborné poradce (supervizory)

31

Certifikát (srovnatelnosti a návaznosti)

vydává se pro analyty vybrané Českou společností klinické biochemie (ČSKB) a Referenční laboratoří pro klinickou biochemii (RL), platnost certifikátu 1 rok

■ Osvědčení o účasti

vydává se pro analyty, které splnily podmínky pro přidělení osvědčení o účasti

34

Souhrnná statistika

Souhrnná statistika (stejněradé metodické skupiny)

Legenda:
 Osvědčení cílových hodnot (TV)
 RMP = Reference Method Procedure (referenční hodnota)
 AV = Assigned Value (stanovena v expertních laboratořích)
 ALTM = All Laboratory Trimmed Mean (průměr všech výsledků s vyloučením odlišných hodnot)
 CV = Consensus Value (průměr skupiny)
 MAM = Modifikovaný aritmetický průměr
 SD = Standardní odchylka
 CV = Variace koeficient [%]
 n = počet výsledků
 % = % kvantil

LL = Lower Limit (dolní mez)
 UL = Upper Limit (horní mez)

Grafické symboly:
 = Interval aprvnosti s vyznačenou TV
 = Interval 10% až 84% kvantil
 = Mediant (50% kvantil)

Draselný kation	[mmol/l]	RMP	LL	UL	n	MAM	SD	CV	10%	50%	84%	
Vzorek A												
Všechny výsledky	4,14	3,81	4,47	196	4,86	0,896	2,32	3,95	4,88	4,18		3,88
(1) Plamenová emis. fot.	4,14	3,81	4,47	20	4,82	0,894	2,24	3,9	4	4,1		
(2) ISE s heřlením	4,14	3,81	4,47	116	4,84	0,876	1,87	3,95	4,88	4,12		
(3) ISE bez heřlení	4,14	3,81	4,47	56	4,12	0,11	2,87	3,99	4,1	4,27		
Ostatní	4,14	3,81	4,47	4	4					4,81		
Vzorek B												
Všechny výsledky	5,81	4,61	5,42	195	4,95	0,89	1,82	4,83	4,95	5,87		4,17
(1) Plamenová emis. fot.	5,81	4,61	5,42	20	4,95	0,881	1,64	4,81	4,96	5,81		
(2) ISE s heřlením	5,81	4,61	5,42	116	4,93	0,877	1,26	4,82	4,9	5		
(3) ISE bez heřlení	5,81	4,61	5,42	56	5,81	0,227	2,24	4,83	5	5,19		
Ostatní	5,81	4,61	5,42	4	4,81					4,93		

32

Jak řešit neúspěch

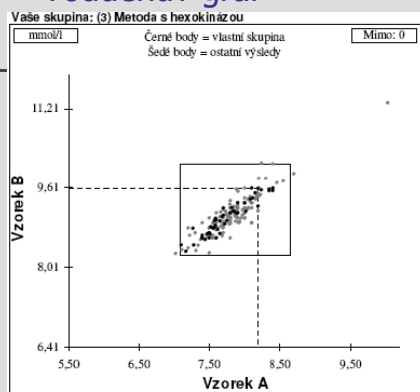
- Prozkoumat možné příčiny
- Provést Záznam o neshodě a přijmout nápravná opatření

- Je možné požádat o konzultaci supervizora, RL, regionální odborníky, představitele Výboru ČSKB

- Zúčastnit se dalšího kontrolního cyklu

35

Youdenův graf



33

Zavádění a výběr nových metod

- Od 7.12.2005 laboratoř smí používat pouze produkty se značkou CE (Evropská unie)
 CE = Conformité Européenne, značka evropské shody
- Výrobce zaručuje, že výrobek splňuje direktivu IVD 98/79 EC, tj. požadavky na zdravotnické prostředky in vitro
 IVD = in vitro diagnostikum
- Výrobek je validovaný a má mít metrologickou návaznost hodnot kalibrátorů a kontrolních přípravků

36

Validace a verifikace

VALIDACE

- splnění požadavků na měřicí postup s ohledem na jeho zamýšlené použití
- důkaz ve formě dokumentace, že metoda bude poskytovat výsledky odpovídající předem určené specifikaci

VERIFIKACE

- potvrzení, že laboratoř je schopná validovaný měřicí postup správně provádět

37

Co se validuje a verifikuje?

(Analytické znaky metody)

- Přesnost a vychýlení
- Pracovní rozsah/ linearita
- Citlivost (mez detekce/ stanovitelnosti)
- Interference
- Robustnost
- Porovnání s jinou metodou

Při verifikaci jen ověřujeme, že jsme v laboratoři schopni dodržovat uvedené analytické znaky metody

40

Kdo validuje a verifikuje?

Validuje:

- Výrobce diagnostik (direktiva IVD 98/79 EC)
- Případně i laboratoř (je to obtížné)

- Verifikuje:
- Laboratoř

38

Verifikační protokol

Oddělení klinických laboratoří, Vojenská nemocnice Brno					
Verifikační protokol č. 13					
Metoda:	Kreatinin (SOP č.: 013)	F-VN-04 VP 13 KREA			
Název soupravy:	KREATININ ENZYMATICKY LIQUID 204	Kat.č.:	10010231		
Výrobce:	Pilva-Lachema Diagnostika	Šarže:	125409	Exp.:	31.3.2011
Analýzátor:	Architect ci16200				
Provedl:					
Název kalibrátoru:	LYONORM KALIBRÁTOR	Kat.č.:	10003200		
Výrobce:	Pilva-Lachema Diagnostika	Šarže:	130209	Exp.:	31.10.2010
1. Mezilehlá přesnost (údaje z IKK)					
Datum (od-do)	N	Průměr	SD	CV	
Jednotky:		µmol/l	µmol/l	%	
Vzorek A	28.12.2009-30.04.2010	66	93,7	1,8	1,97
Vzorek B	28.12.2009-30.04.2010	66	367,8	4,1	1,15
Použitý materiál:					
Vzorek A:	Lyonorm HUM N, č.š.:111508, exp.:2010-02-28 (PLIVA)				
Vzorek B:	Lyonorm HUM P, č.š.:111608, exp.:2010-02-28 (PLIVA)				

41

Jak často se provádí validace a verifikace?

- Verifikace minimálně 1x ročně
- Výsledkem je verifikační protokol s odhadem nejistoty měření

39

Verifikační protokol

Oddělení klinických laboratoří, Vojenská nemocnice Brno					
Verifikační protokol č. 13					
Metoda:	Kreatinin (SOP č.: 013)	F-VN-04 VP 13 KREA			
Název soupravy:	KREATININ ENZYMATICKY LIQUID 204	Kat.č.:	10010231		
Výrobce:	Pilva-Lachema Diagnostika	Šarže:	125409	Exp.:	31.3.2011
Analýzátor:	Architect ci16200				
Provedl:					
Název kalibrátoru:	LYONORM KALIBRÁTOR	Kat.č.:	10003200		
Výrobce:	Pilva-Lachema Diagnostika	Šarže:	130209	Exp.:	31.10.2010
1. Mezilehlá přesnost (údaje z IKK)					
Datum (od-do)	N	Průměr	SD	CV	
Jednotky:		µmol/l	µmol/l	%	
Vzorek A	28.12.2009-30.04.2010	66	93,7	1,8	1,97
Vzorek B	28.12.2009-30.04.2010	66	367,8	4,1	1,15
Použitý materiál:					
Vzorek A:	Lyonorm HUM N, č.š.:111508, exp.:2010-02-28 (PLIVA)				
Vzorek B:	Lyonorm HUM P, č.š.:111608, exp.:2010-02-28 (PLIVA)				

42

2. Opakovatelnost, Bias

Provedl:				
Datum:	11.1.2009			
Použitý materiál:	Vzorek A:	Analyty krevního séra 1928 (SEKK)		
	Vzorek B:	Analyty krevního séra 2333 (SEKK)		
Výsledné hodnoty	Vzorek A	Vzorek B	Jednotky	
	1	286,4	122,9	µmol/l
	2	287,6	122,9	
	3	288,7	122,5	
	4	284,5	123,3	
	5	287,0	122,0	
	6	286,6	122,2	
	7	286,8	121,6	
	8	287,6	122,0	
	9	286,8	120,8	
10	281,7	120,4		

Nejistota (Uncertainty)

- Nejistota = kombinace náhodné a systematické chyby
- Normy řízení kvality ukládají každé laboratoři vyhodnotit nejistoty svých měření

3. Vyhodnocení

	Vzorek A	Vzorek B	Jednotky	
Průměr	286,4	122,1	µmol/l	Vzorek A
Číselná hodnota	281,7	118,3		
Nejistota ref. materiálu U _{ref}	0,79	1,01	%	2,240 (U _{ref} µmol/l)
Nejistota ref. materiálu W _{ref}	0,48	0,51	%	přepočten
SD	1,95	0,93	µmol/l	0,79 (U _{ref} %)
Nejistota SD	0,22	0,29	µmol/l	
Relativní nejistota SD W _{ref}	0,22	0,24	%	Vzorek B
CV	0,68	0,76	%	1,200 (U _{ref} µmol/l)
CV výpočet			%	přepočten
R(x)	100,9	103,2	%	1,01 (U _{ref} %)
b	0,9	3,2	%	
Nejistota kalibrátoru			%	
W _{ref} (ref.)	1,56		%	
Mezní hodnota nejistoty	15,0	www.sekk.cz	%	
Prámenec	SEKK; TMU 2010		%	
Celková relativní kompozovaná nejistota U _{rel}	1,87	3,58	%	
Průměr	2,73		%	
U _{rel tot}	3,75	7,16	%	

Výsledek verifikace: Vzorek A vyhovuje
Vzorek B vyhovuje
Metoda je vhodná pro stanovení kreatininu v krevním séru a plasmě ve vzorcích pacientů.

Schválil: _____ Dne: 20.04.2010

Příklad zjištění návaznosti

měření koncentrace P-GLUKÓZY
(dokumentace pracovního kalibrátoru)

Rutiní metoda: GOD-PAP
Referenční metoda: ID-GC/MS
Referenční materiál: NIST-SRM 965
Kalibrační hodnota: 10,4 mmol/l
Nejistota: 0,132 mmol/l (1,2%)

R(x)	100,9	103,2	%
Br	0,9	3,2	%
Nejistota kalibrátoru			%
W _{ref} (ref.)	1,56		%
Mezní hodnota nejistoty	15,0	www.sekk.cz	%
Prámenec	SEKK; TMU 2010		%
Celková relativní kompozovaná nejistota U _{rel}	1,87	3,58	%
Průměr	2,73		%
U _{rel tot}	3,75	7,16	%

Výsledek verifikace: Vzorek A vyhovuje
Vzorek B vyhovuje
Metoda je vhodná pro stanovení kreatininu v krevním séru a plasmě ve vzorcích pacientů.

Schválil: _____ Dne: 20.04.2010

intra-individuální biologická variabilita	5,3	Přesnost odvozená z biologických variabil	2,7
inter-individuální biologická variabilita	14,2	Bias odvozený z biologických variabil	3,9
celková biologická variabilita	15,2	Celková chyba odvozená z biologických variabil	8,2
www.westgard.com		Teoretická TMU(%)	8,2

Porovnání s jinou metodou

- Lineární regresní závislost
 $Y = a.X + b$
 korelační koeficient (r), rozptyl (s_{yx})
- Regresní závislost dle **Passinga-Babloka**
- Demingova** regresní závislost
- Vyhodnocení dat (!), chyba konstantní a proporcionalní, významnosti,...

Návaznost

provázání rutinních měření s referenčními metodami a referenčními materiály

- Realizace návaznosti v klinické laboratoři je velmi obtížná
- U biologických analytů je k dispozici jen asi v 10 - 20% případech referenční materiál/ referenční metoda měření

Jak ji můžeme zjistit? → rozбором dokumentace výrobce

49

Specifita

Udává procento správně negativních výsledků ze souboru zdravých.

Čím vyšší specifita, tím je méně falešně pozitivních výsledků.

$$\text{Specifita (\%)} = \frac{\text{počet správně negativních výsledků}}{\text{celkový počet zdravých}} \times 100$$

52

Další chemometrické postupy používané v klinické biochemii

- stanovení referenčních hodnot/intervalů, rozhodovacích kritérií (cut-off)
- pravděpodobnost určení diagnózy pomocí laboratorního testu (klinická sensitivita a specifita, ROC, prediktivní hodnoty,...)
- plánování experimentů
- statistické testování, multivariační analýza,...

50

Sensitivita (citlivost)

Udává procento správně pozitivních výsledků ze souboru nemocných.

Čím vyšší sensitivita, tím je méně falešně negativních výsledků.

$$\text{Sensitivita (\%)} = \frac{\text{počet správně pozitivních výsledků}}{\text{celkový počet nemocných}} \times 100$$

53

Cut-off (rozhodovací limit)

Je to koncentrační hladina markeru, pod kterou leží většina hodnot zdravých lidí.



51