



**VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-
TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE**

METROLOGICKÁ A ZKUŠEBNÍ LABORATOŘ

Akreditovaná Českým institutem pro akreditaci, č. 1316.
Laboratoř přidružená k ČMI podle CIPM MRA

Program rozvoje metrologie VIII/05/08

Rozvoj a činnost Metrologické a zkušební laboratoře VŠCHT

Vyhodnocování výsledků kvalitativních měřicích postupů
Metodická příručka

Miloslav Suchánek

srpen 2008

Obsah

1	Úvod	2
2	Terminologie	4
3	Charakteristiky měřicích postupů	8
	3.1 Typy kvalitativní analýzy	8
	3.1.1 <i>Identifikace analytu</i>	8
	3.1.2 <i>Klasifikace</i>	8
	3.2 Návaznost v kvalitativní analýze	9
	3.3. Spolehlivost v kvalitativní analýze	9
	3.4 Experimentální postupy zjišťování nespolehlivosti měřicí metody - validace kvalitativní měřicí metody	13
	3.4.1 <i>Prostředky pro validaci kvalitativní měřicí metody.</i>	13
	3.4.2 <i>Flexibilní validační protokol.</i>	13
	3.4.3 <i>Variantní experimentální postupy</i>	14
	<i>při určování spolehlivosti (nespolehlivosti)</i>	
	3.4.4 <i>Srovnání kvalitativní měřicí metody</i> <i>s konfirmatorní (referenční) metodou</i>	17
	3.4.5 <i>Robustnost kvalitativní měřicí metody</i>	18
	3.5 Mezilaboratorní testy	19
	3.6 Regulační diagramy	20
4	Literatura	21

1 Úvod

Kvalitativní analýza je úzce spojena s řešením tří hlavních otázek:

- přítomnost či nepřítomnost určité substance (analytu); tento problém je obvykle řešen jednoduchou měřicí metodou, při které je signál (odezva) transformována na binární veličinu – pozitivní či negativní hodnota
- tzv. limitní test (threshold test), při kterém je hodnota měřené veličiny srovnávána s předem určenou hraniční, limitní hodnotou (threshold value)
- přiřazení molekulové struktury či určité substance testovanému analytu

Výše naznačené problémy kvalitativní analýzy nám dovolují formulovat obecnou definici kvalitativní analýzy:

Kvalitativní analýza se zabývá klasifikací objektů podle specifických kritérií za účelem splnění dohodnutých požadavků.

Specifická kritéria jsou velice rozmanitá, např. shoda barvy objektu s testovací škálou, shoda spektrálního profilu píku s posicí a intenzitou, expertní názor, překročení kvantitativního limitu, atd. S klasifikací v kvalitativní analýze jsou rovněž spojeny různé statistické techniky, které závisí na charakteru dat či údajů. Data mohou mít charakter binární (ano/ne), mohou to být kategorizovaná data (červený, zelený, modrý; nemocný, zdravý) nebo mohou být vyjádřeny pořadově (0,1,..10). Statistické testování kvalitativních metod je neobvyklé a obtížné z toho důvodu, že se nejedná o normální rozdělení a musíme tedy používat jiných, vhodných testů.

Důležitý rozdíl mezi kvantitativní a kvalitativní analýzou je i tzv. výkonových charakteristikách (performance characteristics). Kvantitativní metody analýzy jsou charakterizovány takovými parametry, jako pravdivost, správnost, přesnost, robustnost, analytická selektivita, analytická citlivost, mez detekce (LOD), linearita, pracovní rozsah. Kvalitativní analýza používá úplně jiné výkonové charakteristiky. Nejdůležitější charakteristikou kvalitativní analýzy je indikace falešně pozitivních a negativních odezev. Této charakteristice neodpovídá žádný z parametrů, charakterizujících kvantitativní analýzu. Pouze mez detekce tvoří jakousi spojnicí obou měřících postupů.

Důležitým aspektem kvalitativních metod je skutečnost, že vždy měříme analytický signál (kvantitativní veličina) a konstruujeme „filtr“ pro převod kvantitativních údajů na kvalitativní, vyjádřené různými způsoby:

ano/ne, detekován/nedetekován, pozitivní/negativní.

Je zřejmé, že i v případě kvalitativní analýzy máme metody či postupy interního a externího řízení kvality, jako jsou regulační diagramy a

mezilaboratorní testy. Oba prvky řízení kvality a jejich posuzování musí být v souladu s postupy a pravidly, které jsou běžné pro kvantitativní měření. Výsledky mezilaboratorních postupů těchto měřících postupů také musí být vyhodnoceny a posouzeny z hlediska jejich přijetí či odmítnutí

2 Terminologie

Definujme si nejprve některé základní pojmy^{1,2}. Nechť **A** je jev, který označuje přítomnost analytu ve vzorku, $\neg A$ (non A) je jev, který označuje nepřítomnost analytu ve vzorku, **e** budiž jev, který označuje důkaz analytu ve vzorku (positivní výsledek testu). $P(A)$ je apriorní pravděpodobnost toho, že analyt je přítomen (před provedením testu!). Platí jednoduchý vztah:

$$P(A) + P(\neg A) = 1$$

P(e/A) je pravděpodobnost kladného důkazu analytu za předpokladu, že analyt je přítomen.

P($\neg e/A$) je pravděpodobnost falešně negativního výsledku (výsledek testu je negativní, i když analyt je přítomen).

P(e/ $\neg A$) je pravděpodobnost falešně pozitivního výsledku (výsledek je pozitivní, i když analyt není přítomen).

Pravděpodobnost toho, že analyt je ve vzorku přítomen po provedení testu (aposteriorní pravděpodobnost), kdy výsledek testu je kladný, **P(A/e)**, je dán Bayesovým vztahem

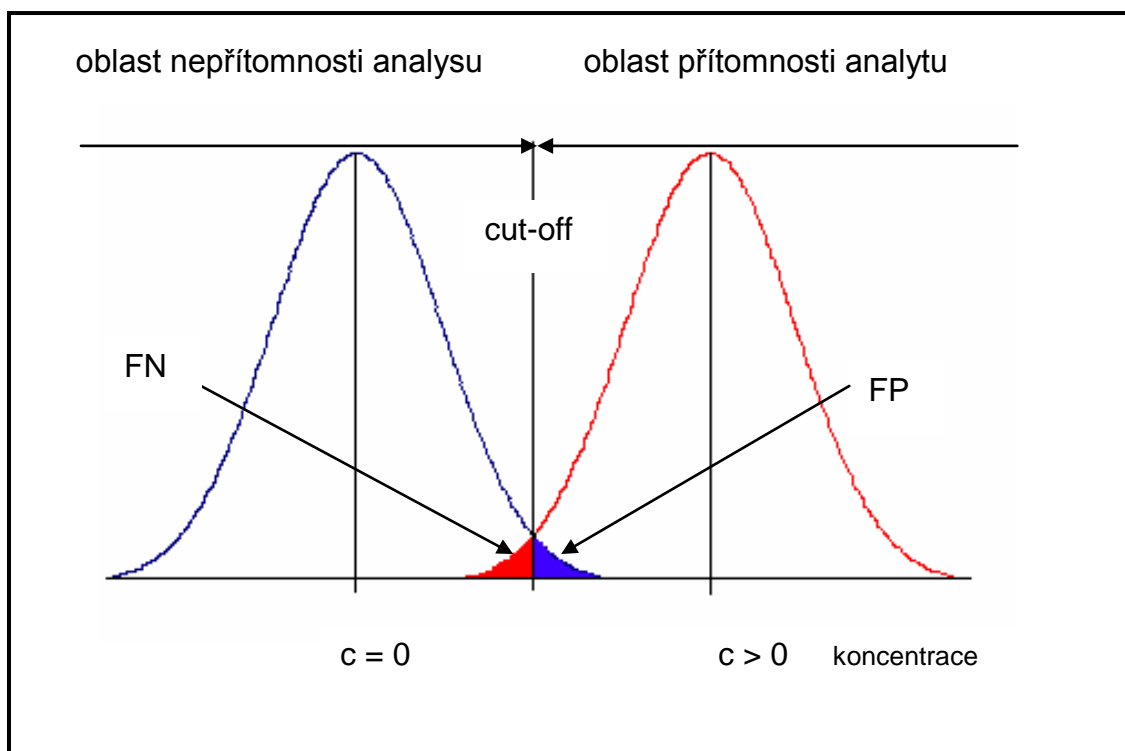
$$P(A/e) = \frac{P(e/A).P(A)}{P(e/A).P(A) + P(e/\neg A).P(\neg A)}$$

Následující kontingenční tabulka a obrázek znázorňují všechny situace, které mohou v kvalitativní analýze nastat.

Tab. 1 Kontingenční tabulka pro kvalitativní měřicí metodu

Reálná situace:			
	<i>analyt přítomen</i>	<i>analyt nepřítomen</i>	<i>total</i>
Důkaz:			
<i>positivní</i>	TP = P(e/A)	FP = P(e/$\neg A$)	n_{pos,měř}
<i>negativní</i>	FN = P($\neg e/A$)	TN = P($\neg e/\neg A$)	n_{neg,měř}
<i>total</i>	n_{přít}	n_{nepřít}	

Obr. 1 Grafické zobrazení kontingenční tabulky



Přehled definic:

P(A/e) aposteriorní pravděpodobnost přítomnosti analytu za předpokladu pozitivního důkazu

P(-A/e) aposteriorní pravděpodobnost nepřítomnosti analytu za předpokladu pozitivního důkazu

P(e/A) podmíněná pravděpodobnost pozitivního důkazu za předpokladu přítomnosti analytu

P(-e/A) podmíněná pravděpodobnost negativního důkazu za předpokladu přítomnosti analytu

P(e/-A) podmíněná pravděpodobnost pozitivního důkazu za předpokladu nepřítomnosti analytu

P(-e/-A) podmíněná pravděpodobnost negativního důkazu za předpokladu nepřítomnosti analytu

Citlivost (sensitivity) v kvalitativní analýze, SEN, je pravděpodobnost, že vzorek, který obsahuje analyt, je testovací metodou identifikován jako pozitivní

$$SEN = \frac{TP}{TP + FN}$$

Specifická (specificity) v kvalitativní analýze, SP, je pravděpodobnost, že vzorek, který neobsahuje analyt, je testovací metodou identifikován jako negativní

$$SP = \frac{TN}{TN + FP}$$

Falešně pozitivní poměr (false positive rate) je definován pomocí pravděpodobností vztahem:

$$FPR = \frac{FP}{TN + FP}$$

Je to vlastně poměr nekorektních výsledků, získaných na vzorcích, které neobsahují daný analyt (viz předchozí tabulka).

V literatuře najdeme i jinou definici falešně pozitivního poměru, definovaného na základě počtu falešně pozitivních výsledků experimentu:

$$\% FP = \frac{\text{počet}_{\text{falešně}_{\text{pozitivních}_{\text{výsledků}}}}}{\text{počet}_{\text{všech}_{\text{výsledků}}}}$$

Falešně negativní poměr (false negative rate) je definován pomocí pravděpodobností vztahem:

$$FNR = \frac{FN}{TP + FN}$$

V literatuře najdeme i jinou definici falešně negativního poměru, definovaného na základě počtu falešně negativních výsledků experimentu:

$$\% FN = \frac{\text{počet}_{\text{falešně}_{\text{negativních}_{\text{výsledků}}}}}{\text{počet}_{\text{všech}_{\text{výsledků}}}}$$

Spolehlivost (v%) se dá vyjádřit jako

$$\text{Spolehlivost (\%)} = 100 - FP (\%) - FN (\%)$$

Pravděpodobnostní poměr (likelihood ratio) je definován vztahem:

$$LR = \frac{1 - FNR}{FPR}$$

Positivní poměr odpovědí (Positive response rate), $P(x)$, vzhledem k limitní (apriorně určené) hodnotě je definován vztahem:

$$P(x) = \frac{\text{počet}_{\text{výsledků}_{\text{nad}_{\text{limitní}_{\text{hodnotou}}}}}}{\text{počet}_{\text{všech}_{\text{výsledků}}}}$$

Negativní poměr odpovědí (Negative response rate), $N(x)$, vzhledem k limitní hodnotě je definován vztahem:

$$N(x) = \frac{\text{počet}_{\text{výsledků}_{\text{pod}_{\text{limitní}_{\text{hodnotou}}}}}}{\text{počet}_{\text{všech}_{\text{výsledků}}}}$$

Positivní prediktivní hodnota (positive predictive value), PPV, je definována vztahem

$$PPV = \frac{TP}{TP + FP}$$

Negativní prediktivní hodnota (negative predictive value), NPV, je definována vztahem

$$NPV = \frac{TN}{TN + FN}$$

Měřicí schopnost (mez detekce), LOD, je definována jako nejmenší množství (obsah, koncentrace) látky, která může být detekována, identifikována nebo stanovena v daném vzorku (matrice!) s danou chybou II. druhu (β chyba). Jinými slovy: s pravděpodobností $(1 - \beta)$ je daná metoda schopna potvrdit přítomnost látky ve vzorku.

3 Charakteristiky měřicích postupů

3.1 Typy kvalitativní analýzy

Kvalitativní analýza má binární charakter: přítomnost/nepřítomnost, pozitivní vzorek/negativní vzorek, ano/ne. Tento binární charakter je závislý na předem určené prahové hodnotě kvantitativní veličiny, převážně analytického signálu.

Musíme však rozlišovat dva typy kvalitativní analýzy:

První typ kvalitativní analýzy se týká identifikace analytu (měřené veličiny, angl. measurand). Pro tento typ analýzy používáme analytických technik, jako spektroskopických a chromatografických metod, popř. kombinovaných (hyphenated) metod.

Druhý typ kvalitativní analýzy se vztahuje ke klasifikaci vzorků a používá předem určených limitních hodnot daných legislativou nebo zákazníkem. Pro kvalitativní analýzu tohoto typu máme dva druhy analytických měřicích postupů. Používáme buď tzv. testovací soupravy (kity), které poskytují přímo binární odezvu nebo používáme měřicích technik, které produkují hodnoty kvantitativních veličin. Tyto potom převádíme pomocí „filtru“ na binární odezvu.

3.1.1 Identifikace analytu

V této metodické příručce se nebudeme zabývat zjišťováním molekulové struktury sloučenin, ale identifikací neznámého analytu ve vzorku. Jedním ze způsobů je použití hmotnostní spektrometrie (MS) při identifikaci s využitím databází MS spekter. Podle pravidla EU³ pro konfirmační analýzu používáme 3 – 4 ionty (při 3 – 4 poměrech m/z). Důležitým identifikačním prvkem je výše relativní intenzity v MS spektru.

Jiný způsob se využívá v identifikaci drog, ať v dopingové kontrole nebo v kriminalistice. Tento způsob využívá Bayesovské analýzy a vychází z velikosti falešně pozitivních a falešně negativních výsledků (odvozených z instrumentální odezvy), které poskytují různé analytické techniky. Ukažme si postup při testování drog v moči. Laboratoř má z validace postupů tyto informace: velikost falešně pozitivních a falešně negativních výsledků (false positive, false negative) a prevalenci jednotlivých drog (a priori pravděpodobnost výskytu drog ve vzorcích moči). A posteriorní pravděpodobnost, vypočtená podle Bayesova vztahu (viz Terminologie) ukazuje jistotu, s jakou pozitivní odezva vzorku indikuje přítomnost drogy.

3.1.2 Klasifikace

V tomto oddíle Metodické příručky si pouze ukážeme teoretické postupy, které vedou k tomu, abychom správně klasifikovali neznámý vzorek. Jedná se o konstrukci „filtru“, který použijeme k převodu kvantitativních dat na binární, kvalitativní data.

Experimentální postup je jednoduchý: sestrojíme kalibrační křivku s počtem opakování každého měření signálu 2 – 3, podle standardních statistických postupů vypočteme rozhodovací hladinu (cut-off) a mez

detekce (LOD). Ze znalosti těchto hodnot můžeme vytvořit filtr pro převod kvantitativních údajů na kvalitativní. Podrobnější postup a vyhodnocení bude ukázán v další části.

3.2 Návaznost v kvalitativní analýze

Návaznost je základní vlastnost výsledků z metrologického hlediska. Metrologická definice se váže k výsledkům získaných kvantitativní analýzou, dá se však aplikovat i do oblasti kvalitativní analýzy s použitím referenčních materiálů a kalibrací instrumentů, poskytující kvantitativní signál.

Pro identifikační postupy používáme chemicky čisté látky (individua), které považujeme z metrologického hlediska za standardy. Tyto standardy charakterizujeme vhodnou instrumentální technikou (např. MS). Naměřené charakteristiky slouží potom při analýze neznámých vzorků. Většinou se toto děje automaticky pomocí knihoven, které jsou součástí instrumentálního software. Vhodné příznaky v knihovně a pravděpodobnost správné identifikace jsou hlavními spojkami v řetězci návaznosti. Důležitou částí řetězce návaznosti jsou také maticové referenční materiály s charakterizovanou limitní rozhodovací hodnotou.

Pyramida návaznosti se skládá ze screeningových metod (právě popsanych), konfirmatorních metod a referenčních metod, které jsou většinou primárními metodami.

3.3. Spolehlivost v kvalitativní analýze

V kvantitativní analýze je spolehlivost (reliability) úzce svázána s nejistotou výsledku. V kvalitativní analýze nemůžeme tuto míru spolehlivost používat. V této oblasti je spolehlivost svázána s pravděpodobností rizika nesprávného binárního rozhodnutí. Tato pravděpodobnost je svázána s termíny false positive rate, false negative rate a s tzv. Bayesovým teorémem (viz oddíl Terminologie).

V kvalitativní analýze budeme místo nejistoty hovořit o nespolehlivosti, která je charakterizuje oblast signálů, ve které je vysoká pravděpodobnost chyb⁴.

V následující tabulce jsou ukázány podobnosti a rozdíly mezi nejistotou a nespolehlivostí.

Tab. 2 Nespolehlivost a nejistota

Metrologický termín	Vlastnost		Rozmezí	Interval, kde	
	kvant. výsledek	binární výsledek		je očekávaný výsledek	jsou produkovány chyby
<i>nespolehlivost</i>		+	+		+
<i>nejistota</i>	+		+	+	

Binární odezva je v souladu s požadavky zákazníka, neboť se často vztahuje ke koncentrační úrovni určitého analytu, dané legislativou nebo doporučenou tím, kdo výsledky používá.

Předpokládejme, že předem určená koncentrační úroveň, má hodnotu C a je pro laboratoř, která analyzuje vzorek, externí hodnotou. Prvním krokem laboratoře je vybrat vhodný měřicí postup, který má vhodnou mez detekce, C_{DL} a který poskytuje vhodnou ano/ne odezvu (vzhledem k C). Rozdíl ($C - C_{DL}$) je tím kritériem, na základě něhož vybíráme měřicí postup kvalitativní analýzy.

Položme si otázku: jaká je minimální hodnota ($C - C_{DL}$) pro zabezpečení spolehlivé informace?

V případě kvantitativní analýzy je odpověď v přímém vztahu k nejistotě měření a souvisí s pravdivostí metody. V případě kvalitativní analýzy souvisí odpověď s mírou nespolehlivosti měřicího postupu.

V podstatě máme dvě možnosti, jak odhadnout oblast nespolehlivosti.

- a) v případě „čisté“ kvalitativní analýzy, kdy je přímá binární odezva (např. klasická kvalitativní anorganická a organická analýza), je metoda charakterizována tzv. citlivostí, která může být převedena na detekční limit., C_{DL} . Koncentrační rozmezí $C_0 - C_1$ kolem C_{DL} charakterizuje zónu nejistoty (nespolehlivosti) ve kterém nelze rozlišit mezi pozitivním (ano, analyt přítomen) a negativním (ne, analyt nepřítomen) signálem. Podmínka výběru měřicího postupu vzhledem ke standardní koncentraci C je vyjádřena rovnicí:

$$C > [C_{DL} + (C_1 - C_0)]$$

- b) v případě, kdy binární odezva je získána transformací (pomocí filtru) kvantitativních signálů vzhledem k signálu, odpovídající standardní koncentraci C , můžeme formulovat podobnou podmínku, ovšem s použitím nejistot měření, $U(C_{DL})$ a $U(C)$:

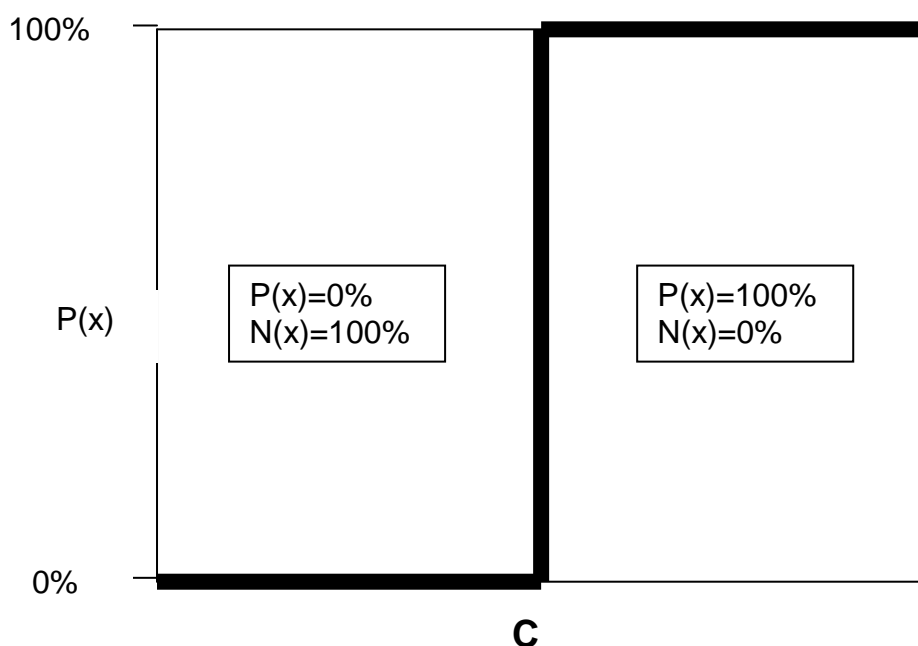
$$C > [C_{DL} + U(C_{DL}) + U(C)]$$

Ve většině případů platí: $(C_1 - C_0) \gg [U(C_{DL}) + U(C)]$.

V dalším si ukážeme, jak se dá odhadnout nespolehlivost binárních signálů z experimentálních dat.

Předpokládejme opět, že C je apriorně určený rozhodovací limit, x je skutečná koncentrace analytu ve vzorku. Veličinou $P(x)$ definujeme tzv. „positive response rate“, $N(x)$ je „negative response rate“. Z těchto hodnot můžeme konstruovat závislost $P(x)$ na koncentraci x , tedy pravděpodobnostní graf. V ideálním případě je tento graf ukázán na obr. 2.

Obr. 2 Pravděpodobnostní graf pro binární odezvu ideální screeningové metody



Ideální kvalitativní měřicí metoda poskytuje binární odezvu se 100% pravděpodobností pozitivního poměru odpovědí (positive response rate), je-li skutečná koncentrace ve vzorku vyšší než **C**. Taková měřicí metoda má odhad nespolehlivosti, U , $U = 0$.

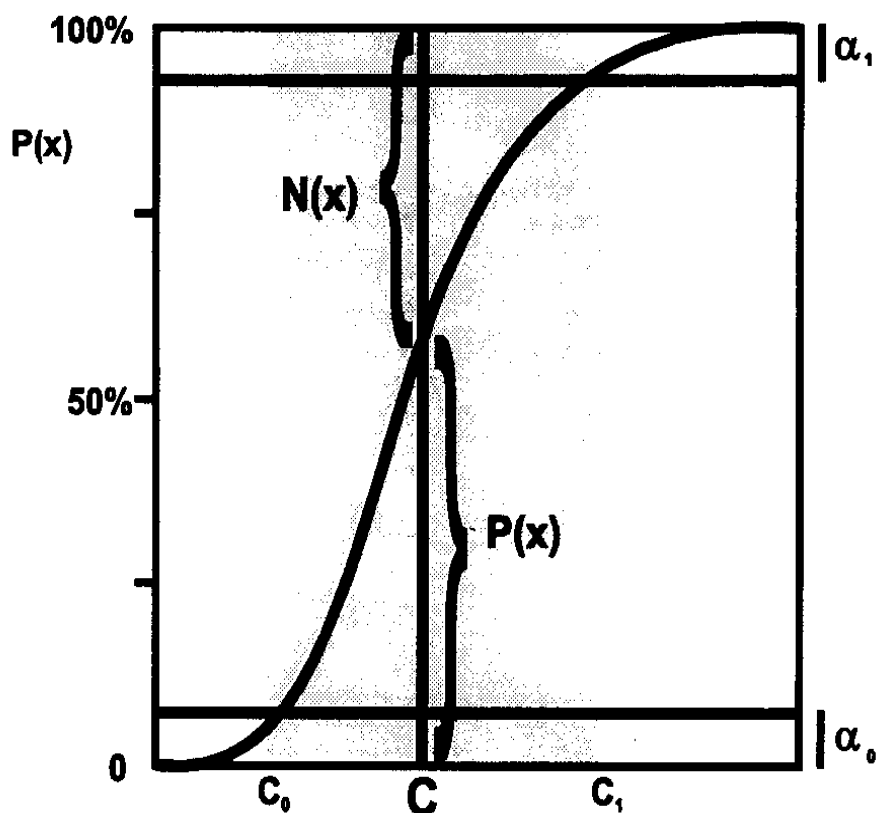
Reálná kvalitativní metoda poskytuje poněkud jiný obrázek, který je znázorněn na obr. 3.

Úroveň nespolehlivosti může být definována jako rozpětí koncentrací C_0 až C_1 , ve kterém platí:

$$0\% < P(x) < 100\% \quad \text{a} \quad 100\% > N(x) > 0\%.$$

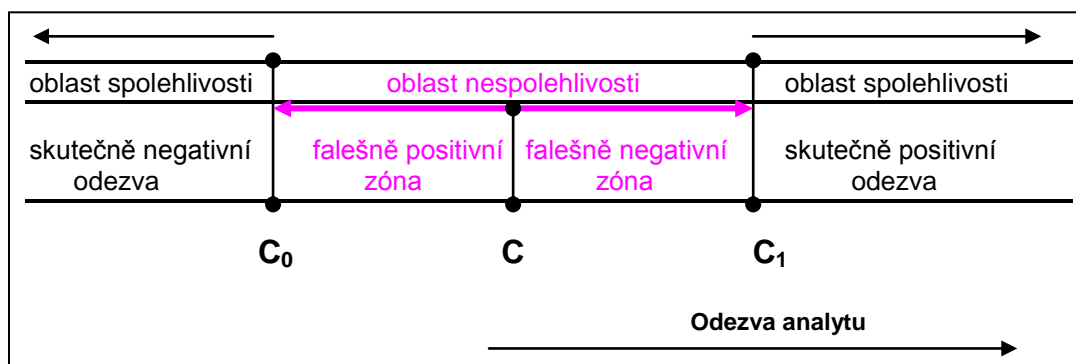
Jestliže α_0 je falešně pozitivní poměr (false positive rate) a α_1 je falešně negativní poměr (false negative rate), potom interval (C_0, C_1) , ve kterém platí $P(C_0) = \alpha_0$ a $N(x) = \alpha_1$, definuje nespolehlivost měřicí metody.

Obr. 3 Praviděpodobnostní graf pro binární odezvu reálné screeningové metody



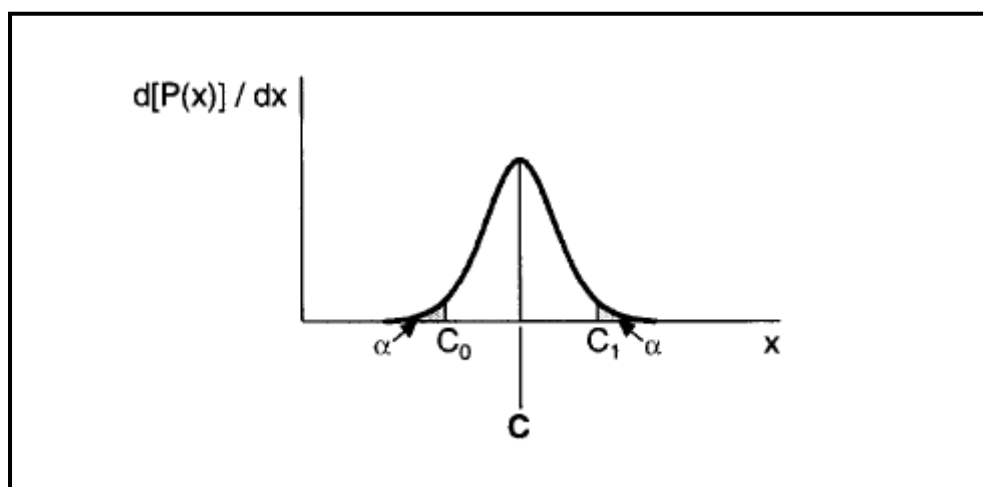
Na jiném obrázku, obr. 4., si nyní ukažeme vztah mezi oblastmi nespolehlivosti a koncentracemi analytu ve vzorku vzhledem ke standardní (předem určené) koncentraci C .

Obr. 4 Oblasti charakterizující binární odezvu



Derivujeme-li pravděpodobnostní křivku na obr. 3, dostaneme Gaussovu křivku, jak je ukázáno na obr. 5. Z této křivky je rovněž patrná souvislost nespolehlivosti kvalitativních testů a nejistoty kvantitativních testů.

Obr. 4 První derivace pravděpodobnostní křivky binární odezvy



Teoretické principy popsané výše jsou základem pro odhad nespolehlivosti měřicí metody.

3.4 Experimentální postupy zjišťování nespolehlivosti měřicí metody- validace kvalitativní měřicí metody

3.4.1 Prostředky pro validaci kvalitativní měřicí metody

Reagenční blanky a blanky vzorků jsou základní prostředky pro přiřazení signálu jednotlivým analytům, které je důležité jednak pro identifikaci, jednak pro klasifikační účely. Dostupnost vhodných blanků vzorků je jednou ze slabých stránek validace.

Různé typy vzorků, jako jsou testovací vzorky, spikované vzorky a vzorky s přirozenými obsahy analytů, které jsou potom spikovány

Referenční standardy (RM, CRM) s různými koncentračními úrovněmi analytů.

Různé normy, psané standardy.

Statistika, chemometrika.

3.4.2 Flexibilní validační protokol

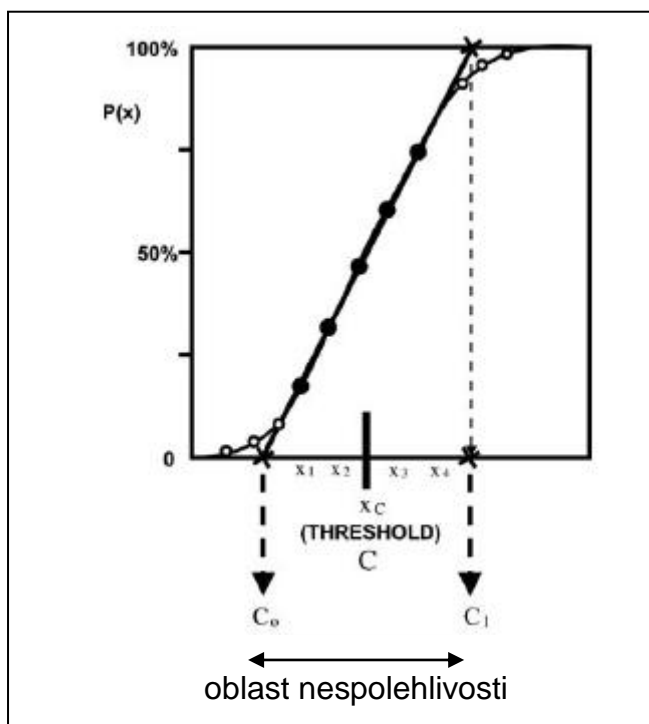
1. Stanovení analytické selektivity (interference!)
2. Stanovení výtěžnosti (je-li to nutné)
3. Stanovení LOD
4. Stanovení spolehlivosti (nespolehlivosti)
5. Stanovení robustnosti kvalitativní měřicí metody při různých koncentračních úrovních analýsu
6. Ověření na CRM (kvalitativní!)
7. Stanovení návaznosti

3.4.3 Variantní experimentální postupy při určování spolehlivosti (nespolehlivosti)

Postup A

Postup experimentálního stanovení rozsahu nespolehlivosti vzhledem k předem určené limitní hodnotě koncentrace (threshold), C , spočívá v přípravě pěti roztoků (vzorků) s různým obsahem určovaného analyzu a změření odpovídajících signálů (odezev). Každou z koncentrací měříme v 10ti opakováních. Důležitý je experimentální plán, který spočívá v přípravě dvou vzorků o nižší koncentraci než C a dvou vzorků o vyšší koncentraci než C . Koncentrační rozsah musí být nastaven v blízkém okolí C . Pro každou z koncentračních úrovní vypočteme hodnotu $P(x)$ (positive response rate) a z grafického zobrazení $P(x) = f(c)$ odhadneme hraniční hodnoty C_0 a C_1 . Na obr. 5 je grafické zobrazení tohoto postupu⁴.

Obr. 5 Grafické zobrazení postupu A



Postup B

Tento postup využívá určení meze detekce, který je podle ISO 11843:2000⁵ nazýván měřicí schopností (capability detection). Je výrazně využíván v posuzování potravin a krmiv (tzv. zero tolerance limit).

Odhad měřicí schopnosti se děje ve pěti krocích:

- volba apriorních pravděpodobnosti α a β (obvykle $\alpha = \beta = 5\%$)
- odhad nejistoty měření blanku (nejistota se zaměňuje s_{blank})
- sestavení kalibrační křivky v těsné blízkosti předpokládané meze detekce
- výpočet DL (CC_α) podle vztahu:

$$CC_\alpha = t_{(n-1);(1-\alpha)} \cdot \frac{s_{yx}}{b_1} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{c}^2}{J \sum_{i=1}^I (c_i - \bar{c})^2}}$$

ve kterém n je počet měření signálů na kalibrační křivce, J je počet opakování měření signálu při každé koncentraci (vyvážený model!), I je počet koncentračních úrovní, \bar{c} je průměrná koncentrace na kalibrační křivce, b_1 je směrnice kalibrační křivky. V případě heteroskedasticity signálů musíme použít váženou lineární regresi.

- výpočet LOD (CC_β) podle vztahu:

$$CC_\beta = \delta_{(n-1);\alpha,\beta} \cdot \frac{s_{yx}}{b_1} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{c}^2}{J \sum_{i=1}^I (c_i - \bar{c})^2}}$$

$$\delta_{(n-1);\alpha,\beta} = t_{(n-1);(1-\alpha)} + t_{(n-1);(1-\beta)}$$

kde δ je parametr nentrality.

Postup C

Tento postup vypočítává některé výkonnostní parametry kvalitativní analýzy na základě experimentálního ověření kontingenční tabulky. Používá takových měřicích metod, které poskytují instrumentální signál přímo vypovídající o tom, zda koncentrace daného analytu je nad či pod specifikovaným limitem. Klasickým příkladem takové měřicí metody je ELISA, při které měříme zbarvení či absorbanci po imunologické reakci v každé reakční destičce.

Postup si ukážeme na hypotetickém příkladu stanovení určitého analytu. Specifikovaný limit je předem určen (apriori) a má hodnotu 2 $\mu\text{g/g}$. Výsledek testovaného vzorku bude pozitivní, jestliže hodnota je nad tímto limitem, negativní, jestliže hodnota je pod limitem. Projevem imunologické reakce bude zbarvení, které v případě pozitivního výsledku bude charakterizováno barvou B₁, v případě negativního výsledku barvou B₂. Test bude aplikován na 300 vzorků, z nichž 150 je pozitivních

(konfirmasiáno jinou technikou!), 150 je negativních. Po provedeném experimentu vypadá kontingenční tabulka takto:

	Reálná situace			total
		nad limitem	pod limitem	
výsledek testu	pozitivní	135 (TP)	21 (FP)	156 (TP+FP)
	negativní	15 (FN)	129 (TN)	144 (FN+TN)
	total	150 (TP+FN)	150 (FP+TN)	300 (N)

Spolehlivost je dána výpočtem citlivosti, selektivity, PPV a NPV

$$SEN = TP/(TP+FN) = 135/(135+15) = 0,9 = 90\%$$

Citlivost je mírou síly testu β , což je pravděpodobnost chyby II. druhu (získání falešně negativních výsledků). V našem případě

$$\beta = 1 - 0,9 = 0,1 = 10\%.$$

$$SP = TN/(TN+FP) = 129/(129+21) = 0,86 = 86\%$$

Specifická je mírou hladiny významnosti α , což je pravděpodobnost chyby I. druhu (získání falešně pozitivních výsledků). V našem případě

$$\alpha = 1 - 0,86 = 0,14 = 14\%$$

$$PPV = TP/(TP+FP) = 135/(135+21) = 0,865 = 86,5\%$$

Positivní prediktivní hodnota odhaduje podíl skutečně pozitivních výsledků na všech pozitivních výsledcích.

$$NPV = TN/(TN+FN) = 129/(129+15) = 0,9 = 90\%$$

Negativní prediktivní hodnota odhaduje podíl skutečně negativních výsledků na všech negativních výsledcích.

$$FP(\%) = 21/300 = 0,07 = 7\%$$

$$FN(\%) = 15/300 = 0,05 = 5\%$$

$$SPOLEHLIVOST(\%) = 100 - 7 - 5 = 88\%$$

Všechny charakteristiky jsou produktem validace měřicí kvalitativní metody a slouží jako *apriorní* informace o výkonnosti metody. Další použití těchto apriorních charakteristik je při srovnávání různých měřících postupů, použitých pro stejný vzorek. Tento postup je nejvíce používán při hodnocení bioanalytických metod, jako imunologických, mikrobiologických a klinických analýz.

Experimentální postup C může být i východiskem pro zpracování binárních výsledků Bayesovskou analýzou, založenou na vztahu (viz Terminologie):

$$P(A/e) = \frac{P(e/A).P(A)}{P(e/A).P(A) + P(e/\neg A).P(\neg A)}$$

Pro náš hypotetický příklad:

A je jev, který bychom mohli definovat jako hodnota obsahu nad limitní mez 2 µg/g, **¬A** je jev, který definujeme jako hodnota obsahu pod limitní mezí 2 µg/g, **e** je pozitivní výsledek testu, **P(A)** je *apriorní* pravděpodobnost toho, že hodnota obsahu je nad 2 µg/g, **P(¬A)** je apriorní pravděpodobnost toho, že hodnota obsahu je pod 2 µg/g. Tyto dvě apriorní pravděpodobnosti jsou velice obtížně zjistitelné. Mohou být odhadnuty z historických dat (tak, jak se to děje v medicínském výzkumu), ze zkušenosti s výskytem příslušného analytu ve vzorcích. Nejjednodušší řešení je použít stejných pravděpodobností s hodnotou 0,5 (50%).

Podmíněná pravděpodobnost P(A/e) vyjadřuje spolehlivost testu, neboť je to pravděpodobnost toho, že hodnota obsahu je nad 2 µg/g za předpokladu pozitivního výsledku testu.

Předchozí vztah si můžeme upravit na:

$$P(A/e) = \frac{(1 - FNR).P(A)}{(1 - FNR).P(A) + FPR.P(\neg A)}$$

Po dosazení dostaneme:

$$P(A/e) = (0,9 \cdot 0,5) / (0,9 \cdot 0,5 + 0,1 \cdot 0,5) = 0,865 = 86,5\%$$

Tento Bayesův test nám, na rozdíl od kontingenčních tabulek, dává možnost informace o tom, jaká bude spolehlivost testu před tím, než bude proveden.

3.4.4 Srovnání kvalitativní měřicí metody s konfirmatorní (referenční) metodou⁶

Referenční metoda poskytuje očekávané výsledky vzhledem k předem danému limitu. Návrh experimentu je ukázán v následující tabulce.

		nová metoda		total
		pozitivní výsledek	negativní výsledek	
referenční metoda	pozitivní výsledek	N11	N12	N1_
	negativní výsledek	N21	N22	N2_
total		N_1	N_2	N

Test pro významný rozdíl mezi dvěma metodami (ověření nulové hypotézy H_0 = není rozdíl) můžeme provést dvěma způsoby.

1. McNemarovým testem (χ^2 test)

$$\chi^2 = \frac{(|N12 - N21| - 1)^2}{N12 + N21}$$

H_0 platí na hladině významnosti 5%, je-li $\chi^2 < 3,84$

2. Výpočtem kappa koeficientu, κ

Pro výpočet koeficientu κ potřebujeme znát některé veličiny:

$$p_0 = (N_{11} + N_{22})/N \quad p_e = ((N_{1_} \cdot N_{_1}) + (N_{2_} \cdot N_{_2}))/N^2$$

$$\kappa = \frac{p_0 - p_e}{1 - p_e}$$

Hodnocení H_0 :

$\kappa \leq 0,20$	neshoda
$\kappa \in \{0,21 - 0,40\}$	špatná shoda
$\kappa \in \{0,41 - 0,60\}$	mírná shoda
$\kappa \in \{0,61 - 0,80\}$	dobrá shoda
$\kappa > 0,80$	vynikající shoda

3.4.5 Robustnost kvalitativní měřicí metody

Experimentální plán je podobný Youdenově plánu v kvantitativních měřicích metodách⁷. Vybereme 7 apriorně kritických parametrů metody a jejich nominální a alternativní metody. Připravíme 8 identických alikvotních podílů banku a spikujeme je do výše zvolené koncentrace (nejlépe limitní hodnota). Potom aplikujeme kvalitativní test a zaznamenáváme pozitivní a negativní odpovědi (vzhledem k signálu limitní hodnoty). Vypočítáme FPR a FNR pro všech 8 pokusů a vypočteme difference (kontrasty podle stejných pravidel Youdenova schématu. Největší kontrast svědčí o špatné robustnosti metody.

Experimentální schéma je ukázáno v následující tabulce 3 .

Tab. 3 Experimentální schéma pro testování robustnosti

č.	hodnoty							FPR(%)	FNR(%)
	zvolených parametrů								
1	A	B	C	D	E	F	G	FP1	FN1
2	A	B	c	D	e	f	g	FP2	FN2
3	A	b	C	d	E	F	g	FP3	FN3
4	A	b	c	d	e	F	G	FP4	FN4
5	a	B	C	d	e	F	g	FP5	FN5
6	a	B	c	d	E	f	G	FP6	FN6
7	a	b	C	D	e	f	G	FP7	FN7
8	a	b	c	D	E	f	g	FP8	FN7

Příklad výpočtu:

$$FP_A - FP_a = (FP1+FP2+FP3+FP4) - (FP5+FP6+FP7+FP8)$$

3.5 Mezilaboratorní testy

Mezilaboratorní testy (MZT) se i v oblasti kvalitativní analýzy musí řídit stejnými pravidly, jakými se řídí testy pro kvantitativní stanovení. Některé zvláštnosti jsou zdůrazněny v následujících bodech⁸ :

- MZT jsou organizovány v oblasti nízkých koncentrací nebo v oblastech legislativních limitů, kde jsou pravděpodobné falešně pozitivní a falešně negativní výsledky
- FP a FN výsledky jsou zahrnuty do zpracování pomocí z-skóre
- Účastníci MZT musí prezentovat výsledky jednoznačně v binárním vyjádření (ano/ne, pod limitem/nad limitem)
- Statistická expertíza výsledků je povinnou součástí MZT

Je důležité distribuovat více vzorků s určitým poměrem pozitivních a negativních vzorků. Účastníci musí znát rozsah nespolehlivosti (C_0 , C_1) pro danou analýzu, aby mohli správně klasifikovat jednotlivé vzorky.

Následující tabulka 4 ukazuje výsledky hypotetického testu pro 4 laboratoře. Správná klasifikace je uvedena v závorce u jednotlivých vzorků.

Tab. 4 Simulované výsledky MZT (0 – správná odpověď; 1 – chybná odpověď)

Vzorek	Lab#1	Lab#2	Lab#3	Lab#4
A(+)	0	0	0	1
B(+)	0	0	1	0
C(-)	0	1	0	0
D(-)	0	0	0	1
E(-)	0	0	0	0
F(-)	0	0	0	0
G(+)	0	0	0	0
H(-)	0	0	1	0
I(-)	0	0	0	1
J(-)	0	0	0	0

Kromě klasického zpracování pomocí z-skóre a odvozených veličin, je výhodné posuzovat laboratoře podle úspěšnosti pozitivních odpovědí (%T)

V následující tabulce 5 jsou vypočteny některé parametry posuzování MZT.

Nejvhodnější je parametr RSZ (%) extrapolovaný ke 100% ($n_{\text{vzorků}} = 100$) a vypočtený z hodnoty Σz (%), což je re-škálovaná hodnota Σz .

Tab. 5 Z-skóre a další parametry posuzování

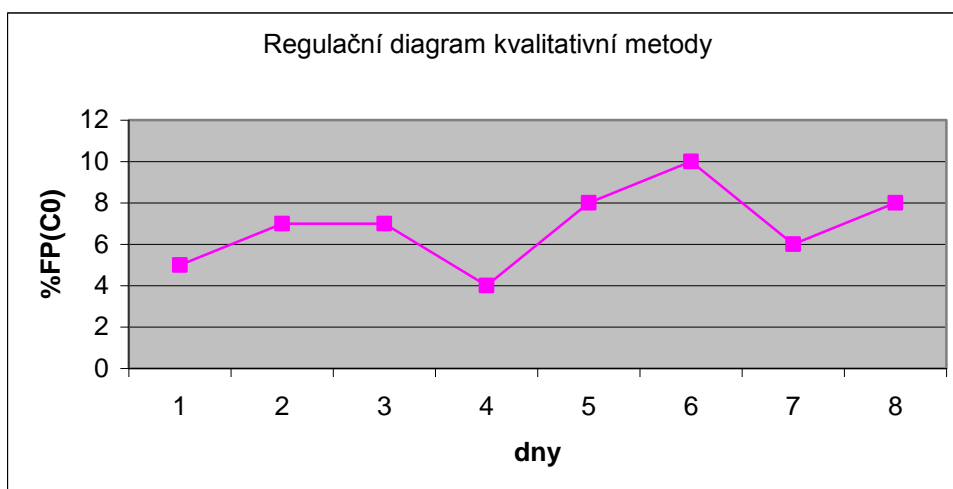
	Lab.#1	Lab.#2	Lab.#3	Lab.#4
Σz	0	1	2	3
$RSZ = \Sigma z / \sqrt{n_{\text{vzorků}}}$	0	0,32	0,63	0,95
$SSZ = \sqrt{z^2}$	0	1	2	3
%T	100	90	80	70
Σz (%)	0	10	20	30
RSZ(%)	0	1	2	3
posouzení	výborné	akceptovatelné	akceptovatelné	nevyhovující

Posuzování se děje podle stejných pravidel, jako v kvantitativní analýze.

3.6 Regulační diagramy⁸

Monitorované parametry jsou FPR a FNR v %. Regulační mez je např. hranice 15%, varovná mez hranice 10%. Akceptovatelná hranice je 5%. Experimentální plán spočívá v přípravě dvou kontrolních vzorků A, B, jejichž koncentrace jsou v těsné blízkosti hranic nespolehlivosti (C_0 , C_1) nebo hraniční, limitní hodnoty. Vzorky musí být homogenní a matrice musí reprezentovat reálné matrice měřených vzorků. Velice důležitým požadavkem je, aby vzorek A poskytoval teoreticky 100% negativních odpovědí, potom je tento vzorek používán pro detekci falešně pozitivních odpovědí. Vzorek B by měl poskytovat teoreticky 100% pozitivních odpovědí, potom je tento vzorek používán k detekci falešně negativních odpovědí. V časové řadě zaznamenáváme pozitivní či negativní odpovědi, které potom zaznamenáváme grafu jako závislost %FP či %FN na čase. Hypotetický příklad je ukázán na následujícím obrázku 6.

Obr. 6 Regulační diagram kvalitativní metody



4 Literatura

1. Expression of uncertainty in Qualitative Testing.
EURACHEM/CITAC conference Discussion Paper,
LGC/VAM/2003/048
2. Trends in Anal.Chem. **24**, 468 (2005)
3. Rozhodnutí EU 2002/657/EC
4. Accred.Qual.Assur. **8**, 68 (2003)
5. ISO 11843:2000
6. Evaluation of results from qualitative methods.
ISO/REMCO/SG2/AHG01, 2008
7. Trends in Anal.Chem. **25**, 621 (2006)
8. Trends in Anal.Chem. **24**, 525 (2005)