

ГЛАВА 2.6.4.

НЕОПРЕДЕЛЕННОСТЬ ИЗМЕРЕНИЙ

ВВЕДЕНИЕ

В Рекомендациях МЭБ по валидации содержится подробная информация и примеры в поддержку Стандарта валидации МЭБ, который опубликован как глава 1.1.6 Руководства по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных или глава 1.1.2 Руководства по диагностическим тестам для водных животных. Термин «Стандарт валидации МЭБ» в настоящей главе следует рассматривать в значении, использованном в указанных главах.

В соответствии с такими международными стандартами качества, как ИСО/МЭК 17025-2005 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий (ИСО/МЭК 17025)», от испытательных лабораторий требуется проведение оценки неопределенности измерений (НИ), которую иногда называют погрешностью измерений. Процесс измерения при определении аналита в диагностическом образце не является полностью воспроизводимым; следовательно, точного значения, которое может быть соотнесено с измеряемым аналитом, не существует. Поэтому наиболее точным выражением результата служит расчетное значение с указанием сопряженного уровня погрешности. Эта погрешность является неопределенностью измерений (НИ). НИ ограничивается процессом измерения. Речь не идет об определении приемлемости и пригодности собственно измерения для какой-либо цели, с которой оно может применяться. Она не является альтернативой валидации методики, но справедливо считается частью этого процесса (см. «Стандарт валидации МЭБ», раздел В.1.1).

1. Необходимость определения НИ

Для того, чтобы национальные органы аккредитации диагностических лабораторий подтвердили соответствие ИСО/МЭК 17025-2005, требуется проведение оценки НИ для методик испытаний, которые дают количественные результаты, например, оптическую плотность (ОП), процент положительных результатов (ППР) или процент ингибирования (ПИ), титры, пороговые циклы (ПЦ) и т. д. К ним относятся испытания, в которых численные значения после расчетов выражаются как положительный или отрицательный результат на основании пороговой величины. Для оценки НИ серологических методик и методик ПЦР в режиме реального времени пригодны такие статистические показатели, как средние целевые значения ± 2 -кратное стандартное отклонение (SD), что почти соответствует 95% доверительному интервалу (ДИ), относительному стандартному отклонению ($RSD = SD/\text{средний результат повторностей}$) и коэффициенту вариаций ($CV = RSD \times 100\%$). Принцип НИ не применяется к строго двоичным результатам (положительным или отрицательным).

1.1. Примеры для пользования при определении НИ

Повторяемость – это уровень согласия между результатами повторностей образца как в пределах испытания, так и между испытаниями по одной и той же методике в конкретной лаборатории. При разработке методики испытания повторяемость оценивают по вариабельности результатов независимых повторностей не менее чем трех (предпочтительнее пяти) образцов с активностью аналита, которая соответствует активности в пределах рабочей области методики (см. Стандарт валидации МЭБ, разделы А.2.5 и В.1.1, а также главу 3.6.6 «Выбор и использование стандартных образцов и панелей», раздел 3.1). Вариабельность результатов повторностей обычно выражается как RSD или CV. Важной особенностью является то, что для установления ожидаемой прецизионности методики в случае определения диапазона концентраций аналита могут использоваться исследования повторяемости.

Внутренний контроль качества или процесса в диапазоне ожидаемых результатов стали частью ежедневных операций контроля качества и обеспечения качества на аккредитованных площадках (см. Стандарт валидации МЭБ, разделы А.2.6 и В.5.1, а также главу 3.6.6, раздел 1.4). Их результаты обеспечивают непрерывный мониторинг различных показателей повторяемости, например, вариабельности в пределах испытания и между испытаниями, вариабельности результатов, полученных от одного оператора, и вариабельности результатов, полученных от нескольких операторов, а также внутри- и межсерийной вариабельности. Статистический анализ показателей позволяет выразить уровень устойчивости (прецизионности) методики испытания. Через мониторинг показателей контроля качества методики в части оценки повторяемости получают свидетельство того, что испытание выполняется или не выполняется в соответствии с ожиданиями. Для того, чтобы получать от контрольных образцов истинные выводы о прецизионности методики, их следует подготовить точно таким же способом, что и испытуемые образцы в каждом цикле испытания: например, включив такую подготовку испытуемого образца, как экстрагирование или разбавление образцов сыворотки крови в случае твердофазного иммуноферментного анализа (твердофазного ИФА) для определения антител.

Вариабельность результатов контрольных образцов также может использоваться для оценки источников неопределенности в совокупности, что обозначается как нисходящий подход. Указанный подход предполагает, что компоненты прецизионности проявятся в конечном измерении. Таким образом, мониторинг прецизионности измерений в динамике позволит эффективно выявлять совокупные эффекты погрешности, связанной с входящими в состав этапами.

Значимость погрешности или неопределенности процесса измерения, которая сопряжена с результатом испытания, возрастает по мере приближения результата испытания к диагностическому пороговому значению. Это объясняется тем, что отнесение результата испытания к положительному, отрицательному или неопределенному (см. следующий пример) выполняется по отношению к пороговому значению методики. В этом смысле положительные образцы с низким содержанием аналита, например, те, которые использовались в исследованиях повторяемости или служили положительным контролем с низким содержанием аналита, больше всего подходят для оценки НИ. Обосновать это можно следующим образом: НИ, которая является функцией

прецизионности методики, наиболее критична на уровнях принятия решений (т. е. пороговых значений), которые обычно близки к нижнему пределу обнаружения методики. В настоящей главе описывается применение НИ по отношению к значениям «отсечки» (пороговым значениям), как рекомендованным производителем наборов для испытаний, так и принятым в диагностической лаборатории.

1.2. Пример расчета НИ для твердофазного ИФА в серологии

В случае основной массы методов обнаружения антител важно помнить: большинство испытаний представляют собой измерение активности антитела по отношению к пороговому значению с применением дихотомической интерпретации положительных и отрицательных результатов. Значимость этого момента заключается в том, что он помогает принять решение о приемлемости применения НИ. В серологии неопределенность часто наиболее значима на уровне порогового значения, разделяющего положительные и отрицательные результаты. Результаты, попадающие в эту область, также описываются как промежуточные, неопределенные, подозреваемые или сомнительные (см. Стандарт валидации МЭБ, раздел В.2.4).

Нисходящий подход в серологии демонстрируется на примере набора ограниченных данных из конкурентного твердофазного ИФА для определения антител к вирусу гриппа птиц. Для расчета НИ на уровне порогового значения используется положительный контрольный образец с низким содержанием аналита.

1.2.1. Способ выражения НИ

Поскольку неопределенность подлежит оценке на уровне порогового значения, которое необязательно является уровнем реакции для положительного контроля сыворотки крови с низким содержанием аналита, относительное стандартное отклонение (RSD) или коэффициент вариаций (CV), выраженные в процентах, обеспечивают удобное преобразование:

$$\text{RSD} (X) = \text{SD} (X) / (\bar{X})$$

Для упрощения оценки преобразованный результат принят за выходной результат испытания (среднее значение результатов нескольких повторностей (\bar{X})). В случае описываемого примера результаты конкурентного твердофазного ИФА «нормализованы» (см. Стандарт валидации МЭБ, раздел А.2.7) по рабочему стандартному образцу через выведение отношения всех значений оптической плотности (ОП) к значению оптической плотности не вступающего в реакцию (отрицательного) контрольного образца (ОП₀). Это отношение вычитается из 1, что позволяет определить уровень активности антител на шкале положительной корреляции; чем выше уровень, тем выше расчетное значение.

Полученное скорректированное значение выражается в процентах и называется процентом ингибирования или ПИ. Так, для получения процента ингибирования положительного контроля с низким содержанием аналита

(ПИ_Н) выполняется следующее преобразование оптической плотности положительного контроля сыворотки крови с низким содержанием аналита (ОП_Н):

$$ПИ_N = 100 \times [1 - \{ОП_N/ОП_0\}]$$

Формула относительного стандартного отклонения приобретает вид:

$$RSD(ПИ_N) = SD(ПИ_N)/(ПИ_N)$$

1.2.2. Пример

Ниже представлен пример на основе набора ограниченных данных из конкурентного твердофазного ИФА для определения антител к гриппу птиц. В эксперименте оператор десять раз в рамках одного цикла выполнил анализ положительного контроля сыворотки крови с низким содержанием аналита. Для применения нисходящего подхода оптимальным стал бы больший набор данных, который позволил бы рассчитать эффекты от изменения оператора и компонентов испытания (не только контрольного образца сыворотки крови) в отношении прецизионности.

Испытание	ПИ (%)
1	56
2	56
3	61
4	64
5	51
6	49
7	59
8	70
9	55
10	42

Среднее значение – 56,3; стандартное отклонение (SD) – 7,9; количество анализов (n) = 10

1.2.3. Расчет неопределенности

По набору ограниченных данных:

$$RSD(ПИ_N) = SD/Среднее значение = 7,9/56,3 \\ = 0,14 \text{ (или как коэффициент вариаций} = 14\%)$$

Расширенная неопределенность (U) – это статистический показатель, определяющий интервал значений измеряемой величины; считается, что она находится в пределах установленного доверительного уровня, обычно 95%. Расширение неопределенности достигается путем умножения RSD (ПИ_Н) на 2; это позволяет рассчитать приблизительный 95% доверительный интервал

вокруг порогового значения (в данном случае ПИ 50%) при условии нормального распределения данных.

$$U(95\% \text{ ДИ}) = 2 \times \text{RSD} = 0,28$$

Полученное расчетное значение затем может применяться на уровне порогового значения

$$95\% \text{ ДИ} = 50 \pm (50 \times 0,28) = 50 \pm 14\%$$

1.2.4. Интерпретация

Любой положительный результат (ПИ > 50%) меньше 64% не является положительным на 95% доверительном уровне. Подобным образом отрицательный результат (ПИ < 50%), превышающий или равный 36, не является отрицательным на 95% доверительном уровне. Эта нижняя доверительная область может коррелировать с «серой областью» или «областью неопределенных/подозреваемых результатов» интерпретации, которая должна быть определена для всех методик (Greiner *et al.*, 1995).

2. Другие области применения

Нисходящий подход должен найти широкое применение в целом ряде диагностических тестов, в том числе молекулярных. Для тестов, предполагающих в норме использование серий двукратных разведений положительного контроля (например, тесты на основе ингибирования реакций вирусной нейтрализации, связывания комплемента и гемагглютинации), следует рассчитывать среднее геометрическое титров (т. е. среднее и SD значений титра, преобразованных в логарифм с основанием 2) положительного контрольного образца сыворотки крови. Значения относительного стандартного отклонения, основанные на этих значениях логарифмической шкалы, затем могут применяться на уровне порогового титра (log) и, наконец, быть преобразованы, чтобы выразить неопределенность на уровне порогового значения. При этом во всех случаях подход предполагает, что вариабельность результатов положительного контроля, использованного для расчета RSD, пропорционально близка в точке применения НИ, например, на уровне порогового значения. В том случае, если RSD значительно варьирует на всей шкале измерений, положительный контроль сыворотки крови, использованный для расчета НИ на уровне порогового значения, должен быть выбран по уровню активности, близкому к пороговому значению. Австралийский подкомитет по лабораторным стандартам в ветеринарии (SCAHLS) выпустил примеры с решениями для ряда диагностических тестов: они доступны на странице SCAHLS:

<http://www.scahls.org.au/Guidelines/Pages/Measurement-of-Uncertainty.aspx>

В случае количественного ПЦР (кПЦР) в режиме реального времени допускается использование повторностей положительного контроля с соответствующими значениями порогового цикла (ПЦ) для оценки НИ с применением нисходящего подхода.

Были описаны другие подходы и показатели variability, например, для серологических тестов (Dimech *et al.*, 2006; Goris *et al.*, 2009; Toussaint *et al.*, 2007). Дополнительные труды и нормативно-правовые документы предлагаются Национальной консультативной группой по аккредитации лабораторий и отделом естественных наук. Основным документом по НИ является Руководство по выражению неопределенности измерений (GUM), Руководство ИСО/МЭК (1995 года).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, AS ISO/IEC 17025-2005 2nd edition.

DIMECH W., FRANCIS B., KOX J. & ROBERTS G. (2006). Calculating uncertainty of measurement for serology assays by use of precision and bias. *Clin. Chem.*, 52, No. 3, 526-529.

GORIS N., VANDENBUSSCHE F., HERR, C., VILLERS, J., VAN DER STEDE, Y. & DE CLERCQ K. (2009). Validation of two real-time PCR methods for foot-and-mouth disease diagnosis: RNA-extraction, matrix effects, uncertainty of measurement and precision. *J. Virol. Methods*, 160, 157-162.

GREINER M., SOHR D. & GOEBEL P.A. (1995). Modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests, *J. Immunol. Methods*, 185, 123-132.

TOUSSAINT J.F., ASSAM P., CAIJ B., DEKEYSER F., KNAPEN K., IMBERECHTS H., GORIS N., MOLENBERGHS G., MINTIENS K., & DE CLERCQ K. (2007). Uncertainty of measurement for competitive and indirect ELISAs. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 26 (3), 649-656.

Requirements for the estimation of measurement uncertainty, National pathology accreditation advisory group, (2007).

http://www.health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/Content/B1074B732F32282DCA257BF0001FA218/SFile/dh_aeou.pdf (accessed 14 October 2013).

American Association for Laboratory Accreditation. Policy on estimating measurement uncertainty for life science testing labs

http://www.a2la.org/policies/A2LA_P103b.pdf (accessed 14 October 2013).

Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM), ISO/IEC Guide 98:1995.

Sub-committee for Animal Health Laboratory Standards, Australia and New Zealand. Examples for MU in Veterinary Diagnostic Testing: <http://www.scahls.org.au/Guidelines/Pages/Measurement-of-Uncertainty.aspx> (accessed 30 June 2014).