

ZÁKLADY STATISTIKY LABORATORNÍCH EXPERIMENTŮ

Miroslav POHANKA

Univerzita obrany, Fakulta vojenského zdravotnictví, Centrum pokročilých studií, Hradec Králové

Souhrn

Správná aplikace statistického aparátu je nezastupitelným aspektem jak v klinických, tak i výzkumných a vývojových laboratorních měřeních. Použití vhodných metod v popisné statistice a pochopení organizace experimentů z hlediska následné interpretace výsledků je však mnohdy nedostatečné. Tento přehledový text shrnuje základní statistické metody nezbytné pro správné pochopení laboratorního stanovení. Pojmy jako přesnost a správnost, limit detekce, mez stanovitelnosti, korelace, citlivost, odchylka a kalibrace jsou uvedeny v textu.

Klíčová slova: Statistika; Korelace; Limit detekce; Přesnost; Kalibrace; Korelační koeficient.

Introduction to Laboratory Experiments Statistics

Summary

Appropriate application of statistics is an unsubstitutable aspect of laboratory assay in research and development as well as clinical labs. Performance of good statistical methods and understanding of experiments in point of view of the achieved data interpretation is frequently poor. The present compilation includes basic statistical methods necessary for good comprehension of laboratory assay. The definitions such as precision and accuracy, limit of detection, limit of quantification, correlation, sensitivity, deviation and calibration are included in the text.

Key words: Statistics; Correlation; Limit of detection; Accuracy; Calibration; Correlation coefficient.

Úvod

Pojmy jako kalibrace, korelace a odchylka měření jsou zásadní termíny v laboratorních experimentech. Jejich správná aplikace se řídí nejen obecnými doporučeními v odborné literatuře, ale i především jednotlivými normami ISO (International Organization for Standardization). Tyto normy mohou být obecným doporučením – jako zásady kalibrace a použití referenčních materiálů (ISO Guide 32: 1997), nebo mohou upravovat konkrétní situaci, jako je například kalibrace dozimetrů (ISO/ASTM 51400:2003) nebo referenční měření v klinických laboratořích (ISO 15195:2003). Nevýhodou norem ISO je zpoplatněný přístup k jednotlivým normám.

Správné použití popisné statistiky je důležité z hlediska prezentace dat. Záměna některých na první pohled obdobných pojmů se snadno stane zavádějící. Příkladem může být přesnost a správnost metody. Cílem tohoto krátkého přehledu je shrnutí základních pojmů popisné statistiky používaných v klinických laboratořích i vědeckých experimentech. Pojmy jsou uvedeny přehlednou formou se snahou demonstrovat použití statistických metod na vybraných příkladech.

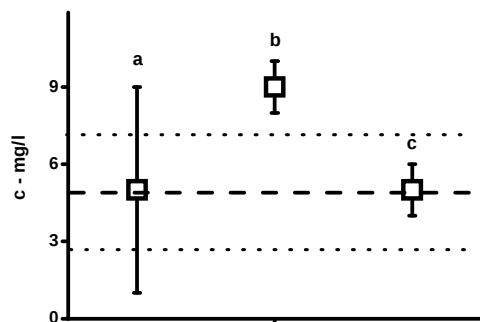
Vlastní pojmy

Analyt

Analyt je látka, kterou analyzujeme ve vzorku. Z definice není analyt vymezen pouze na chemické látky. Analytem může být antigen při použití imunometody, mikroorganismu aj. Při diagnostikách je pak analytem stanovovaný marker. Například při stanovování přítomnosti aflatoxinu v cereáliích je analytem právě aflatoxin.

Přesnost a správnost měření

Tyto termíny jsou velmi často nesprávně interpretovány. I když na první pohled mohou působit jako synonyma, jejich význam je zcela odlišný. Přehledně je příklad měření třemi metodami s různou přesností a správností uveden v obrázku 1. Jako přesnou označíme tu metodu (detektor, analytické zařízení...), která je zatížena jen malou směrodatnou odchylkou měření. Nepřesná metoda pak poskytne značný rozptyl měření. Neznamená to však, že přesná metoda je i správná. Pokud mluvíme o správnosti, pak máme na mysli, že při dostatečném opakování měření bude průměr korespondovat se skutečností, i když některá z jednotlivých měření mohou být odlehlá.



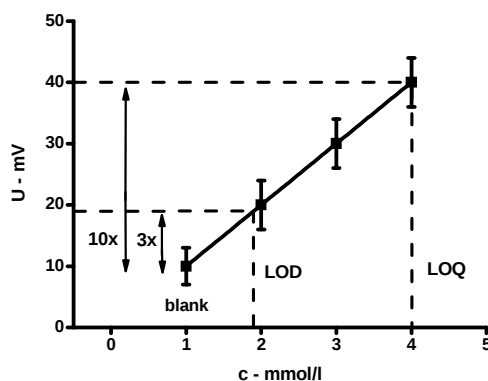
Obr. 1: Příklad stanovení koncentrace analytu třemi různými metodami a–c. Na ose y je pro ilustraci znázorněna hodnota hmotnostní koncentrace. Přerušovaná čarou je indikována skutečná koncentrace analytu a tečkovaná čarou pak přípustná nejistota měření. Uvedené rozsahy jsou pouze ilustrativní. Zatímco metoda a je správná (průměr odpovídá skutečné hodnotě), je však zároveň nepřesná – velký rozptyl měření nastíněný chybovými úsečkami. Metoda b je přesná (malá chyba měření), ale není správná. Výsledek je značně odlehlý od skutečné koncentrace analytu. Metoda c je přesná i správná.

Limit detekce a mez stanovitelnosti

V literatuře jsou pro tyto pojmy používány ustálené zkratky. Pro limit (též mez) detekce je to LOD (limit of detection) a pro mez stanovitelnosti pak LOQ (limit of quantification). Výpočet LOD a LOQ je často upravován pro konkrétní metody. LOD a LOQ jsou závislé především na chybě měření. Tato chyba může být reprezentována směrodatnou odchylkou nebo tzv. šumem, což je časová fluktuace měřeného signálu v nepřítomnosti analytu. LOD a LOQ závisí rovněž na citlivosti metody, tj. na strmosti kalibrační závislosti. Za LOD se považuje takové množství (koncentrace) analytu, které způsobí změnu měřeného signálu v rozsahu trojnásobku velikosti šumu. U LOQ je to pak desetinásobek. Obecně uznávaný výpočet pro kalibrační závislost lineární povahy je následující:

$$LOD = \frac{3 \times h}{sm} \quad LOQ = \frac{10 \times h}{sm}$$

kde h představuje ustálenou hodnotu signálu šumu nebo chybu signálu získaného měřením blanku a sm směrnici kalibrační závislosti. Pokud určíme přítomnost látky na hranici LOD, prokázali jsme její přítomnost 95% (hladina pravděpodobnosti $P = 0,05$), u LOQ pak na 99% ($P = 0,01$). Pro zpracování výsledků můžeme samozřejmě použít i jiných statistických metod, např. porovnat experimentální hodnoty ze série měření blanku a neznámého vzorku. Vyobrazení odhadu limitu detekce a meze stanovitelnosti na příkladu potenciometrické analýzy je znázorněno v obrázku 2.



Obr. 2: Příklad určení limitu detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ). Pro ilustraci byla zvolena potenciometrie jako modelová metoda. Měření blanku odpovídá prvnímu bodu v grafu. Trojnásobek a desetinásobek směrodatné odchylky na ose y a následný odhad LOD a LOQ svislicí na osu x z průsečíku s kalibrační přímkou je znázorněn přerušovanou linií.

Citlivost metody

Změna měřeného signálu vůči koncentraci měřeného analytu: dS/dc . U kalibrací s lineárním průběhem pak citlivost odpovídá směrnici této kalibrace. Je tedy zřejmé, že citlivá metoda je ta, která poskytne maximální změnu měřeného signálu v přítomnosti analytu. Často opakujícím se omylem je záměna limitu detekce a citlivosti. Jak je zřejmé z části věnované limitům detekce, citlivost metody značně ovlivňuje její limit detekce. Ovšem i citlivá metoda může mít velmi vysoký limit detekce, pokud je měření zatíženo velkou chybou.

Selektivita

Selektivita metody nám určuje, zda se na měřeném signálu mohou podílet i jiné faktory než jen stanovovaný analyt. Jestliže má metoda malou selektivitu, existuje velká pravděpodobnost získání falešně pozitivního výsledku. To může být velmi nepříjemné při detekci přítomnosti biologických a chemických agens. Falešně pozitivní stanovení může vzniknout také díky jevu, který se nazývá hystereze. Pojem hystereze značí paměť systému, tj. vliv minulých měření na měření současné.

Kalibrace

Obecné zásady platné pro kalibraci a použití standardů vycházejí z ISO/IEC 17025. Kalibrace je proces, při kterém hledáme závislost mezi měřeným signálem (např. absorbance, vznik potenciálu, velikost měřeného proudu aj.) a měřenou jednotkou (např. koncentrace látky v roztoku). Pro účely kalibrace je použit tzv. standard se známým množstvím analytu.

Z hlediska mechanismu použití rozlišujeme standardy vnější a vnitřní. Vnější standardy jsou používány nezávisle na vlastním analyzovaném vzorku. Kalibrace pomocí vnějších standardů se odehrává před začátkem vlastních měření neznámého vzorku. Kalibrace vnitřní využívá definovaného přídatku standardu do analyzovaného vzorku a následné porovnání změněného signálu se signálem původním. I když použití vnitřních standardů je zpravidla rychlejší a jistou výhodou představuje i fakt, že vlastní analýza i kalibrace probíhá téměř ve stejném čase, bývají výsledky měření s vnitřními standardy hůře reprodukovatelné.

Ideální kalibrace je lineární. Nicméně při velkém rozsahu standardů se kalibrace stává sigmoidní. Z důvodů dosažení linearity se některé kalibrace, zvláště v potenciometrii, realizují po matematické transformaci na semilogaritmické vynesení signálu vůči koncentraci. Lineární rozsah kalibrace udávaný v počtu desetinných míst (řádů) koncentrace analytu se velmi často považuje za ukazatel kvality metody.

Odchylka a nejistota měření

V rámci opakovaných měření můžeme stanovit tzv. očekávanou hodnotu měření, která odpovídá poloze rozdělení na ose reálných čísel. Rozložení hodnot na ose reálných čísel odpovídá tzv. rozptylu σ^2 . Směrodatná odchylka měření σ je pak druhou odmocninou rozptylu měření a relativní směrodatná odchylka jejím procentuálním vyjádřením vzhledem k průměru měření. Matematicky můžeme směrodatnou odchylku měření vyjádřit jako odmocninu sumy čtverců rozdílů hodnot jednotlivých měření x od průměrné hodnoty μ vydělenou množstvím opakování měření N :

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^2}$$

Pro Gaussovo (normální) rozdělení hodnot platí, že v rozsahu $\mu \pm \sigma$ leží 68 % dat. Pro interval $\mu \pm 2\sigma$ je to 95 % a pro $\mu \pm 3\sigma$ pak 99 % experimentálních dat. Se směrodatnou odchylkou měření souvisí další parametr, a to je nejistota měření u . Při použití metodiky, která poskytuje nejen přesné, ale i správné výsledky můžeme nejistotu měření ztotožnit se směrodatnou odchylkou. V reálných podmínkách je však nejistota měření větší. Nejistota měření má aditivní charakter, výsledná kombinovaná nejistota pak může být vyjádřena jako vliv dílčích nejistot měření hodnoty x , výsledná nejistota se pak nazývá kombinovaná standardní nejistota u_c :

$$u_c(x) = \sqrt{u_A^2(x) + u_B^2(x)}$$

Jako příklad kombinované nejistoty můžeme zjednodušeně uvést stanovení obsahu glutathionu v krevní plazmě. Zatímco nejistota u_A je způsobena chybou při zpracování krve (např. pipetování či jiná manipulace se vzorkem), u_B je již vlastní chyba měření (např. HPLC nebo fotometrické stanovení).

Obdobně jako pro směrodatnou odchylku a Gaussovo rozdělení můžeme stanovit i intervaly spolehlivosti ve formě rozšířené nejistoty U . Je to knásobek kombinované standardní nejistoty. Pro $k = 1$ leží v daném intervalu 68 % experimentálních dat, pro $k = 2$ je to 95 % ($P = 0,05$) a pro $k = 3$ pak 99 % ($P = 0,01$).

$$U = k \times u_c(x)$$

Reprodukovatelnost a opakovatelnost

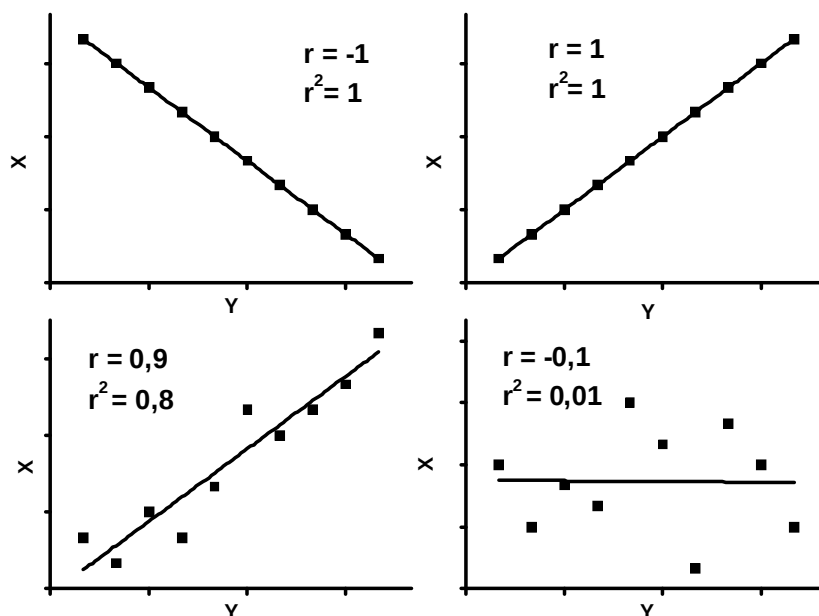
Když mluvíme o chybě měření, máme na mysli směrodatnou odchylku nebo relativní směrodatnou odchylku získanou sérií měření téhož vzorku. Tato měření jsou však prováděna v daném čase. Opakovatelnost nepřímě odpovídá chybě měření vykonané tou samou osobou na stejném pracovišti a se stejným vzorkem s časovým odstupem. Pokud je metoda opakovatelná, je výsledek opakované analýzy statisticky nerozlišitelný od původního měření. Na rozdíl od opakovatelnosti reprodukovatelnost vypočítává o chybě při reprodukci výsledků s daným vzorkem a stejnou metodou v jiné laboratoři.

Korelace

Korelace je proces, při kterém hledáme souvislosti mezi dvěma nezávislými veličinami. Pearsonův korelační koeficient je číselným vyjádřením těsnosti korelace. Pro soubor vzájemně přiřazených proměnných hodnot X a Y v celkovém počtu bodů N lze korelační koeficient r vypočítat podle následujícího vzorce:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^N XY - \frac{\sum_{i=1}^N X \sum_{i=1}^N Y}{N}}{\sqrt{\left(\sum_{i=1}^N X^2 - \frac{(\sum_{i=1}^N X)^2}{N}\right) \left(\sum_{i=1}^N Y^2 - \frac{(\sum_{i=1}^N Y)^2}{N}\right)}}$$

Statistické software jsou vybaveny nástroji pro výpočet korelačního koeficientu. Vzhledem k časové náročnosti výpočtu Pearsonova korelačního koefi-



Obr. 3: Příklad rozdílných korelací. V každém grafu je vyobrazen korelační koeficient (r) a koeficient determinace (r^2). Horní grafy představují extrémně těsný vztah, kdy proměnné jsou si nepřímo (vlevo) a přímo (vpravo) úměrné. Graf vlevo dole představuje velmi těsnou závislost.

cientu je proto dávána přednost právě příslušnému softwaru. Při použití softwaru je však třeba dát pozor na správnou terminologii. Korelační koeficient (r) je velmi často zaměňován za koeficient determinace r^2 (viz níže) díky nesprávným překladům softwaru do českého jazyka. Korelační koeficient může nabývat hodnot v rozmezí -1 až 1 . Při 2D grafickém vynesení pak záporný korelační koeficient odpovídá záporné směrnici a kladný koeficient kladné směrnici. Mezním případem je korelační koeficient 0 , kdy žádná korelace nebyla nalezena a experimentální hodnoty jsou nejčastěji zcela náhodně rozptýleny. Korelační koeficient může nabýt nulové hodnoty také v některých specifických situacích, ty však nejsou typické pro běžná stanovení. Pokud se hodnota korelačního koeficientu blíží 1 nebo -1 , hodnoty se stávají uspořádanými a mezní korelací při hodnotách 1 a -1 je pak přímka. Příklady čtyř grafů s různou mírou korelačního koeficientu jsou vyobrazeny v obrázku 3.

Pro posouzení těsnosti vztahu dvou proměnných můžeme rozlišit míru korelace jako zanedbatelnou do $0,2$ ($-0,2$), v rozmezí $0,2$ až $0,4$ ($-0,2$ až $-0,4$) tento vztah není příliš těsný, pro hodnoty $0,4$ až $0,7$ ($-0,4$ až $-0,7$) se vztah stává těsným. Při dalším zvýšení korelačního koeficientu na hodnotu $0,7$ až $0,9$ ($-0,7$ až $-0,9$) je pak vztah velmi těsný. Nad hodnotu $0,9$ ($-0,9$) mluvíme o extrémně těsném vztahu.

S korelačním koeficientem úzce souvisí pojem koeficient determinace (r^2). Jedná se o druhou mocninu korelačního koeficientu. Nabývá hodnot od 0

do 1 . Lze říci, že koeficient determinace vypovídá o interpretovatelnosti modelu na daná data. Např. koeficient determinace $r^2 = 0,95$ vypovídá o faktu, že 95 % hodnot proměnné y může být vysvětleno korelací na proměnnou x .

Závěr

Správná aplikace statistického aparátu je nezbytnou součástí laboratorních experimentů. I přes dobrou dostupnost statických softwarů a rychlé zpracování dat je nutné správně používat základní přístupy k plánování experimentů. Velmi snadno dochází ke špatné interpretaci pojmů, jak bylo např. uvedeno u pojmů přesnost a správnost či citlivost a limit detekce. Tato práce si kladla za cíl shrnout důležité aspekty týkající se popisné statistiky v chemických, biologických a klinických laboratořích přehlednou formou.

Korespondence: Kpt. RNDr. Miroslav Pohanka, Ph.D.
Univerzita obrany
Fakulta vojenského zdravotnictví
Centrum pokročilých studií
Třebešská 1575
500 01 Hradec Králové
e-mail: rau@atlas.cz

Do redakce došlo 28. 7. 2009