



Лекция 1. Введение в практическую метрологию лабораторных исследований

М.И. Прищепа, кандидат технических наук, ЗАО «АНАЛИТИКА»

Все 12 кратких лекций этого года по практической метрологии будут, в основном, посвящены общим и специальным вопросам метрологического обеспечения количественных лабораторных исследований. Общепринятые в метрологии подходы к метрологическому обеспечению измерений, в том числе по оценке точности получаемых результатов, широко используются во многих областях человеческой деятельности. Некоторые из них, адаптированные к имеющейся ситуации с эталонами аналитов, используются и для оценки точности результатов лабораторных исследований. К сожалению, полноценно внедрить все достижения теоретической метрологии в области метрологического обеспечения измерений в практику лабораторной медицины пока не представляется возможным. Причиной этого, главным образом, является отсутствие для большинства исследуемых в лабораториях аналитов так называемых поверочных схем [1], которые могли бы обеспечивать передачу размера единицы измеряемой физической величины от ее общепринятого эталона или исходного образцового средства измерения рабочим средствам измерений с указанием метода и погрешности этой передачи. Заметим, что в лабораторной медицине вместо эталонов и образцовых средств измерений обычно используют такие термины как референтные материалы и референтные методы, а под рабочими средствами измерений понимают аналитические системы, используемые для проведения количественных лабораторных исследований. Ввиду практического отсутствия референтных материалов и методов для большинства исследуемых в лабораториях аналитов, ожидать появления поверочных схем для них вряд ли следует в ближайшие годы. В этой же связи не стоит ожидать в обозримом будущем и улучшения сопоставимости лабораторных результатов известными из метрологии методами обеспечения единства измерений. По тем же причинам не поможет в этом деле и новый подход теоретической метрологии к оценке погрешности результатов измерений, изложенный в стандарте [2], в котором устанавливаются общие требования к компетенции испытательных лабораторий. Этот стандарт, в том числе, требует от лабораторий, чтобы они самостоятельно устанавливали и поддерживали «метрологическую прослеживаемость результатов своих измерений, связывая их с соответствующей основой для сравнения посредством документированной непрерывной цепи калибровок, каждая из которых вносит свой вклад в неопределенность измерений». Звучит это все как в известной сказке: пойдя туда, не знаю куда, принеси то, не знаю что...

Данная лекция, первая из цикла кратких лекций этого года по практической метрологии, представляет собой обзор основных метрологических задач, стоящих перед лабораториями при проведении анализа состава и свойств биопроб пациентов. Ее основная цель состоит в том, чтобы показать, почему лаборатории просто обречены решать эти задачи в рамках своей практической деятельности.

Прежде всего, это связано с тем, что продукцией, которую производят лаборатории, являются именно результаты исследований состава и свойств биопроб пациентов. Результаты этих исследований, как и любая другая производимая кем-либо продукция, должны по своему качеству удовлетворять определенным требованиям, которые формируются интересами и/или потребностями заказчиков.

Заказчиками продукции лабораторий, являются, главным образом, клиницисты, которые используют результаты лабораторных исследований для решения своих задач, связанных с массовым обследованием (скринингом), с постановкой диагноза или с контролем эффективности проводимой терапии. Повышенный интерес клиницистов к качеству лабораторных результатов абсолютно понятен, поскольку они составляют важную часть объективной информации о клиническом состоянии пациентов.

В этой связи следует отметить, что клиницистам необходимы не просто любые результаты лабораторных исследований, а результаты с установленным аналитическим качеством и установленным сроком их предоставления в клинику. Показателями качества результата являются максимально допустимое его отклонение от реального значения исследуемого лабораторного показателя в пробе пациента и максимально допустимая задержка во времени от получения заказа на исследование до выдачи его результата клиницисту. Иными словами, продукция должна быть произведена лабораторией не только требуемого аналитического качества, но и доставлена до заказчика без задержки. Причины этих требований достаточно очевидны: результаты исследований должны быть не только аналитически достоверны, но и своевременно представлены в клинику, чтобы адекватно соответствовать текущему состоянию уровней аналитов *in vivo*. В противном случае клиницист может принять решение, которое может повлечь за собой не только ухудшение состояния пациента, но порой и его смерть.

Но наличие требуемого качества у результатов само по себе еще не может автоматически обеспечивать безошибочную их интерпретацию. Для проведения надежной интерпретации клиницистам помимо самих результатов должны быть известны, во-первых, величины биологических вариаций соответствующих аналитов и, во-вторых, аналитические ошибки результатов, то есть величины отклонений результатов измерения уровней аналитов от их истинных значений в этих же пробах. Ошибки эти, в свою очередь, целиком и полностью определяются эксплуатационными значениями аналитических характеристик аналитических систем, на которых результаты были получены.

Причины, почему для проведения надежной интерпретации клиницистам просто необходимо знать не только сами результаты, но еще величину их ошибки и величину биологической вариации соответствующего аналита, будут понятны из дальнейшего. Прежде всего вспомним, что с целью оценки эффективности проводимой терапии клиницисты обычно просто сравнивают между собой результаты определения уровня аналита в повторных пробах пациента, делая затем те или иные выводы, исходя из того, какой из результатов оказался больше. Такая практика простого сравнения результатов зачастую может приводить к ошибочным выводам об эффективности проводимой терапии. Во-первых, потому что такое сравнение не учитывает тот факт, что у пациента уровень аналита *in vivo* подвержен биологической вариации относительно так называемой гомеостатической точки. А во-вторых, такое сравнение не учитывает, что абсолютно все результаты исследований уровней аналитов в пробах подвержены аналитической вариации, отклоняясь от своих реальных значений как в сторону их увеличения, так и в сторону их уменьшения. Причем в какую из сторон отклоняются результаты от своих реальных значений в пробах заранее никогда не известно. Поэтому в случае, когда результат исследования уровня аналита в повторной пробе одного и того же пациента, равный X_2 , окажется больше результата в предыдущей пробе, равного X_1 , то это никоим образом еще не будет означать, что и реальный уровень аналита во второй пробе пациента тоже стал больше. На самом деле, при таком соотношении результатов, то есть

когда $X_2 > X_1$, возможны три варианта соотношения реальных уровней: реальный уровень аналита в последующей пробе может или, как и сам результат, оказаться тоже больше, чем в предыдущей, или равным ему или меньше его. Чтобы в результате сравнения результатов X_1 и X_2 исследования уровня аналита в повторных пробах, когда второй результат больше первого (или наоборот меньше) можно было сделать уверенно вывод, что и реальный уровень аналита у пациента *in vivo* тоже реально изменился, необходимо, чтобы их разница $D=(X_1-X_2)$ по модулю $|D|=|X_1-X_2|$, то есть без учета знака, превысила некую величину RCV (Reference Change Value), зависящую, как станет видно из дальнейшего, от аналитической и биологической вариаций. Величину RCV называют показателем значимого отличия или просто критической разницей двух результатов. Значения этого показателя могут выражаться как в абсолютных единицах измерения аналита, тогда его будем обозначать как RCV, так и в относительных единицах (в процентах), тогда его будем обозначать как RCV(%). Эти значения вычисляют по нижеприведенным формулам:

$$RCV = Z \cdot \sqrt{2 \cdot (S_a^2 + S_i^2)} = \quad (1.1)$$

$$= Z \cdot \sqrt{2} \cdot \sqrt{S_a^2 + S_i^2} = 2,77 \cdot \sqrt{S_a^2 + S_i^2}$$

$$RCV(\%) = Z \cdot \sqrt{2 \cdot (CV_a^2 + CV_i^2)} = \quad (1.2)$$

$$= Z \cdot \sqrt{2} \cdot \sqrt{CV_a^2 + CV_i^2} = 2,77 \cdot \sqrt{CV_a^2 + CV_i^2}$$

где показатель $Z = 1,96$ для двухстороннего доверительного интервала, если выбрать 95% уровень доверительной вероятности; S_a – стандартное отклонение результатов (мера их аналитической вариации); S_i – стандартное отклонение внутрииндивидуальной вариации уровня аналита; CV_a – коэффициент аналитической вариации результатов; CV_i – коэффициент внутрииндивидуальной биологической вариации уровня исследуемого аналита *in vivo*. Аналитическая вариация характеризует разброс результатов, обусловленный неидеальными измерительными свойствами, внутренне присущими аналитической системе. Внутрииндивидуальная биологическая вариация характеризует вариабельность уровня аналита у одного и того же пациента относительно гомеостатической точки, что сказывается и на уровне аналита в пробах, взятых в разное у одного и того же пациента со стабильным клиническим состоянием.

В случаях, когда $|D| = |X_1 - X_2| > RCV$ или когда $|D, \%| = |100 \cdot (X_1 - X_2) / X_1| > RCV, \%$, можно с 95% надежностью полагать, что и реальный уровень аналита у пациента тоже стал меньше (или больше) именно из-за изменения его клинического состояния. Такой алгоритм сравнения становится абсолютно понятным, если вспомнить положения математической статистики о том, что разница двух независимых нормально распределенных случайных величин будет тоже являться случайной величиной, распределенной по нормальному закону с дисперсией, равной сумме дисперсий случайных величин. То

есть разница D результатов определения уровня аналита в повторных пробах пациента без изменения его клинического состояния будет как и сами результаты являться случайной величиной, распределенной по нормальному закону с математическим ожиданием M_D , равным или близким к нулю, и со стандартным отклонением S_D .

$$S_D = \sqrt{2} \cdot \sqrt{S_a^2 + S_i^2}$$

Формула для S_D разницы D результатов вытекает из известного свойства дисперсии о том, что дисперсия (в виде квадрата стандартного отклонения) суммы или разности двух независимых случайных величин, то есть результатов X1 и X2, равна сумме их дисперсий (в виде квадратов стандартных отклонений). В свою очередь, дисперсия (в виде квадрата стандартного отклонения) результатов измерений уровня аналита в повторных пробах одного и того же пациента с неизменным клиническим состоянием равна сумме $S_a^2 + S_i^2$, поскольку повторные пробы берутся обычно не в одно и то же время. Как следует из свойств нормального распределения, 95% всех разниц D будет попадать в интервал с границами $M_D - 1,96 \cdot S_D$ и $M_D + 1,96 \cdot S_D$ и только 5% этих разниц D будут выходить за пределы такого интервала. Таким образом, можно с 95% вероятностью утверждать, что если разница |D| по модулю (без учета ее знака) превышает величину $1,96 \cdot S_D$, которая как раз и есть тот самый показатель RCV, то это скорее всего означает, что дело не в аналитической и/или внутри-индивидуальной биологической вариации результатов определения уровня аналита у пациента, а в его изменении по иным причинам (например, из-за изменения клинического состояния пациента). Как следует из выше приведенных формул, чем больше аналитическая вариация результатов, то есть их стандартная ошибка S_a , тем больше должна быть разница между повторными результатами, чтобы можно было бы делать вывод, что их отличие является статистически значимым.

Ниже в примерах будет показано, насколько важно знать значения ошибки результатов исследований, вернее ее случайной и систематической составляющих. Предположим, что для одного и того же пациента в течение двух дней были получены для гемоглобина результаты 109 и 120 г/л, то есть разница результатов $|D|=11$ г/л. Предположим, что стандартная ошибка S_a гемоглобинометра, на котором были получены результаты, равна 3 г/л. Из [3] известно, что $CV_i=2,85\%$, то есть тогда для нашего случая $S_i=CV_i \cdot 109/100=3,11$ г/л. Значит из формулы (1.1) будет следовать, что для результатов с такой аналитической и биологической вариациями показатель RCV будет равен 11,97 г/л. Поскольку для этого случая разница $|D| < RCV$, то это означает, что полученные **результаты** статистически значимо **не отличаются друг от друга**, то есть их отличие обусловлено, скорее всего, их аналитическими и/или биологическими вариациями, и что нельзя быть уверенным в реальном изменении уровня гемоглобина у пациента. Если же предположить, что стандартная ошибка S_a у гемоглобинометра, на котором были получены результаты, не 3 г/л, а 2 г/л, то есть в 1,5 раза меньше, то для этих же результатов показатель RCV будет равен не 11,97 г/л, а 10,24 г/л, то есть на 1,73 г/л меньше. В этом случае, разница результатов $|D|$ будет больше RCV, и это будет означать, что полученные **результаты** статистически значимо **отличаются друг от друга**, и с 95% уверенностью можно полагать, что их отличие обусловлено уже не их аналитическими и/или биологическими вариациями а тем, что реальный уровень гемоглобина у пациента действительно изменился. Теперь предположим, что для получения тех же самых результатов

был использован идеальный гемоглобинометр, у которого стандартная ошибка S_a равна 0 г/л. Заметим, что и в случае идеального гемоглобинометра для этих же результатов показатель RCV из-за внутрииндивидуальной биологической вариации будет отличен от нуля и равен 8,62 г/л. То есть даже при использовании идеального гемоглобинометра все результаты повторных измерений уровня гемоглобина вблизи 109 г/л в пробах одного и того же пациента с разницей между ними не более 8,62 г/л не будут отличаться статистически значимо друг от друга. Их отличие в таких пределах будет обусловлено внутрииндивидуальной биологической вариацией уровня гемоглобина вокруг так называемой гомеостатической точки. И, наконец, предположим, что те же результаты были получены на гемоглобинометре со стандартной ошибкой S_a , равной 3 г/л, хоть и в пробах одного и того же пациента, но в условиях отсутствия биологической вариации для уровня этого аналита. Тогда для этих же результатов в 109 г/л и 120 г/л показатель RCV будет равен 8,31 г/л. Но в отличие от первого случая, их разница $|D|$ в 11 г/л будет уже превышать RCV, что будет указывать на изменение уровня гемоглобина у пациента из-за изменения его клинического состояния.

При скрининге или постановке диагноза клиницисты обычно сравнивают результаты определения уровня аналита с границами соответствующего референтного (нормального) диапазона. И в этом случае при сравнении результата X с границей нормы необходимо использовать соответствующий показатель значимого отличия RCV' . Чтобы можно было сделать уверенно вывод о том, что фактический уровень аналита у пациента действительно или выше верхней границы нормы H , или ниже нижней границы нормы L , или находится в пределах нормального диапазона, необходимо, чтобы разница между результатом, скорректированным на величину систематического смещения, и соответствующей границей нормы в единицах измерения уровня аналита $|D'|$ или в относительных единицах $|D'(\%)|$ превысила соответственно показатель RCV' или показатель $RCV'(\%)$, рассчитываемые по формулам:

$$RCV' = Z \cdot \sqrt{(S_a^2 + S_i^2)} = 1,96 \cdot \sqrt{S_a^2 + S_i^2} \quad (1.3)$$

$$RCV'(\%) = Z \cdot \sqrt{(CVA^2 + CVi^2)} = 1,96 \cdot \sqrt{CVA^2 + CVi^2} \quad (1.4)$$

где, как и ранее, показатель $Z=1,96$, если выбрать 95% уровень доверительной вероятности; S_a – стандартное отклонение результатов; S_i – стандартное отклонение внутрииндивидуальной вариации уровня аналита; CVA – коэффициент аналитической вариации результатов; CVi – коэффициент внутрииндивидуальной вариации уровня исследуемого аналита.

Разности $|D'|$ вычисляют как $|X' - L|$ или как $|X' - H|$, а разности $|D'(\%)|$ вычисляют как $|100 \cdot (X' - L)/X'|$ или как $|100 \cdot (X' - H)/X'|$. Результат $X' = (X - B_a)$ представляет собой результат X , скорректированный на величину систематического смещения используемой аналитической системы, которое обычно обозначают как B_a , и которое имеет знак плюс или минус. Предварительно величину систематического смещения B_a оценивают по данным результатов измерения уровня аналита в образцах контрольных материалов после проведения установочной серии. Уточнять это оценочное значение для систематической ошибки B_a можно только путём участия в программах внешней оценки качества (ВОК).

Других технологий или как говорят схем метрологического обеспечения измерений в лабораторной медицине пока не существует, по крайней мере, для большинства аналитов.

В последующих лекциях будут даны необходимые пояснения и примеры расчетов показателей RCV и RCV' , примеры проведения коррекции результата на величину его систематического смещения и примеры правильного и неправильного сравнения результатов между собой и с границами норм. Сейчас просто примем к сведению, что для возможности проведения адекватного сравнения результатов между собой и с границами норм **клиницистам необходима информация** о конкретных величинах систематической Ba (или $Ba, \%$) и случайной Sa (или CVa) составляющих ошибки текущих результатов определения уровня аналита, которые получают лаборатории на своих аналитических системах. Такую информацию о конкретных величинах Ba и Sa может предоставить клиницистам только лаборатория и более никто. Лаборатории должны обладать этой информацией, поскольку в соответствии с указаниями, изложенными в приказах №45 от 07.02.2000 и №220 от 26.05.2003 Минздрава РФ, значения Ba , $Ba, \%$, Sa и CVa определяются в обязательном порядке при запуске в эксплуатацию каждой новой аналитической системы на базе данных результатов измерений уровней аналитов в образцах контрольных материалов, полученных при проведении установочных серий. Собственно, на основании именно таким образом полученных значений для $Ba, \%$ и CVa лаборатория принимает решение о запуске новой или обновлённой аналитической системы в эксплуатацию, если они соответствуют установленным для них нормам. В документе [4] значения для Ba , $Ba, \%$, Sa и CVa , полученные на основании данных установочной серии, рекомендуется переопределять заново после техобслуживания или ремонта анализатора, входящего в состав аналитической системы, а также в случаях смены лотов реагентов и калибраторов.

В документе [4] и в вышеперечисленных приказах Минздрава РФ указывается, что требования к аналитическим характеристикам аналитических систем устанавливаются на базе внутри- и межиндивидуальной биологических вариаций. Решение о запуске аналитической системы в эксплуатацию принимается только в случае, если значения систематического смещения Ba (или $Ba, \%$) и стандартной ошибки Sa (или CVa), полученные по данным установочной серии, оказались меньше их предельно допустимых значений. Отметим, что при необходимости полученные в результате проведения установочной серии эксплуатационные значения для систематической Ba и случайной Sa ошибок можно уменьшать. Значение для Sa — за счёт увеличения кратности измерений уровня аналита в пробе, а значение для Ba — за счёт кратности измерений уровня аналита в калибраторах в процессе проведения процедуры калибровки.

Ввиду невысокой стабильности эксплуатационных значений систематического смещения Ba и стандартной ошибки Sa практически у всех сложных аналитических систем, прежде всего для их систематических смещений, выход которых за пределы установленных для них норм случаются в среднем 1 раз в несколько дней, лаборатории вынуждены вести ежедневный контроль за соответствием аналитических характеристик их нормам для каждой своей аналитической системы. Общепринятые технологии ведения такого контроля могут иметь задержку детекции вышеупомянутых поломок аналитических характеристик вплоть до 10 рабочих дней. Чтобы лаборатории не пришлось переделывать анализы, результаты которых были получены на вышедших из под контроля аналитических системах, то есть с даты фактической поломки до даты ее обнаружения, лаборатории

имеет смысл внедрить в практику современные технологии детекции поломок аналитических характеристик в режиме реального времени. В последующих лекциях речь будет идти об этом, а также о том, каким образом устанавливаются современные требования к аналитическим характеристикам аналитических систем, на что обращать особое внимание при определении рабочих значений для V_a и S_a , а также об алгоритмах их сравнения с установленными нормами.

Краткие выводы по Лекции 1:

1) для надежной интерпретации лабораторных результатов клиницистам помимо самих результатов необходимо в обязательном порядке учитывать их аналитические ошибки и величины соответствующих биологических вариаций уровней аналитов *in vivo*;

2) для выявления статистически значимого отличия результатов от границ референтного диапазона и друг от друга, причиной чего является изменение именно клинического состояния пациента, следует использовать соответствующие статистические показатели значимого отличия, которые зависят от величин аналитической вариации самих результатов, биологической вариации уровня аналита *in vivo* и от того, с чем они сравниваются;

3) измерительную информацию о текущих уровнях аналитов у пациентов в виде результатов и их ошибок клиницистам могут предоставлять только лаборатории, которые ведут должным образом ВКК для каждой из своих аналитических систем и участвуют с ними в программах ВОК.

И еще раз подчеркнем, что без предоставления лабораторией в клинику информации о биологических вариациях уровней аналитов *in vivo* и о рабочих значениях систематического смещения V_a и стандартного отклонения S_a для каждой эксплуатируемой аналитической системы клиницисты в принципе не могут и не смогут надежно интерпретировать результаты лабораторных исследований.

Литература к Лекции 1.

1. ГОСТ 8.061-80. Государственная система обеспечения единства измерений (ГСИ). Поверочные схемы. Содержание и построение.

2. ГОСТ ISO/IEC 17025-2019. Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий.

3. www.westgard.com/biodatabase1.htm

4. ГОСТ Р 53133.2-2008. Национальный стандарт РФ. «Технологии лабораторные клинические. Контроль качества клинических лабораторных исследований. Часть 2. Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов».