

Protocollo operativo per la verifica della comparabilità dei risultati di laboratorio ottenuti su più procedure analitiche

Matteo Vidali¹, Andrea Padoan^{2,7}, Ruggero Dittadi³ per il Gruppo di Studio Statistica per il laboratorio, Duilio Brugnoli⁴, Anna Carobene⁵, Sonia Mattioli⁶ per il Gruppo di Studio Qualità Analitica, Laura Sciacovelli⁷, Ferruccio Ceriotti⁸ per il Gruppo di Studio Qualità e Accreditamento.

¹SCDU Biochimica Clinica, AOU Maggiore della Carità, Novara

²Dipartimento di Medicina-DIMED, Università degli Studi di Padova

³Laboratorio Analisi, Ospedale dell'Angelo, ULSS 3 Serenissima, Mestre

⁴Laboratorio Analisi, ASST Spedali Civili di Brescia

⁵Servizio di Medicina di Laboratorio, Ospedale San Raffaele, Milano

⁶Laboratorio di Patologia Clinica, ASST Valcamonica, Esine (BS)

⁷Unità Operativa Complessa Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale-Università degli Studi di Padova

⁸Laboratorio Analisi, Fondazione IRCCS Ca' Granda, Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

ABSTRACT

Protocol to verify the comparability of quantitative laboratory results obtained with different measurement procedures. With the growth and merging of clinical laboratories, very frequently analytical tests are performed on multiple instruments within one or multiple locations. In these situations, there is the need of verifying the comparability of patient results obtained with different analysers and/or different measurement procedures. The importance of this verification is further emphasised when considering that it is included into the ISO 15189 specifications. This protocol provides step-by-step guidance on how to assess results comparability in different scenarios. Up to four experimental designs are presented to meet laboratories' needs, with details and examples on frequency of testing, definition of acceptability criteria, samples selection, sample size calculation, statistical analysis and reporting.

INTRODUZIONE

Oltre il 60-70% delle decisioni mediche si basa sui risultati di esami di laboratorio; le attività svolte dal laboratorio clinico (in termini di numerosità di analisi effettuate, complessità del repertorio degli esami disponibili e delle modalità di erogazione del servizio, 24 ore su 24 e 365 giorni all'anno) sono in progressivo incremento; l'esigenza di garantire da un lato la qualità, l'efficacia e la sicurezza del paziente e, dall'altro, di contenere i costi, porta al consolidamento del numero delle strutture eroganti e alla razionalizzazione degli esami disponibili (1-8).

Uno degli elementi che caratterizza molti dei mutamenti sopra descritti è rappresentato dall'utilizzo di più di una procedura analitica (in genere da due a

quattro) per la determinazione degli stessi misurandi.

In questo contesto, il livello di comparabilità dei risultati relativi allo stesso misurando determinato su più procedure analitiche, sia identiche che diverse, diventa un elemento fondamentale da valutare e monitorare nelle procedure di assicurazione della qualità, in modo da garantire l'armonizzazione e l'intercambiabilità nello spazio e nel tempo dei risultati, e di non dar luogo a misinterpretazioni nel processo clinico-decisionale.

Le occasioni in cui il professionista di laboratorio è impegnato nel garantire la comparabilità dei risultati sono numerose ed eterogenee. Un esempio non esaustivo è rappresentato dalle seguenti situazioni: la necessità di erogare esami in tempi brevi (esami in regime di urgenza/emergenza), garantendo la continuità del servizio in caso di interruzioni contingenti (ad

Corrispondenza a: Matteo Vidali, SCDU Biochimica Clinica, AOU Maggiore della Carità, c.so Mazzini 18, 28100 Novara (NO), tel: +3903213733036, matteo.vidali@gmail.com

Ricevuto: 12.05.2019

Revisionato 16.05.2019

Accettato: 16.05.2019

Pubblicato on-line: 23.05.2019

DOI: 10.19186/BC_2019.047

esempio guasto di uno strumento o sospensione delle attività per interventi programmati); la presenza di più laboratori all'interno della stessa area geografica (ad esempio quelli organizzati secondo il modello hub & spoke); la necessità di erogare esami in prossimità del sito di cura del paziente [ad esempio Point of Care testing (POCT)], oppure laboratori satelliti situati vicino a percorsi terapeutici mirati, come gli ambulatori per le terapie chemioterapiche o quelli per il monitoraggio della terapia anticoagulante. Inoltre, può essere necessario valutare il livello di comparabilità dei risultati anche in concomitanza di variazioni nel lotto di reagenti e/o calibratori, nuove calibrazioni, manutenzioni o altre operazioni routinarie o straordinarie a carico di una sola procedura analitica (9).

L'importanza della necessità di valutare questo aspetto è confermata dal fatto che esso rientra tra i requisiti dello Standard Internazionale per l'Accreditamento dei laboratori medici, la norma ISO 15189:2012 (10). Al punto 5.6.4, infatti, si declina la necessità di definire delle modalità per confrontare procedure, strumenti e metodi e di stabilire la comparabilità dei risultati ottenuti sui campioni dei pazienti lungo intervalli clinicamente appropriati. Si richiede, inoltre, che il laboratorio informi gli utenti di eventuali differenze evidenziate e discuta con loro le possibili implicazioni per la pratica clinica. Infine, il laboratorio deve documentare e registrare le verifiche effettuate, agendo rapidamente con opportune azioni correttive qualora gli esperimenti di comparabilità evidenzino problemi o carenze significative.

Da un punto di vista concettuale, possono ritenersi comparabili i risultati le cui differenze non superano un valore di accettabilità definito tenendo conto dell'impatto che le differenze osservate tra i risultati hanno sull'interpretazione e decisione clinica nella situazione specifica in cui vengono valutati (11).

L'elemento chiave nella pianificazione di una procedura per la verifica della comparabilità dei risultati è quindi la definizione del limite massimo di accettabilità delle differenze tra i risultati ottenuti dalle procedure analitiche considerate. A questo proposito, in letteratura sono numerosi gli esempi che utilizzano le specifiche di qualità basate sulla gerarchia di cinque modelli stabilita durante la conferenza di Stoccolma del 1999 (12), rivista e semplificata in soli tre modelli durante la prima conferenza strategica di EFLM, svoltasi a Milano nel 2014 (11, 13). In particolare, per fissare limiti di bias e/o di imprecisione, il criterio ampiamente utilizzato si basa sulla variabilità biologica (VB) (14-20).

Nel pianificare una procedura per la verifica della comparabilità dei risultati, occorre inoltre tener conto di tutte le variabili che possono influire sulla definizione delle modalità di esecuzione delle verifiche e che possono condizionare la loro realizzazione ed il risultato finale.

Il grado di standardizzazione/armonizzazione delle procedure analitiche messe a confronto è un primo importante aspetto da prendere in considerazione

(21,22). Gli schemi sperimentali delle prove, infatti, potrebbero essere differenti nel caso in cui le procedure analitiche da confrontare siano identiche (ad esempio strumenti gemelli all'interno di un CoreLab), parzialmente sovrapponibili (ad esempio metodi diversi ma tracciabili agli stessi standard di riferimento) o completamente differenti (ad esempio strumento principale in laboratorio e strumento POCT in sede decentrata).

Analogamente, la tipologia di campioni utilizzati negli esperimenti possono rappresentare un elemento critico quando si usano materiali di controllo, soprattutto per problemi di commutabilità nei confronti delle procedure analitiche messe a confronto (23). Anche in questo caso è possibile contrapporre una situazione ideale (utilizzo di campioni di pazienti) ad altre meno ottimali (utilizzo di materiali di controllo sintetici), ma che possono mantenere una loro validità qualora le procedure analitiche messe a confronto siano identiche o comunque riferibili agli stessi standard metrologici.

Per questi motivi, i gruppi di studio SIBioC "Statistica per il Laboratorio", "Qualità analitica" e "Qualità e Accreditamento" hanno ritenuto opportuno sviluppare un protocollo per la verifica della comparabilità dei risultati tra procedure analitiche, identiche o differenti, caratterizzato dai quattro diversi disegni sperimentali riportati di seguito.

- Disegno 1: utilizzo di replicati di campioni singoli (o pool) di pazienti o materiali di controllo commutabili a 2 (massimo 3) livelli di concentrazione scelti dal laboratorio.
- Disegno 2: utilizzo di dati pregressi del Controllo di Qualità Interno (CQI) a 2 (massimo 3) livelli di concentrazione scelti dal laboratorio.
- Disegno 3: utilizzo di una serie di campioni di pazienti aventi concentrazione del misurando all'interno di un intervallo del $\pm 25\%$ rispetto a 2 (massimo 3) livelli di concentrazione scelti dal laboratorio.
- Disegno 4: utilizzo di campioni di pazienti selezionati in un intervallo di concentrazione più ampio possibile.

Al di là delle peculiarità dei differenti disegni, descritte nei paragrafi dedicati, il protocollo può essere riassunto nelle 4 fasi schematizzate in Figura 1:

- fase di pianificazione;
- fase di raccolta dei dati sperimentali;
- fase di analisi statistica dei dati;
- fase decisionale.

Durante la prima fase, vengono raccolte informazioni sulle caratteristiche e sulle prestazioni analitiche delle procedure messe a confronto, vengono definiti la frequenza di esecuzione delle verifiche e i limiti di accettabilità del bias e viene selezionato il disegno sperimentale (inclusi i materiali, i livelli di concentrazione ed il numero dei replicati). Nella seconda fase vengono raccolti i campioni o i dati (nel caso del disegno 2) e viene condotto l'esperimento di verifica della comparabilità delle procedure analitiche. Nella terza

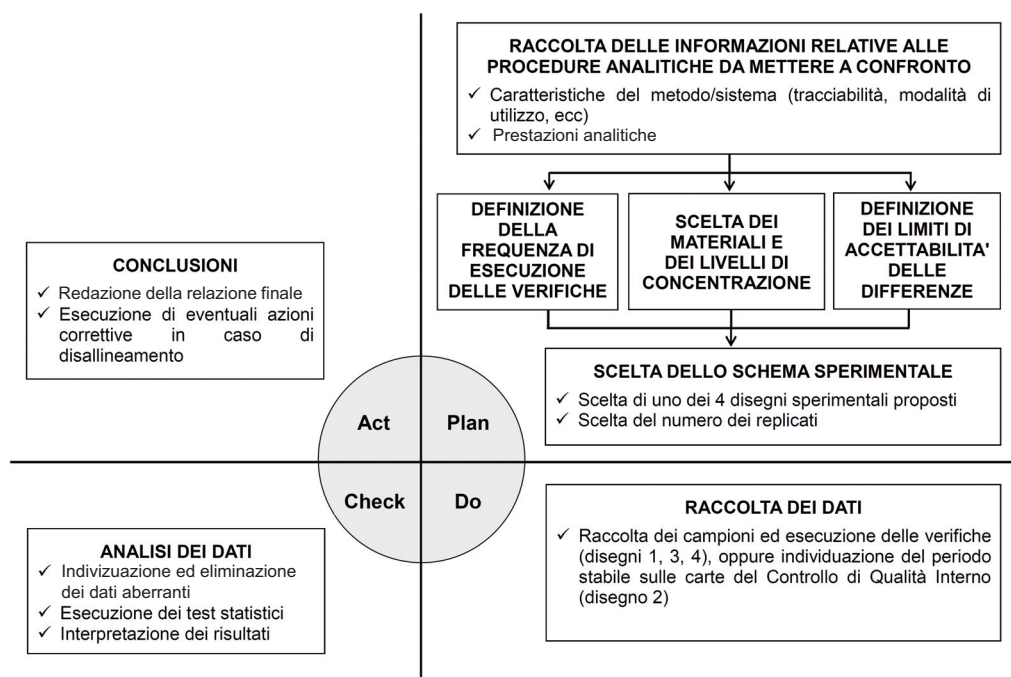


Figura 1

Sequenza delle fasi di pianificazione e implementazione delle attività.

fase, i dati ottenuti vengono analizzati tramite opportuni metodi statistici (test per dati aberranti, calcolo dell'intervallo di confidenza del bias). Infine, nell'ultima fase, sulla base dell'analisi statistica, vengono definite le eventuali azioni correttive in caso di disallineamento e viene redatta una relazione finale.

Nei prossimi paragrafi queste fasi saranno trattate nel dettaglio, fornendo elementi teorici e suggerimenti per una migliore comprensione e una più facile conduzione dell'esperimento di verifica della comparabilità dei risultati di laboratorio. Inoltre, nel materiale supplementare (S1) allegato a questo protocollo sono mostrati 4 esempi pratici in cui vengono applicati i 4 disegni presentati.

Scopo e campo di applicazione

Lo scopo di questo documento è quello di definire un protocollo operativo, facilmente applicabile, per la verifica della comparabilità dei risultati (comunemente conosciuta nei laboratori clinici come allineamento strumentale) ottenuti da due o più procedure analitiche, uguali o differenti (per produttore, modello, reagenti e/o calibratori), localizzate nello stesso laboratorio o in laboratori diversi, o tra situazioni analitiche differenti (ad esempio per variazioni significative in seguito a cambio di lotto dei reattivi), utilizzando validi metodi statistici e opportuni criteri di accettabilità.

In questo documento, per "procedura analitica" si intende l'insieme delle procedure, apparecchiature e

metodi utilizzati per la determinazione dei valori dei misurandi (10).

Il protocollo è applicabile a tutte le procedure analitiche che producano risultati quantitativi su scala continua.

Il protocollo assume, inoltre, che le procedure analitiche oggetto della verifica operino entro parametri di qualità fissati dal singolo laboratorio, in accordo a specifiche di qualità definite a livello nazionale o internazionale.

La sola verifica della comparabilità dei risultati non garantisce che i risultati ottenuti dalle procedure analitiche oggetto della valutazione siano accurati, ma solo che i risultati forniti dalle varie procedure analitiche siano tra loro comparabili, in accordo con i criteri definiti in questo documento.

PROTOCOLLO OPERATIVO

Raccolta delle informazioni relative alle procedure analitiche da mettere a confronto

Prima di iniziare la verifica della comparabilità dei risultati ottenuti su più di una procedura analitica, è utile essere a conoscenza delle caratteristiche delle procedure analitiche messe a confronto, in particolare principio del metodo, tipologia di reagenti e calibratori, tracciabilità metrologica della procedura analitica,

intervalli di riferimento, imprecisione, esattezza, e quant'altro.

Ai fini dell'applicazione di questo protocollo, è necessario conoscere l'imprecisione intermedia (o entro il laboratorio) a vari livelli di concentrazione (almeno due livelli e comunque in corrispondenza di eventuali valori decisionali) dei misurandi per le differenti procedure analitiche (24). Questa informazione può essere ottenuta revisionando i dati dei CQI relativi ad un lungo periodo (4-6 mesi).

Definizione della frequenza di esecuzione delle verifiche

Sono riportate di seguito le tempistiche suggerite per la verifica:

- Tempo 0: verifica della comparabilità dei risultati in riferimento allo stesso misurando ottenuti su più di una procedura analitica (25-26).
- Periodico (in relazione alla numerosità, alla frequenza di esecuzione dell'esame e alle risorse del laboratorio): si consiglia di effettuare la verifica con periodicità semestrale. Periodicità inferiori ai 6 mesi (definite sulla base delle strategie ed esigenze del laboratorio ed approvate dal direttore) sono auspicabili in particolare per quei misurandi con elevato numero di richieste e misurati quotidianamente.
- Straordinario: la verifica può essere effettuata, se necessario, ogni volta che si evidenzino situazioni fuori controllo del sistema (come per esempio il superamento di traguardi analitici, le VEQ fallite, le modifiche sostanziali dei parametri di qualità analitica sotto controllo).
- Nuovo strumento: prima dell'introduzione di utilizzo di una procedura nuova analitica, deve essere effettuata la verifica della comparabilità tra la procedura analitica in uso e quella di nuova introduzione, in accordo allo specifico protocollo (26), al fine di evidenziare variazioni che possano inficiare l'interpretazione dei risultati. Una volta stabilita la comparabilità tra metodi, deve essere verificata la comparabilità dei risultati tra tutte le procedure analitiche in uso (Tempo 0).

Scelta dei materiali con cui eseguire le verifiche

Materiali utilizzabili:

- Campioni di pazienti: sono il materiale di scelta per la verifica della comparabilità dei risultati. Non devono essere utilizzati campioni contenenti noti interferenti. Lo svantaggio principale dell'utilizzo di campioni singoli consiste nella scarsità del materiale, qualora il campione debba essere utilizzato per la verifica su numerose strumentazioni.
- Pool di campioni di pazienti (compresi pool preparati e congelati): il principale vantaggio consiste nella disponibilità di materiale e nella diluizio-

ne di eventuali interferenti; tuttavia, il mescolamento ed il congelamento di campioni possono causare artefatti, per cui la letteratura suggerisce di verificare la commutabilità del pool prima dell'utilizzo (27-28).

- Materiali di controllo e materiali per VEQ: presentano il vantaggio di essere facilmente reperibili; tuttavia, a meno che ne sia dimostrata o verificata la commutabilità (27), possono essere utilizzati per valutare la comparabilità solo delle procedure analitiche identiche (identica strumentazione, in riferimento al produttore e al modello, ed identico produttore e lotto per reagenti e calibratori).

Definizione dei limiti di accettabilità delle differenze

Per stabilire se due o più procedure analitiche forniscono risultati comparabili, è necessario verificare se le differenze riscontrate siano inferiori a un limite massimo di scostamento accettabile, stabilito a priori, che in questo documento è definito "bias massimo accettabile".

Dei tre modelli da cui derivare i goal analitici, definiti nella prima conferenza strategica della EFLM di Milano (11, 13, 29-37), questo protocollo, ai fini dell'applicabilità e dell'operatività, suggerisce l'utilizzo dei modelli basati sullo "stato dell'arte" (38-44) o sulla VB del misurando (30, 45-59). La scelta di uno dei modelli spetta al laboratorio sulla base delle caratteristiche della procedura analitica oggetto di valutazione e sullo scopo d'uso dell'esame.

Modello basato sullo stato dell'arte

Definito l'errore totale accettabile (ET_A) sulla base delle evidenze presenti in letteratura, il bias massimo accettabile sarà calcolato secondo la seguente formula:

$$bias_{max}\% = ET_A\% - 1,65CV_A$$

$$\text{oppure } bias_{max}\% = ET_A\% - 1,65DS_A$$

dove $ET_A\%$ o ET_A rappresenta l'errore totale accettabile scelto (espresso rispettivamente in percentuale o nelle stesse unità del misurando), CV_A l'imprecisione analitica entro il laboratorio espressa in %, e DS_A l'imprecisione espressa nelle stesse unità di misura del misurando.

Il bias massimo accettabile deve essere calcolato utilizzando il CV_A o la DS_A maggiore tra tutte le procedure analitiche oggetto di verifica. Inoltre, poiché l'imprecisione generalmente varia lungo l'intervallo di concentrazione, è necessario calcolare il bias massimo accettabile in varie regioni dell'intervallo di misura (cioè se si scelgono 2 livelli di concentrazione, sarà necessario calcolare le imprecisioni alle due concentrazioni o in prossimità di queste e usare l'imprecisione maggiore per calcolare il bias, ottenendo il bias minore).

Nel caso si utilizzino goal analitici fissati da autorevoli organizzazioni e dai Provider di VEQ, ed il Provider

indichi i limiti di accettabilità del risultato della VEQ (considerato ET_A) come scarto z del proprio gruppo di metodo, è necessario ricalcolare il valore $ET_A\%$ utilizzando la DS e la concentrazione del materiale utilizzato per la VEQ. In questo caso occorre utilizzare l' ET_A corrispondente alla concentrazione (il più vicina possibile) dei campioni utilizzati per la verifica della comparabilità dei risultati, che deve essere calcolato come media dei valori ottenuti nei differenti esercizi su materiali di concentrazione simile.

Modello basato sulla variabilità biologica del misurando

La letteratura più recente (20) suggerisce di utilizzare un bias massimo accettabile pari a $0,33 CV_I$ (o $CV_I/3$), dove CV_I rappresenta la VB intraindividuale. Occorre, tuttavia, notare che questo traguardo si ottiene quando i CV_A delle due procedure analitiche sono entrambi uguali e molto prossimi allo 0%. In presenza di imprecisioni analitiche $>0\%$, ma comunque entro il valore desiderabile ($\leq 0,5 CV_I$), è necessario ricalcolare il valore di bias massimo accettabile per una determinata coppia di procedure analitiche sulla base della VB di quel particolare misurando. Infatti, dati i valori di CV_{A1} , CV_{A2} (imprecisioni analitiche delle 2 procedure analitiche) e CV_I , il bias massimo accettabile risulta uguale a (20):

$$bias_{max}\% = 3,10CV_I - 1,96 \times \sqrt{CV_{A1}^2 + CV_{A2}^2 + 2CV_I^2}$$

In presenza di K procedure analitiche, prese a due a

due, con $K(K-1)/2$ possibili bias, si selezionerà il bias minore (soluzione più conservativa).

È necessario sottolineare che il bias massimo accettabile, calcolato secondo il modello della VB con la formula presentata, andrebbe utilizzato in particolare per analiti, sotto controllo omeostatico, impiegati prevalentemente per il monitoraggio nel tempo. Inoltre, anche alla luce dei recenti dati di European Biological Variation Study (EuBIVAS) (46-59), tale bias potrebbe risultare troppo ridotto e difficilmente verificabile o raggiungibile dalle strumentazioni attualmente disponibili.

In alternativa, il protocollo raccomanda l'utilizzo della formula descritta per il modello "stato dell'arte":

$$bias_{max}\% = ET_A\% - 1,65CV_A$$

dove CV_A rappresenta l'imprecisione analitica entro il laboratorio e $ET_A\%$ l'errore totale accettabile derivato dai dati di VB e reperibile in letteratura.

DISEGNI SPERIMENTALI

In questo protocollo sono presentati 4 diversi disegni sperimentali per verificare la comparabilità dei risultati ottenuti su due o più procedure analitiche per lo stesso misurando. Le differenze tra i singoli disegni dipendono dai materiali utilizzati, dalla numerosità campionaria, dai metodi statistici e dalle risorse disponibili per la conduzione dell'esperimento. La Tabella 1 illustra brevemente una comparazione dei differenti schemi proposti.

Tabella 1

Confronto dei 4 disegni sperimentali proposti per la verifica della comparabilità dei risultati ottenuti su più di una procedura analitica per lo stesso misurando.

Disegno	Descrizione	Dimensione campionaria	Vantaggi	Svantaggi
1	Replicati di campioni singoli (o pool) di pazienti o materiali di controllo commutabili (commutabilità dimostrabile con evidenze oggettive) a 2 (massimo 3) livelli di concentrazione scelti dal laboratorio	Determinata da criteri statistici	- Verifica di bias assoluti e/o percentuali ad una specifica concentrazione - potenza statistica predefinita	- Maggiori costi - necessità di adeguate quantità di materiale - difficoltà di programmazione del protocollo (ripetizione campioni) su alcune piattaforme automatizzate
2	Dati pregressi del CQI a 2 (massimo 3) livelli di concentrazione scelti dal laboratorio.	Determinata da criteri statistici	- Verifica di bias assoluti e/o percentuali ad una specifica concentrazione - potenza statistica predefinita - utilizzo di dati già disponibili (costo zero) - maggiore frequenza di verifica	- Necessaria commutabilità dei materiali di controllo, in caso contrario il disegno è utilizzabile solo se le procedure analitiche sono identiche (stessi strumenti, stesso lotto reagenti, stesso calibratore) - comparabilità dei risultati verificabile solo alle concentrazioni dei materiali di controllo
3	Serie di campioni di pazienti aventi concentrazione del misurando all'interno di un intervallo del $\pm 25\%$ rispetto a 2 (massimo 3) livelli di concentrazione scelti dal laboratorio.	Determinata da criteri statistici	- Verifica di bias assoluti e/o percentuali - potenza statistica predefinita - minori costi rispetto al disegno 1	Non facile reperimento dei campioni

Tabella 1
Continua

Disegno	Descrizione	Dimensione campionaria	Vantaggi	Svantaggi
4	Campioni di pazienti lungo un ampio intervallo di concentrazioni	Fissa	- Minori costi rispetto al disegno 1 - semplicità di esecuzione - valutazione della comparabilità dei risultati su un ampio intervallo di misura	- Potenza statistica non determinata - necessità di verificare la distribuzione delle differenze

La scelta di uno dei disegni proposti è sotto la responsabilità del direttore del laboratorio e potrà dipendere dalle diverse situazioni, tra cui le risorse disponibili presso la struttura, il bias massimo accettabile per il misurando in studio e le prestazioni della procedura analitica. Tuttavia, il presente protocollo suggerisce alcune situazioni in cui un disegno è preferibile agli altri (i disegni sono elencati in ordine di preferenza, così come suggerito dagli autori del protocollo) (Tabella 2).

Qualora debbano essere comparate procedure analitiche identiche, il protocollo raccomanda l'utilizzo del disegno 2 e, qualora sia necessario valutare in un secondo tempo la comparabilità tra le procedure anche con campioni umani oppure in presenza di risultati non comparabili, i disegni 3-4 o il disegno 1 (terza scelta in considerazione dell'onerosità del disegno sperimentale).

Se le procedure analitiche non fossero identiche, il disegno 2 non potrebbe essere utilizzato, a meno di dimostrare la commutabilità dei materiali di controllo, ed il protocollo raccomanda l'utilizzo dei disegni 3 o 4 e, come seconda opzione, il disegno 1.

Infine, per verificare la comparabilità tra procedure analitiche e POCT, il protocollo raccomanda i disegni 4 o 3 e, come seconda opzione il disegno 1. Si noti, tuttavia, che nell'eventualità relativamente frequente che le procedure analitiche e i POCT presentassero variazioni di ripetibilità molto differenti, sarebbe necessario utilizzare le formule modificate per i disegni 1 e 3 come descritto nei rispettivi paragrafi.

Disegno 1 (replicati di campioni singoli o in pool o materiali di controllo commutabili)

Il disegno 1 può essere utilizzato per valutare dettagliatamente (ad esempio per approfondire un disallineamento tra procedure evidenziato con uno degli altri 3 disegni) la comparabilità dei risultati ad una specifica concentrazione. Rappresenta, tuttavia, una procedura onerosa in termini di risorse economiche, tempo e personale. Inoltre, una limitazione di questo disegno è rappresentata dalla necessità di disporre di un'adeguata quantità di materiale, poiché N replicati dello stesso campione devono essere analizzati su più procedure analitiche. Infine, con alcune piattaforme automatizzate, i replicati potrebbero essere analizzabili solo caricando i campioni fronte-macchina, appesantendo ulteriormente la procedura.

Materiali utilizzabili

Replicati di campioni di pazienti, singoli o in pool, o materiali di controllo commutabili.

Livelli di concentrazione

La verifica deve essere effettuata a 2 livelli di concentrazione (massimo 3), eventualmente prossimi ai limiti decisionali, ove presenti per il misurando in esame, e comunque entro $\pm 25\%$ dalla concentrazione a cui è stata calcolata l'imprecisione entro il laboratorio.

Numero di replicati

Tabella 2
Possibile utilizzo dei differenti disegni sperimentali

Situazione	Disegno consigliato (in ordine di preferenza)
Procedure analitiche identiche (produttore e modello dello strumento, lotto per reagenti e calibratori) (no POCT)	1) disegno 2 2) disegni 3 o 4 3) disegno 1
Procedure analitiche non identiche (no POCT)	1) disegni 3 o 4 2) disegno 1
Procedure analitiche identiche e non identiche e POCT	1) disegni 4 o 3 2) disegno 1

Per il calcolo del numero di replicati r , è necessario fissare, oltre ad alfa, o errore di I tipo (probabilità di concludere erroneamente che le due procedure analitiche non sono comparabili quando in realtà lo sono), la potenza che in genere è pari a 0,8 (cioè con errore di secondo tipo o beta pari a 0,2), il bias massimo accettabile e l'imprecisione di misura. Definite le varie grandezze, si ha quindi che il numero dei replicati, quando $K=2$, per ogni procedura analitica è:

$$r = 2 \left[\frac{(z_{\alpha} + z_{\beta}) \sigma}{d} \right]^2,$$

dove:

- z_{α} dipende dal livello di significatività ($z=1,96$ per $\alpha=0,05$),
- z_{β} dipende dalla potenza statistica ($z=0,842$ per $\text{potenza}=0,80$; $z=1,282$ per $\text{potenza}=0,90$),
- σ = media delle imprecisioni entro il laboratorio delle 2 procedure analitiche
- d è il bias massimo accettabile con quella determinata potenza.

Nel calcolo di r è possibile utilizzare σ e d (entrambi in valore assoluto, cioè nelle stesse unità del misurando) oppure $CV\%$ e $\text{bias}\%$ (entrambi in valore percentuale). È da considerare che per $\sigma > d$, o per $CV\% > \text{bias}\%$, il numero di replicati aumenta molto velocemente e potrebbe essere necessario considerare un bias basato su un modello differente perché troppo oneroso in termini di risorse.

Nel caso di $K \geq 3$ procedure analitiche, per definire la dimensione campionaria, per ogni procedura analitica si procede come riportato di seguito:

- si calcola il parametro

$$f = \frac{d}{\sigma} \times \frac{1}{2} \times \sqrt{\frac{(K+1)}{3(K-1)}}$$

dove d è il bias che si vuole identificare e σ la variabilità dei dati, ottenuta come media delle imprecisioni entro il laboratorio delle procedure analitiche da valutare;

- fissato $\alpha=0,05$, $\text{potenza}=0,8$, K =numero delle procedure analitiche e calcolato f , si cerca il valore della dimensione campionaria (numero di replicati r per ogni procedura analitica) utilizzando la Tabella 3.

Si consiglia comunque di utilizzare un numero di replicati NON inferiore a 5. Poiché il calcolo del numero di replicati dipende dall'imprecisione analitica (che può essere diversa lungo l'intervallo di concentrazione), si consiglia, a scopo conservativo, di utilizzare l'imprecisione analitica maggiore per ogni procedura analitica (e quindi il numero di replicati maggiore).

Conduzione dell'esperimento

Gli r replicati dei 2 (massimo 3) campioni (singoli o pool o materiali di controllo commutabili) sono misurati nella stessa serie analitica sulle $K \geq 2$ strumentazioni.

Analisi statistica

Individuazione ed eliminazione dei dati aberranti (outliers). Per ogni procedura, la lettura dei replicati r va eseguita in un'unica serie analitica. Nel caso in cui si individuino dati aberranti, occorre effettuare ulteriori

Tabella 3

Calcolo della dimensione campionaria al variare di f e K , fissati $\alpha=0,05$ e $\text{potenza}=0,80$

K	f											
	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,50	0,60	0,70	0,80
3	1286	323	144	82	53	37	28	22	14	10	8	7
4	1092	274	123	70	45	32	24	19	12	9	7	6
5	956	240	108	61	40	28	21	16	11	8	6	5
6	857	215	96	55	36	25	19	15	10	7	6	5
7	780	196	88	50	33	23	17	14	9	7	5	5
8	719	181	81	46	30	21	16	13	9	6	5	4
9	669	168	76	43	28	20	15	12	8	6	5	4
10	627	158	71	40	26	19	14	11	8	6	5	4
11	592	149	67	38	25	18	13	11	7	5	4	4
12	561	141	64	36	24	17	13	10	7	5	4	4
13	535	135	61	35	23	16	12	10	7	5	4	3
14	511	129	58	33	22	15	12	9	6	5	4	3
15	490	124	56	32	21	15	11	9	6	5	4	3

misure fino ad ottenere gli r replicati previsti. La verifica della presenza di aberranti è effettuata in primo luogo graficamente, valutando la distribuzione dei dati tramite dot plot oppure box plot, e successivamente tramite test statistico (test di Grubbs).

Per eseguire il test di Grubbs è necessario (60):

- calcolare, separatamente per ogni livello di concentrazione, la media e la DS di tutti gli r replicati dell'esperimento (calcolo da effettuare separatamente per ogni procedura analitica);
- individuare il valore di G dipendente da r (Tabella 4);
- calcolare i limiti dell'intervallo di accettabilità come media $\pm G \times DS$. Il valore più estremo ed esterno a questo intervallo è considerato valore aberrante. Il test di Grubbs identifica un valore aberrante alla volta ed è quindi necessario applicare più volte il test all'insieme dei dati rimasti dopo aver eliminato il sospetto aberrante (per eseguire il test di Grubbs si consiglia una numerosità minima di dati >6).

Tabella 4

Tavola dei valori critici per il test di Grubbs

r	G	r	G	r	G
5	1,7637	20	3,0008	70	3,6217
10	2,4821	25	3,1353	80	3,6729
15	2,8061	30	3,2361	90	3,7163
16	2,8521	35	3,3160	100	3,7540
17	2,8940	40	3,3807	120	3,8167
18	2,9325	50	3,4825	200	3,9777
19	2,9680	60	3,5599	300	4,0935

Esecuzione dei test statistici per la valutazione del bias.
Per $K=2$ procedure analitiche, dette M_1 e M_2 le medie degli r replicati analizzati sulle due procedure analitiche, si calcola l'intervallo di confidenza della differenza in valore assoluto delle due medie:

$$95\%IC = |M_1 - M_2| \pm t_{(\alpha=0,05; gl=2r-2)} S \sqrt{\frac{2}{r}}$$

dove t è ricavato dalla Tabella 5 con gradi di libertà $gl=2r-2$, e

$$S = \sqrt{(DS_1^2 + DS_2^2)/2}$$

è la radice quadrata della media delle varianze dei replicati.

Il modulo di $M_1 - M_2$, o $|M_1 - M_2|$, rappresenta il bias stimato tra le due procedure analitiche. Eventuali altri valori di t possono essere ottenuti dalla Tabella 5 per interpolazione oppure utilizzando MS Excel con le formule =INVT(0,975;gl), oppure =INV.T(0,05;gl) (a seconda della versione software utilizzata), dove gl sono i gradi di libertà calcolati.

Tabella 5

Tavola dei valori di t per $\alpha=0,05$, a 2 code

gl	t	gl	t	gl	t	gl	t
4	2,776	22	2,074	40	2,021	58	2,002
6	2,447	24	2,064	42	2,018	60	2,000
8	2,306	26	2,056	44	2,015	70	1,994
10	2,228	28	2,048	46	2,013	80	1,990
12	2,179	30	2,042	48	2,011	90	1,987
14	2,145	32	2,037	50	2,009	100	1,984
16	2,120	34	2,032	52	2,007	110	1,982
18	2,101	36	2,028	54	2,005	120	1,980
20	2,086	38	2,024	56	2,003	Inf	1,960

gl , gradi di libertà

Mentre con $K=2$ procedure analitiche si ha un unico bias stimato (differenza tra le 2 medie) e relativo intervallo di confidenza, con $K \geq 3$ il numero di intervalli di confidenza aumenta, e risulta uguale a $K(K-1)/2$. È necessario considerare il numero di tutti i confronti possibili (dipendente da K) nel calcolo degli intervalli di confidenza, in quanto, in caso contrario, aumenterebbe l'errore α , o di tipo I, e quindi il numero di falsi positivi, cioè il numero di presunte situazioni di non comparabilità dei risultati quando in realtà le procedure analitiche forniscono risultati comparabili.

Per $K \geq 3$ procedure analitiche si procede quindi:

- calcolando le K medie ($M_1, M_2, \dots, M_K$) e le K deviazioni standard ($DS_1, DS_2, \dots, DS_K$);
- per ogni possibile confronto, si calcola la differenza tra 2 medie in valore assoluto (ad esempio $|M_1 - M_2|, |M_1 - M_3|, \dots, |M_{K-1} - M_K|$) per un totale di $K(K-1)/2$ differenze;
- per ogni possibile confronto, si calcola l'intervallo di confidenza della differenza in valore assoluto di due medie:

$$95\%IC = |M_i - M_j| \pm q_{(K; K(r-1); \alpha=0,05)} S \sqrt{(1/r)}$$

dove $|M_i - M_j|$ rappresenta una delle $K(K-1)/2$ differenze osservate tra 2 delle K procedure analitiche in valore assoluto, S la radice quadrata della media di tutte le K varianze e con q ricavato dalla distribuzione del Range Studentizzato (distribuzione di Tukey) con K e $K(r-1)$ gradi di libertà (vedi tabella nell'Appendice A, [SII](#)).

Le procedure sopradescritte per $K=2$ o $K \geq 3$ procedure analitiche, sono valide se le varianze dei replicati ottenuti con le due procedure analitiche sono simili. Poiché il numero dei replicati per le due procedure analitiche è uguale, tale requisito può essere generalmente considerato valido quando il rapporto tra

la varianza maggiore e quella minore è inferiore a 3. In caso contrario il calcolo dell'intervallo di confidenza deve essere modificato:

-per K=2 procedure analitiche:

$$95\%IC = |M_1 - M_2| \pm t_{(\alpha=0,05; gl=v)} \sqrt{\frac{DS_1^2}{r} + \frac{DS_2^2}{r}}$$

dove t è ricavato dalla Tabella 5 e DS_1^2 e DS_2^2 sono le varianze dei replicati analizzati rispettivamente sulle due procedure analitiche. Inoltre, i gl per t non sono più uguali a 2r-2, ma calcolati con:

$$v = \frac{[(DS_1^2/r) + (DS_2^2/r)]^2}{[(DS_1^2/r)^2/(r-1) + (DS_2^2/r)^2/(r-1)]}$$

e arrotondati all'intero.

-per K≥3 procedure analitiche:

$$95\%IC = |M_i - M_j| \pm \frac{1}{\sqrt{2}} q_{(K;v;\alpha=0,05)} \sqrt{\frac{DS_i^2}{r} + \frac{DS_j^2}{r}}$$

dove $|M_i - M_j|$ rappresenta una delle K(K-1)/2 differenze in valore assoluto tra 2 delle K procedure analitiche, DS_i^2 e DS_j^2 sono le varianze dei replicati analizzati rispettivamente su due delle K procedure analitiche e con q ricavato dalla distribuzione del Range Studentizzato con K e v gradi di libertà (distribuzione di Tukey – Appendice A, SII). A differenza del caso con varianze simili, dove i gradi di libertà sono K(r-1), nel caso di varianze diverse il numero di gradi di libertà si trova arrotondando per eccesso con:

$$v = \frac{(r-1)(DS_i^2 + DS_j^2)^2}{DS_i^4 + DS_j^4}$$

Si noti, a differenza della formula utilizzata in caso di varianze simili, la presenza del fattore moltiplicativo $1/\sqrt{2}$.

Generalmente, nella verifica della comparabilità dei risultati ottenuti su piattaforme automatizzate, ci si aspetta di osservare varianze simili. L'inclusione di formule, per gestire la valutazione anche in caso di procedure analitiche con varianze differenti, consente l'estensione di questo protocollo anche ai POCT. Le verifiche tra procedure analitiche utilizzate in laboratorio e POCT possono, come riportato in precedenza, essere condotte anche utilizzando il disegno 4.

Disegno 2 (dati del controllo di qualità interno)

La procedura è applicabile solo se i materiali sono commutabili (oppure quando le procedure analitiche sono identiche: stessi strumenti, lotto di reagenti, calibratori, e quant'altro), e a condizione che la procedura analitica sia stabile nel periodo selezionato (verificabile dall'osservazione delle carte dei controlli). Il principale vantaggio di questo disegno è quello di non richiedere ulteriori analisi di campioni (i dati sono già disponibili negli applicativi informatici) e di poter

effettuare la verifica più frequentemente. Poiché, tuttavia, la matrice tra i campioni dei pazienti ed i materiali di controllo è differente, è sempre consigliabile associare al disegno 2 una valutazione saltuaria utilizzando il disegno 1, 3 o 4, per monitorare eventuali differenze di comportamento tra i materiali di controllo ed i campioni di pazienti (il bias stimato utilizzando i materiali di controllo non deve essere maggiore di quello stimato sui campioni dei pazienti) (61).

Materiali utilizzabili

Dati dei CQI interni giornalieri analizzati per ogni procedura analitica in un periodo precedente e già disponibili negli applicativi informatici

Livelli di concentrazione

La verifica deve essere effettuata a 2 livelli di concentrazione (massimo 3), eventualmente prossimi ai limiti decisionali, ove presenti per il misurando in esame, e comunque entro $\pm 25\%$ dalla concentrazione a cui è stata calcolata l'imprecisione intra-laboratorio. Tuttavia, tale disegno non permette di effettuare la verifica a concentrazioni diverse da quelle dei materiali di controllo.

Numero di replicati

Il numero di dati del CQI da utilizzare è calcolato in modo analogo a quanto descritto nel disegno 1, con σ calcolato come media delle imprecisioni entro il laboratorio delle K≥2 procedure analitiche.

Occorre sottolineare che per l'utilizzo del disegno 2 risulta fondamentale la scelta del periodo e quindi dei dati ai quali applicare la verifica: il periodo deve infatti essere "stabile", cioè la distribuzione dei dati deve, per quanto possibile, essere gaussiana e non derivare da commistioni fra popolazioni aventi media e DS differenti; ovviamente i risultati del CQI, presi in considerazione per i calcoli, devono rientrare nei criteri di accettabilità definiti in conformità ai documenti di consenso (raccomandazioni, linee guida) approvati a livello nazionale ed internazionale (per esempio SIBioC, *Clinical Laboratory Standard Institute* - CLSI). Qualora non fosse possibile individuare un periodo in cui il sistema risulti stabile, la verifica va effettuata utilizzando un diverso disegno sperimentale.

Al pari del disegno 1, si consiglia di utilizzare un numero di replicati NON inferiore a 5.

Conduzione dell'esperimento

Dal database di laboratorio, per ognuna delle K≥2 procedure analitiche, vengono estratti r dati di CQI (con r calcolato secondo opportuni criteri statistici) selezionati in un periodo stabile (vedi paragrafo precedente).

Analisi statistica

Individuazione ed eliminazione dei dati aberranti (outliers). Se i risultati dei controlli sono stati selezionati,

come suggerito, in un periodo in cui sia garantita la stabilità della procedura analitica, la verifica della presenza degli aberranti non dovrebbe essere necessaria. Tuttavia, se lo sperimentatore lo ritiene necessario, può utilizzare la stessa procedura statistica presentata per il disegno 1.

Esecuzione dei test statistici per la valutazione del bias.

La procedura è analoga a quanto descritto per il disegno 1. Nell'analisi statistica del disegno 2, tuttavia, le medie, le DS e le varianze non sono calcolate sugli r replicati dello stesso campione misurato sulle $K \geq 2$ procedure analitiche ma sugli r dati del CQI analizzati in precedenza e già disponibili del database del laboratorio.

Disegno 3 (serie di campioni di pazienti)

In questo disegno si scelgono 2 (massimo 3) concentrazioni, ma invece di analizzare r replicati dello stesso campione (o di pazienti o di materiale commutabile) ad una singola concentrazione su K procedure analitiche, si analizzano r campioni con concentrazione entro $\pm 25\%$ delle 2 (massimo 3) concentrazioni scelte sulle K procedure analitiche (ad esempio se si scelgono 2 concentrazioni, 50 e 200 mg/L, e dall'analisi della dimensione campionaria sono risultati 20 replicati, si analizzeranno su ognuna delle K procedure analitiche 20 campioni con concentrazione entro $\pm 25\%$ di 50 mg/L, cioè da 37,5 a 62,5 mg/L, e 20 campioni entro $\pm 25\%$ di 200 mg/L, cioè da 150 a 250 mg/L).

Nel disegno 3 il consumo di risorse è inferiore rispetto al disegno 1, in quanto i campioni sono già stati analizzati su almeno una procedura analitica (ad esempio lo strumento che il laboratorio considera come "riferimento"), anche se è necessario considerare se determinazioni effettuate in tempi diversi (non contemporaneamente) possano inficiare i risultati per caratteristiche di stabilità del misurando. Inoltre, per alcuni misurandi potrebbe essere difficoltoso il reperimento dei campioni nell'intervallo $\pm 25\%$ della concentrazione scelta.

Materiali utilizzabili

Campioni di pazienti diversi in singolo, scelti nell'intervallo $\pm 25\%$ della concentrazione definita (ad esempio livello clinicamente rilevante allo scopo d'uso dell'esame).

Livelli di concentrazione

Analogamente ai disegni 1 e 2, la verifica deve essere effettuata a 2 livelli di concentrazione (massimo 3), eventualmente prossimi a limiti decisionali, ove presenti per il misurando in esame.

Numero di replicati

Il disegno 3, pur simile ai primi 2 disegni, richiede una modifica alle formule per il calcolo della dimensione

campionaria, in quanto in questo disegno i dati sono appaiati (vari campioni letti su $K \geq 2$ procedure analitiche).

Per $K=2$ procedure analitiche la formula diventa quindi:

$$r = \left[\frac{(z_\alpha + z_\beta) \sigma_d}{d} \right]^2$$

dove σ_d rappresenta la vera (della popolazione) DS delle differenze (non la DS delle osservazioni) tra le due procedure analitiche. σ_d può essere stimato da s_d come

$$s_d^2 = 2s^2 (1-\rho),$$

dove s rappresenta la media delle DS delle osservazioni ottenute con le 2 procedure analitiche in quell'intervallo di concentrazione e ρ il coefficiente di correlazione tra le osservazioni.

Se le ripetibilità (DS) delle due procedure analitiche sono molto differenti (>2 volte) occorre utilizzare

$$s_d^2 = s_1^2 + s_2^2 - 2\rho s_1 s_2$$

dove s_1 e s_2 sono le DS delle due procedure analitiche.

Nella verifica della comparabilità dei risultati, come peraltro accade nella procedura di comparazione di metodi analitici (26), ci si aspetta una correlazione molto elevata tra le osservazioni e quindi $\rho > 0,9$ [se ρ non è conosciuto utilizzare $\rho = 0,9$ oppure un valore inferiore verificato in studi precedenti (approccio conservativo = numero di replicati maggiore)].

Applicando il disegno 3 a intervalli di concentrazioni diverse, caratterizzati da ripetibilità e quindi DS diverse, è possibile ottenere un numero di r replicati diversi. In tale situazione, si consiglia di utilizzare il numero di replicati maggiore per tutte le verifiche.

Per $K \geq 3$, il calcolo della dimensione campionaria è piuttosto complicato ed è necessario utilizzare un software statistico professionale. In alternativa, si consiglia (approccio conservativo) di utilizzare il numero di replicati maggiore tra quelli calcolati per le varie procedure, applicando la formula precedente a tutte le coppie delle $K(K-1)/2$ procedure analitiche con relative imprecisioni.

Al pari dei precedenti disegni, si consiglia di utilizzare un numero di replicati NON inferiore a 5.

Conduzione dell'esperimento

Gli r campioni sono misurati nella stessa serie analitica sulle $K \geq 2$ strumentazioni.

Analisi statistica

Individuazione ed eliminazione dei dati aberranti (outliers). Il test di Grubbs può essere utilizzato anche nel caso del disegno 3 per le differenze delle coppie dei risultati (e non per le singole osservazioni). Il test deve essere applicato separatamente per le 2 (massimo 3) concentrazioni scelte.

Esecuzione dei test statistici per la valutazione del bias. L'analisi deve essere applicata separatamente per ogni

concentrazione, cioè per ogni intervallo $\pm 25\%$ intorno alle 2 (massimo 3) concentrazioni scelte, calcolando le r differenze tra i risultati ottenuti con le K procedure analitiche. Si tratta quindi di un disegno per dati appaiati (o di ANOVA per misure ripetute nel caso di $K \geq 3$ procedure analitiche).

Per $K=2$ procedure analitiche, si calcolano le differenze tra gli r risultati ottenuti con le 2 procedure analitiche. Dette quindi D e s_d rispettivamente la media e la DS delle r differenze, si calcola l'intervallo di confidenza come

$$95\%IC = |D| \pm t_{(\alpha=0,05/2; g=r-1)} \frac{s_d}{\sqrt{r}},$$

dove t è preso dalla Tabella 6 con $g=r-1$.

Per $K \geq 3$ procedure analitiche, la procedura è molto simile, ma occorre utilizzare q preso dalla distribuzione del Range Studentizzato (distribuzione di Tukey), per correggere per i confronti multipli, e derivare da q un nuovo coefficiente t^* (t star). Per ogni coppia di procedure analitiche su cui sono stati analizzati r campioni si calcolerà:

- D , cioè la media delle differenze dei campioni (ad esempio $D_{1,2}$ media delle differenze degli r campioni misurati con le procedure analitiche 1 e 2);
- s_d , cioè la DS delle r differenze di quella coppia di procedure (ad esempio $s_{d1,2}$ DS delle differenze degli r campioni misurati con le procedure analitiche 1 e 2);
- $q_{(K; r-1; \alpha=0,05)}$, preso dalla distribuzione del Range Studentizzato (distribuzione di Tukey) con K e $(r-1)$ gradi di libertà (vedi tabella nell'Appendice A, [SII](#));
- t^* , valore di t derivato da q come $t^*=q/\sqrt{2}$;
- l'intervallo di confidenza pari a:

$$95\%IC = |D_{ij}| \pm t^* \frac{s_{dij}}{\sqrt{r}},$$

dove $|D_{ij}|$ rappresenta la media delle differenze in valore assoluto, cioè il bias in valore assoluto, degli r campioni misurati con le procedure analitiche i e j , s_{dij} la DS delle r differenze e con t^* calcolato da q .

Si noti che non si è fatto uso, nel calcolo dell'intervallo di confidenza, dell'errore standard calcolato sulla base dell'informazione ottenuta da tutte le osservazioni (come avviene nell'ANOVA per misure ripetute), ma dei differenti (specifici) errori standard delle differenze per ogni coppia di procedure analitiche. Sebbene il numero di g sia inferiore, questa modalità semplifica i calcoli ed evita di dover verificare l'assunzione di sfericità.

Disegno 4 (campioni di pazienti lungo un ampio intervallo di concentrazioni)

Questa metodologia, più familiare al personale di laboratorio [simile all'esperimento di comparazione di 2 metodi analitici (26)], ha il vantaggio della semplicità (sia di pianificazione che di conduzione) e del minor

consumo di risorse rispetto al disegno 1. In questo disegno la comparabilità dei risultati è valutata preferenzialmente in termini di bias percentuale, al fine di evitare che un eventuale bias assoluto, anche maggiore del massimo accettabile, possa non essere rilevato quando calcolato come media di differenze di concentrazioni molto differenti tra loro.

Materiali utilizzabili

Campioni di pazienti diversi lungo un ampio intervallo di concentrazioni

Livelli di concentrazione

Si consiglia di utilizzare campioni di pazienti che coprano un intervallo di concentrazioni più ampio possibile; laddove non sia possibile per scarsità di campioni ad alcune concentrazioni (per esempio elevate o basse), è raccomandato valutare l'ambito di misura clinicamente rilevante. Più l'ampiezza dell'intervallo di concentrazioni a cui viene applicato il disegno 4 si riduce, più il disegno 4 diventa simile al disegno 3.

Numero di replicati

Il numero di campioni da analizzare sulle K procedure analitiche in questo disegno non è stabilito su basi statistiche ma scelto dall'operatore in base alle risorse del laboratorio, a esperienze professionali o alla letteratura scientifica disponibile. In linea generale si suggerisce di utilizzare un numero di campioni compreso tra 20 e 40 e mai inferiore a 10. Tuttavia, quando la numerosità è bassa (ad esempio inferiore a 40 campioni), scelta arbitraria per evidenti difficoltà dovute alle caratteristiche del misurando e/o alla numerosità e frequenza delle determinazioni, la potenza statistica potrebbe risultare inferiore all'80%.

Conduzione dell'esperimento

Gli r campioni sono misurati nella stessa serie analitica sulle $K \geq 2$ strumentazioni.

Analisi statistica

Individuazione ed eliminazione dei dati aberranti (outliers). Al pari del disegno 3, il test di Grubbs può essere utilizzato per le differenze delle coppie dei risultati (e non per le singole osservazioni).

Esecuzione dei test statistici per la valutazione del bias. La verifica della comparabilità prevede, in aggiunta al calcolo del bias, anche la visualizzazione della distribuzione delle differenze tramite il grafico di Bland-Altman (62-64), al fine di escludere la presenza di differenze molto ampie, che, se simmetriche intorno allo zero, potrebbero portare ad un bias percentuale calcolato falsamente prossimo a zero o comunque inferiore al massimo bias accettabile.

Considerando che l'analisi di Bland-Altman permette di valutare non più di due procedure analitiche contemporaneamente, se ve ne sono più di due, è

necessario ripetere l'analisi più volte. A titolo di esempio, nel caso vi siano tre procedure analitiche, denominate A, B e C, sarebbe necessario eseguire i confronti A versus B, A versus C e B versus C.

Per la costruzione del grafico di Bland-Altman si devono inizialmente definire le grandezze da porre sull'asse orizzontale e sull'asse verticale (62). Tra le diverse formulazioni del grafico di Bland-Altman è preferibile scegliere quella che riporta sull'asse verticale la differenza percentuale piuttosto che la differenza semplice. Infatti, la differenza percentuale è più adatta quando si confrontano valori che includono un ambito di concentrazioni ampio (63). Al contrario, potrebbe essere necessario utilizzare la differenza semplice per quegli analiti in cui molte osservazioni presentano valori prossimi allo zero, perché in tali situazioni anche minime differenze assolute possono portare a grandi differenze percentuali ma clinicamente non importanti. Questo protocollo raccomanda di utilizzare, come denominatore del rapporto per il calcolo della differenza percentuale, la media dei due risultati ottenuti con le 2 procedure analitiche (come il grafico di Bland-Altman convenzionale). Tuttavia, vi sono due situazioni nelle quali è preferibile utilizzare come denominatore non la media dei due risultati ma uno dei due. Quando si confrontano solo 2 procedure analitiche e una delle due è considerata la procedura di riferimento: in questo caso come denominatore del rapporto si utilizzerà il risultato della procedura di riferimento (per $K \geq 2$ procedure si consiglia di utilizzare comunque la media dei risultati); quando le medie dei risultati ottenuti con le 2 procedure sono molto differenti ($\geq 20\%$). In questa situazione è consigliabile utilizzare come denominatore, per il calcolo delle differenze percentuali, il risultato della procedura con media inferiore; infatti, l'utilizzo della media o del risultato ottenuto con l'altra procedura (quella con media maggiore) potrebbe determinare una sottostima del bias percentuale.

Per ogni coppia di procedure analitiche su cui sono stati analizzati gli r campioni occorre procedere con le seguenti fasi:

- calcolare le medie di tutti i risultati ottenuti con le due procedure analitiche (r medie);
- calcolare le differenze percentuali degli r campioni (in totale r differenze), utilizzando come denominatore la media dei risultati ottenuti con le due procedure: $\text{differenza}\% = [(\text{procedura 1} - \text{procedura 2}) / (\text{media delle 2 procedure})] \times 100$; se si confrontano solo 2 procedure analitiche e una delle 2 è considerata la procedura di riferimento del laboratorio, calcolare le differenze percentuali come $\text{differenza}\% = [(\text{procedura 1} - \text{procedura 2}) / \text{procedura 1}] \times 100$, dove procedura 1 è il valore ottenuto con la procedura di riferimento. Analogamente, in presenza di medie molto differenti ($\geq 20\%$) calcolare le differenze percentuali come $\text{differenza}\% = [(\text{procedura 1} - \text{procedura 2}) / \text{procedura 1}] \times 100$, dove procedura 1 è il valore ottenuto con la procedura che presenta una media inferiore; per analiti in cui molte osservazioni presentano

valori prossimi allo zero, calcolare le differenze come differenze semplici;

- porre in grafico, utilizzando uno scatter plot, le r differenze percentuali o semplici (asse y) verso le medie di tali differenze, oppure le concentrazioni ottenute con la procedura di riferimento (nel caso si confrontino 2 sole procedure ed una sia quella che il laboratorio considera di riferimento) (asse x), e osservare la distribuzione; se si osservano numerose differenze molto grandi, simmetriche o meno intorno allo 0 (ad esempio differenze percentuali negative per valori bassi dell'intervallo di concentrazioni e positive per valori elevati, o viceversa), concludere per una non comparabilità delle procedure analitiche;
- calcolare il bias come media delle differenze (ad esempio differenze dei risultati ottenuti con le procedure 1 e 2) e l'intervallo di confidenza al 95% di tale bias come

$$95\%IC = bias_{1,2} \pm t \frac{s_d}{\sqrt{r}}$$

dove s_d indica la deviazione standard delle r differenze, t è preso dalla Tabella 5 con gradi di libertà $gl=r-1$.

Interpretazione degli intervalli di confidenza del bias

Con r replicati (disegno 1-2) o r campioni (disegno 3-4) per l'interpretazione, avvalersi della Tabella 6.

Tabella 6
Interpretazione dei disegni 1-4

Intervallo di confidenza (IC) osservato	Risultati comparabili
IC al 95% comprende lo zero E il bias massimo accettabile è esterno all'intervallo	SI
IC al 95% comprende lo zero MA il bias massimo accettabile è interno all'intervallo	NON DETERMINABILE
IC al 95% NON comprende lo zero MA il bias massimo accettabile è esterno all'intervallo	SI
IC al 95% NON comprende lo zero E il bias massimo accettabile è interno all'intervallo	NO

Se l'intervallo di confidenza al 95% (95%IC) del bias stimato comprende lo 0 ed il bias massimo accettabile è esterno all'intervallo, si può concludere per la comparabilità dei risultati. Se, tuttavia, l'IC comprende lo zero ma il bias massimo accettabile è interno all'intervallo, il risultato è considerato inconcludente (non determinabile) e sarà necessario ripetere

successivamente l'esperimento di comparabilità, aumentando ad esempio il numero r di replicati o campioni, oppure utilizzando un altro disegno. Se l'IC non comprende lo 0 e tuttavia il bias massimo accettabile è esterno all'IC, si può comunque concludere per la comparabilità dei risultati. Infatti, in questa situazione, il bias osservato, pur statisticamente significativo, risulta accettabile (perché il limite superiore dell'IC $< \text{bias}_{\text{max}}$ accettabile oppure, ad esempio nel disegno 4, perché il limite inferiore dell'IC $> \text{bias}_{\text{max}}$ accettabile). Infine, se 95%IC non comprende lo zero e, inoltre, il bias massimo accettabile è interno all'intervallo, si concluderà per la non comparabilità dei risultati.

Per i disegni 1-3 in cui la dimensione campionaria è stata selezionata in base a criteri statistici (errore di tipo I e potenza statistica) è inoltre importante ricordare che anche in situazioni in cui il bias strumentale vero è pari a 0 (perfetta comparabilità dei risultati), vi è comunque un rischio del 5% di concludere, sbagliando, per una non comparabilità (IC che non comprende lo 0). Questo errore dipende dall'errore alfa fissato per il calcolo della dimensione campionaria. Al contrario, per bias strumentale vero maggiore del massimo bias accettabile, vi è comunque un rischio fino al 20% di concludere, sbagliando, per una comparabilità dei risultati. Questo errore dipende dalla potenza fissata per il calcolo della dimensione campionaria. Infine, in presenza di un bias vero > 0 ma inferiore al bias massimo accettabile, vi è una probabilità compresa tra 5% e 80% (con aumento del rischio all'aumentare del bias) di concludere, sbagliando, per risultati non comparabili.

Se si utilizza una numerosità campionaria inferiore a quella ottenuta in base al calcolo statistico (per problemi

di selezione di campioni idonei), diminuisce la potenza statistica e quindi aumenta la probabilità di falsi negativi (falsi allineamenti).

Per una più facile interpretazione, gli IC, unitamente al bias massimo accettabile, possono essere visualizzati utilizzando un grafico (alignment plot o plot di allineamento) costituito da due linee verticali, rispettivamente in corrispondenza dello 0 (linea tratteggiata) e del bias massimo accettabile, e da tante linee orizzontali, quanti sono i possibili confronti, che rappresentano le differenze in valore assoluto tra 2 procedure analitiche (identificate da punti) e il relativo IC. In Figura 2 sono rappresentate 4 possibili situazioni che si possono riscontrare quando si comparano due procedure analitiche. L'interpretazione è analoga a quanto mostrato in Tabella 6; le procedure saranno giudicate:

- comparabili nel caso in cui il bias massimo accettabile sia esterno all'intervallo (Figura 2A e 2C);
- non comparabili quando l'intervallo di confidenza del bias non includa lo 0 e il bias massimo accettabile sia interno all'intervallo (Figura 2D);
- inconcludente qualora l'intervallo comprenda lo 0 e tuttavia il bias massimo accettabile sia interno all'intervallo (Figura 2B).

Si noti che, a differenza degli altri disegni, nel disegno 4 non vengono calcolate differenze assolute: in questo caso nel grafico di allineamento il limite superiore dell' IC potrebbe anche essere inferiore a 0 e occorrerà verificare, in modo speculare a quanto osservato per i primi 3 disegni, se il limite inferiore dell' IC sia inferiore a $-\text{Bias}_{\text{max}}$ accettabile.

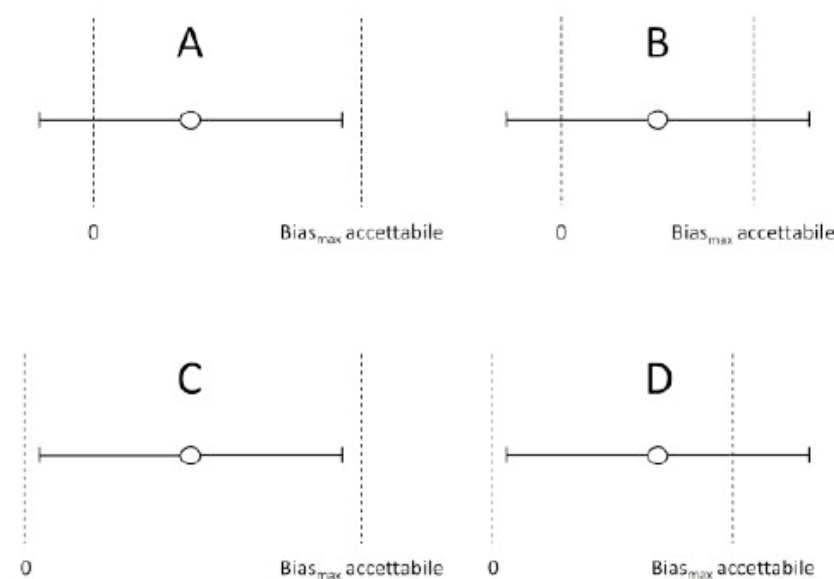


Figura 2

Possibili esiti quando si confrontano procedure analitiche. Pannello A e C, procedure comparabili; pannello B, risultato inconcludente, pannello D, procedure non comparabili.

Registrazione dei dati e implementazione di eventuali azioni correttive

Tutti i criteri adottati per la verifica della comparabilità dei risultati ed i relativi risultati e conclusioni (dati dell'esperimento, scelta dell'errore totale accettabile e relativa fonte bibliografica di riferimento, analisi statistica, grafico per l'interpretazione degli intervalli di confidenza o alignment plot) devono essere registrati ed archiviati nei documenti del sistema qualità del laboratorio (report finale).

Se una o più procedure analitiche forniscono risultati non comparabili, è necessario verificare i dati dell'esperimento e i risultati dell'analisi statistica per escludere eventuali errori grossolani. Inoltre, potrebbe essere necessario rivalutare il modello utilizzato per la scelta dei criteri di accettabilità, oppure riverificare la comparabilità con un altro disegno sperimentale.

È possibile, inoltre, utilizzando i disegni 1 e 2, evidenziare risultati comparabili a concentrazioni basse e non comparabili a concentrazioni alte (o viceversa). Questo può dipendere dal diverso numero di replicati utilizzato alle due diverse concentrazioni (a causa delle diverse imprecisioni lungo l'intervallo di concentrazioni), oppure dall'aver utilizzato un bias massimo percentuale sia per concentrazioni basse che alte (piuttosto che bias assoluti a basse concentrazioni e percentuali ad alte concentrazioni).

Le cause della non comparabilità dei risultati, osservata su una o più procedure analitiche in valutazione, devono essere indagate ed adeguate azioni correttive implementate al fine di evitare misinterpretazioni dei risultati nel contesto clinico-decisionale da parte degli utilizzatori.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno

BIBLIOGRAFIA

1. Plebani M. La riorganizzazione dei laboratori clinici: accorpamenti ed aree vaste. *Biochim Clin* 2004;28:280-5.
2. Trenti T, Plebani M. Diagnostic test accuracy: a valuable tool for promoting quality and patient safety. *Diagnosis (Berl)* 2018;5:175-8.
3. Plebani M. System-related and cognitive errors in laboratory medicine. *Diagnosis (Berl)* 2018;5:191-6.
4. Plebani M. Harmonization in laboratory medicine: more than clinical chemistry? *Clin Chem Lab Med* 2018;56:1579-86.
5. Plebani M. Analytical quality: an unfinished journey. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:357-9.
6. Plebani M, Sciacovelli L. ISO 15189 Accreditation: navigation between quality management and patient safety. *J Med Biochem* 2017;36:225-30.
7. Plebani M, Sciacovelli L, Chiozza ML, et al. Once upon a time: a tale of ISO 15189 accreditation. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:1127-9.
8. Sciacovelli L, Plebani M. The IFCC Working Group on laboratory errors and patient safety. *Clin Chim Acta* 2009;404:79-85.
9. Calleja J. Parallel processing and maintaining adequate alignment between instruments and methods. *Clin Biochem Rev* 2008;29:S71-S77.
10. ISO 15189:2012 Medical laboratories – particular requirements for quality and competence. International Organization for Standardization: Geneva 2012.
11. Panteghini M, Ceriotti F, Jones G, et al. Task Force on performance specifications in laboratory medicine of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM). Strategies to define performance specifications in laboratory medicine: 3 years on from the Milan Strategic Conference. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:1849-56.
12. Fraser CG, Kallner A, Kenny D, et al. Strategies to set global analytical quality specifications in laboratory medicine. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59:475-585.
13. Sandberg S, Fraser FG, Horvath AR, et al. Defining analytical performance specifications: consensus statement from the 1st Strategic Conference of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:833-5.
14. Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI). Verification of Comparability of Patient Results Within One Health Care System; Approved Guideline (Interim Revision). CLSI document EP31-A_IR. CLSI Wayne, PA: 2012.
15. Petersen PH, Fraser CG, Westgard JO, et al. Analytical goal-setting for monitoring patients when two analytical methods are used. *Clin Chem* 1992;38:2258-60.
16. Fraser CG. Improved monitoring of differences in serial laboratory results. *Clin Chem* 2011;57:1635-37.
17. Asberg A, Solem KB, Mikkelsen G. Allowable systematic difference between two instruments measuring the same analyte. *Scand J Clin Lab Invest* 2014;74:588-90.
18. Petersen PH, Klee GG. Influence of analytical bias and imprecision on the number of false positive results using guideline-driven medical decision limits. *Clin Chim Acta* 2014;432:127-34.
19. Theodorsson E, Magnusson B. Allowable bias when monitoring reference change values. *Scand J Clin Lab Invest* 2015;75:537-8.
20. Petersen PH, Fraser CG, Lund F, et al.. Confirmation of analytical performance characteristics required for the reference change value applied in patient monitoring. *Scand J Clin Lab Invest* 2015;75:628-30.
21. Armbruster D. Metrological traceability of assays and comparability of Patient test results. *Clin Lab Med* 2017;37:119-35.
22. Beall GH, Brouwer N, Quiroga S et al. Traceability in laboratory medicine: a global driver for accurate results for patient care. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:1100-8.
23. Young IS. The enduring importance and challenge of commutability. *Clin Chem* 2018;64:421-3.
24. JCGM 200:2008. International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms.
25. Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI). Measurement procedure comparison and bias estimation using patient samples, 3rd Edition. CLSI document EP09c. Wayne, PA: 2018.
26. Vidali M, Tronchin M, Dittadi R, per il Gruppo di Studio SIBioC - "Statistica per il laboratorio". Protocollo per la comparazione di due metodi analitici di laboratorio. *Biochim Clin* 2016;40:129-42.
27. Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI). Evaluation of commutability of processed samples. Approved Guideline—Third Edition. CLSI document EP14-A3. Wayne, PA: 2014.
28. Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI). Preparation and validation of commutable frozen human serum pools as secondary reference materials for cholesterol

- measurement procedures. Approved Guideline. CLSI document C37-A. Wayne, PA.; 1999.
29. Panteghini M, Sandberg S. Defining analytical performance specifications 15 years after the Stockholm conference. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:829–32.
 30. Carobene A. La variabilità biologica: le basi teoriche e l'esperienza dei Gruppi di Lavoro della Federazione Europea di Chimica Clinica e Medicina di Laboratorio, *Biochim Clin* 2018;42:15-25.
 31. Ceriotti F, Fernandez-Calle P, Klee GG, et al. Criteria for assigning laboratory measurands to models for analytical performance specifications defined in the 1st EFLM Strategic Conference. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:189–94.
 32. Haeckel R, Wosniok W, Kratochvila J, et al. A pragmatic proposal for permissible limits in external quality assessment schemes with a compromise between biological variation and the state of the art. *Clin Chem Lab Med*. 2012;50:833-9.
 33. Zaninotto M, Sciacovelli L, Pagani F, et al. External quality assessment for biochemical markers of myocardial damage: an Italian experience. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:1434-41.
 34. Sciacovelli L, Zardo L, Secchiero S, et al. Quality specifications in EQA schemes: from theory to practice. *Clin Chim Acta* 2004;346:87-97.
 35. Secchiero S, Sciacovelli L, Zardo L, et al. Appropriateness of cholesterol and triglycerides reporting checked by External Quality Assessment programs. *Clin Chim Acta* 2003;333:221-30.
 36. Sciacovelli L, Secchiero S, Zardo L, et al. External Quality Assessment Schemes: need for recognised requirements. *Clin Chim Acta* 2001;309:183-99.
 37. EurA1c Trial Group. EurA1c: The European HbA1c trial to investigate the performance of HbA1c assays in 2166 laboratories across 17 countries and 24 manufacturers by use of the IFCC model for quality targets. *Clin Chem* 2018;64:1183-92.
 38. Horvath AR, Bossuyt PMM, Sandberg S, et al. Setting analytical performance specifications based on outcome studies – is it possible? *Clin Chem Lab Med* 2015;53:841–8.
 39. Attanasio F, Carrer P, Zurlo A, et al. . Prognostic value of cardiac troponin I assay in hospitalized elderly patients. *Aging Clin Exp Res* 2018 doi:10.1007/s40520-018-0965-2.
 40. Clerico A, Zaninotto M, Ripoli A, et al. on the behalf of the Study Group on Cardiovascular Risk Biomarkers of the Italian Society of Clinical Biochemistry (SIBioC). The 99th percentile of reference population for cTnI and cTnT assay: methodology, pathophysiology and clinical implications. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:1634-51.
 41. Mueller C, Möckel M, Giannitsis E, et al.; ESC Study Group on Biomarkers in Cardiology of the Acute Cardiovascular Care Association. Use of copeptin for rapid rule-out of acute myocardial infarction. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*. 2018;7:570-6.
 42. Paleari R, Mosca A. Standardization of the HbA(2) Assay. *EJIFCC*. 2018;29:298-302.
 43. Bonetti G, Carta M, Lapolla A, et al. SIBioC-SIPMeL Working Group on Diabetes and the Italian Diabetes Society (SID). Correct determination of glycemia in the diagnosis and management of diabetes: Recommendations for the optimization of the pre-analytical phase. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2019;29:1-3.
 44. Kraus D, von Jeinsen B, Tzikas S, et al. Cardiac Troponins for the Diagnosis of acute myocardial infarction in chronic kidney disease. *J Am Heart Assoc* 2018.;doi: 10.1161/JAHA.117.008032.
 45. Ricos C, Alvarez V, Cava F, et al. Desirable specification for total error, imprecision, and bias, derived from intra and inter- individual biologic variation. The 2014 update. Available from: <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm> (ultimo accesso: aprile 2019).
 46. Carobene A, Braga F, Roraas T, et al. A systematic review of data on biological variation for alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and γ -glutamyl transferase. *Clin Chem Lab Med* 2013; 51:1997–2007.
 47. Carobene A. Reliability of biological variation data available in an online database: need for improvement. *Clin Chem Lab Med* 2015; 53:871–7.
 48. Carobene A, Strollo M, Jonker N, et al. Sample collections from healthy volunteers for biological variation estimates'update: a new project undertaken by the working group on biological variation established by the European federation of clinical chemistry and laboratory medicine. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:1599-608.
 49. Carobene A, Røraas T, Sølvik UØ, et al. Biological variation estimates obtained from 91 healthy study participants for 9 enzymes in serum. *Clin Chem* 2017;63:1141-50.
 50. Carobene A, Marino I, Coşkun A, et al. The EuBIVAS Project: Within- and Between-Subject Biological Variation Data for Serum Creatinine Using Enzymatic and Alkaline Picrate Methods and Implications for Monitoring. *Clin Chem* 2017;63:1527-36.
 51. Aarsand AK, Díaz-Garzón J, Fernandez-Calle P, et al. The EuBIVAS: Within- and between-subject biological variation data for electrolytes, lipids, urea, uric acid, total protein, total bilirubin, direct bilirubin, and glucose. *Clin Chem* 2018;64:1380-93.
 52. Carobene A, Guerra E, Locatelli M, et al. Biological variation estimates for prostate specific antigen from the European Biological Variation Study; consequences for diagnosis and monitoring of prostate cancer. *Clin Chim Acta* 2018;486:185-91.
 53. Carobene A, Guerra E, Locatelli M, et al. Providing correct estimates of biological variation-not an easy task. the example of s100- β protein and neuron-specific enolase. *Clin Chem*. 2018;64:1537-39.
 54. Aarsand AK, Røraas T, Fernandez-Calle P, et al. The Biological variation data critical appraisal checklist: a standard for evaluating studies on biological variation. *Clin Chem*. 2018;64:501-4.
 55. Buoro S, Seghezzi M, Manenti B, et al. Biological variation of platelet parameters determined by the Sysmex XN hematology analyzer. *Clin Chim Acta* 2017;470:125-32.
 56. Buoro S, Carobene A, Seghezzi M, et al. Short- and medium-term biological variation estimates of leukocytes extended to differential count and morphology-structural parameters (cell population data) in blood samples obtained from healthy people. *Clin Chim Acta* 2017;473:147-56.
 57. Buoro S, Carobene A, Seghezzi M, et al. Short- and medium-term biological variation estimates of red blood cell and reticulocyte parameters in healthy subjects. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:954-63.
 58. Coşkun A, Carobene A, Kilercik M, et al. Within-subject and between-subject biological variation estimates of 21 hematological parameters in 30 healthy subjects. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:1309-18.
 59. Padoan A, D'Inca R, Scapellato ML, et al. Improving IBD diagnosis and monitoring by understanding preanalytical, analytical and biological fecal calprotectin variability. *Clin*

- Chem Lab Med 2018;56:1926-35.
60. Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI). User verification of precision and estimation of bias; Approved guideline, 3rd ed. CLSI document EP15-A3. Wayne, PA: 2014.
 61. Paleari R, Ceriotti F, Harteveld CL, et al. Calibration by commutable control materials is able to reduce inter-method differences of current high-performance methods for HbA(2). Clin Chim Acta 2018;477:60-65.
 62. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. Lancet 1986;1(8476):307-10.
 63. Giavarina D. Understanding Bland Altman analysis. Biochem Med (Zagreb). 2015;25:141-51.
 64. Dewitte K, Fierens C, Stöckl D, et al.. Application of the Bland-Altman plot for interpretation of method-comparison studies: a critical investigation of its practice. Clin Chem 2002;48:799-801.

Protocollo operativo per la verifica della comparabilità dei risultati di laboratorio ottenuti su più procedure analitiche

Applicazione dei quattro disegni sperimentali

Di seguito viene illustrata tramite esempi numerici l'applicazione dei 4 disegni sperimentali utili per verificare la comparabilità dei risultati di laboratorio in accordo al relativo documento SIBioC.

Esempio 1 (disegno 2)

Si vuole verificare la comparabilità di 4 procedure analitiche per la determinazione dell'alanina aminotransferasi (ALT). Le procedure analitiche consistono in 4 strumenti automatizzati situati tutti nel laboratorio centrale. I 4 strumenti in studio sono dello stesso produttore e modello e utilizzano lo stesso lotto di reagenti e calibratori. Si decide di verificare la comparabilità a due livelli di concentrazione (nell'esempio viene mostrata la verifica ad un livello unico).

Raccolta delle informazioni relative alle procedure da mettere a confronto

Le 4 procedure analitiche presentano rispettivamente le seguenti imprecisioni entro il laboratorio (prestazioni calcolate utilizzando i dati del CQI (CV_A , imprecisione analitica) misurate lungo un periodo non inferiore a 6 mesi):

Procedura analitica (strumento)	$CV_A\%$ (entro il laboratorio) alla concentrazione di 30 U/L
1	3,12
2	3,17
3	5,31
4	4,39

Definizione dei limiti di accettabilità

Dai dati di variabilità biologica (VB) dello studio EuBIVAS recentemente pubblicati per l'ALT si ha:
 $CV_i=9,3\%$ e $ET_A=14,4\%$ (si noti che questi dati di VB sono minori rispetto a quelli pubblicati da Ricos et al. disponibili online a: <https://www.westgard.com/biobase1.htm>).

Il laboratorio sceglie di applicare l'approccio classico per il calcolo dell'Errore totale. Utilizzando il CV_A maggiore delle 4 procedure ($CV_A=5,31\%$), il bias massimo accettabile risulta uguale a:

$$\text{bias}_{\max}\% = ET_A\% - 1,65CV_A = 14,4\% - 1,65 \times 5,31\% = 5,64\%$$

Scelta del disegno

Poiché le 4 procedure analitiche in esame sono identiche (stesso produttore, modello, lotto reagenti e calibratori) si utilizza il disegno sperimentale 2 basato sui dati del CQI già analizzati. A tal fine, si individua un periodo recente utilizzando le carte dei controlli (per la selezione dei dati vedi criteri esplicitati nel protocollo).

Scelta dei livelli e dei replicati

La comparabilità viene verificata in questo disegno ai livelli del CQI (C1: 28 U/L, C2: 170 U/L) (in questo esempio viene mostrata la sola verifica per C1).

Utilizzando:

$K=4$ procedure analitiche;

$d=\text{bias}_{\max}=5,64\%$;

σ , ripetibilità combinata (media delle ripetibilità), pari a $(3,12+3,17+5,31+4,39)/4=4,00\%$;

$\alpha=5\%$ e potenza=80%;

si ricava

$$f = \frac{d}{\sigma} \times \frac{1}{2} \times \sqrt{\frac{(K+1)}{3(K-1)}} = \frac{5,64}{4,00} \times \frac{1}{2} \times \sqrt{\frac{(4+1)}{3(4-1)}} = 0,525$$

e utilizzando la tabella riportata nel protocollo, si ottiene, per interpolazione, $r=11$ replicati.

Analisi statistica

Verifica presenza dati aberranti. Poiché i dati dei CQI sono stati scelti in un periodo in cui la stabilità dei controlli è garantita, la verifica della presenza degli aberranti non dovrebbe essere necessaria. Tuttavia, l'operatore può comunque, anche in questo disegno applicare il test di Grubbs per ognuno dei 4 insiemi di dati (4 procedure analitiche).

A titolo di esempio si mostra il calcolo per i dati della prima procedura:

- media dei replicati della prima procedura: 29,68;
- DS della prima procedura: 0,89;

poiché $r=11$, dalla tabella riportata nel protocollo si ottiene, per interpolazione, $G=2,54$.

Si calcola l'intervallo: $\text{media} \pm G \times \text{DS} = 29,68 \pm 2,54 \times 0,89 = 27,42-31,94$.

Non si rileva la presenza di alcun dato aberrante tra i replicati relativi alla prima procedura (nessuno dei replicati risulta esterno all'intervallo calcolato)

Calcolo bias e intervallo di confidenza al 95% (95%IC). Medie dei replicati: $M1=29,68$; $M2=29,83$; $M3=31,09$; $M4=30,90$; DS dei replicati: $DS1=0,89$; $DS2=0,51$; $DS3=1,34$; $DS4=1,09$; DS combinata: $S = \sqrt{(0,89^2 + 0,51^2 + 1,34^2 + 1,09^2)/4} = 1,00$

Per tutti i possibili confronti $[K(K-1)/2=6]$ si calcolano le differenze delle medie in valore assoluto ed il relativo 95%IC:

Confronto	Bias (95%IC)	Confronto	Bias (95%IC)
1-2	0,15 (-0,99-1,30)	2-3	1,25 (0,11-2,40)
1-3	1,40 (0,26-2,55)	2-4	1,06 (-0,08-2,21)
1-4	1,22 (0,07-2,36)	3-4	0,19 (-0,95-1,34)

A titolo di esempio viene mostrato il calcolo per il confronto 1-2:

-si calcola il valore assoluto della differenza tra le medie della prima e della seconda procedura:

$|M1-M2|=|29,68-29,83|=0,15$

-si calcola il relativo 95%IC:

$$95\%IC = |M_1 - M_2| \pm q_{(K;K(r-1);\alpha=0,05)} S \sqrt{\frac{1}{r}} = 0,15 \pm q_{(4;40;\alpha=0,05)} \times 1,00 \times \sqrt{\frac{1}{11}} = 0,15 \pm 3,79 \times 1,00 \times \sqrt{\frac{1}{11}} = -0,99 - 1,30$$

dove q è stato preso dalla distribuzione del Range Studentizzato (distribuzione di Tukey) con 4 e 40 gradi di libertà (vedi protocollo).

Interpretazione

Poiché la media combinata (media delle medie delle procedure) è uguale a 30,4 U/L, un $\text{bias}_{\max}\%$ di 5,64% corrisponde ad un $\text{bias}_{\max}$ assoluto pari a $0,0564 \times 30,4 = 1,71$ U/L.

Le strumentazioni 1-2 e 3-4 risultano tra loro comparabili: entrambi gli intervalli contengono lo 0 e il $\text{bias}_{\max}$ di 1,71 U/L risulta esterno all'intervallo.

Le strumentazioni 1-3, 1-4 e 2-3 NON risultano tra loro comparabili: gli intervalli NON contengono lo 0 ed il $\text{bias}_{\max}$ è interno all'intervallo (limite superiore dell'intervallo è $>\text{bias}_{\max}$).

L'intervallo del confronto tra le procedure 2-4, pur contenendo lo 0, presenta un limite superiore $>\text{bias}_{\max}$ ($\text{bias}_{\max}$ interno all'intervallo), per cui non è possibile concludere con certezza né a favore della comparabilità né della non comparabilità.

Conclusioni

I dati di questo esperimento suggeriscono la presenza di 2 gruppi di procedure: un primo gruppo di procedure analitiche (procedure 1 e 2 tra loro comparabili) ed un secondo gruppo (procedure 3 e 4 tra loro comparabili). Questi 2 gruppi tra loro risultano però NON comparabili.

Il laboratorio dovrà ulteriormente valutare il disallineamento evidenziato tra i 2 gruppi di procedure, o ripetendo l'esperimento, oppure utilizzando un altro disegno. Inoltre, contestualmente, potrà essere investigata ulteriormente la differenza tra le imprecisioni analitiche delle 4 procedure in studio.

Nota: si ricorda che nella relazione finale, unitamente all'esito dell'esperimento ("procedure comparabili" o "procedure NON comparabili"), è necessario riportare sempre il livello di concentrazione ed il bias massimo accettabile a cui è stato verificato l'allineamento ("procedure comparabili o NON comparabili entro un bias massimo accettabile pari a ... verificato ad un livello di concentrazione pari a ...").

Esempio 2 (disegno 1)

Il laboratorio, a distanza di tempo e dopo aver investigato le possibili cause del disallineamento evidenziato nella situazione descritta nell'esempio 1, ed aver attuato gli interventi correttivi del caso, decide di rivalutare la comparabilità tra le 2 procedure analitiche per il test dell'ALT che mostravano la maggiore discrepanza, cioè quelle caratterizzate dalle 2 medie più estreme delle 4 rilevate (procedura 1: M1=29,68 e procedura 3: M3=31,09). Il razionale di questa scelta consiste nel considerare che se risultano comparabili le 2 procedure più estreme, lo saranno anche le rimanenti.

Raccolta delle informazioni relative alle procedure da mettere a confronto

Si utilizzano i dati di ripetibilità delle 2 procedure analitiche per il test dell'ALT presentati nell'esempio 1.

Procedura analitica (strumento)	CV _A % alla concentrazione di 30 U/L
1	3,12
3	5,31

Definizione dei limiti di accettabilità

Al pari dell'esempio 1 il limite di accettabilità per il bias massimo accettabile risulta pari a 5,64%.

Scelta del disegno

Si decide di utilizzare il disegno sperimentale 1 che, come indicato nel protocollo, pur gravato da una maggiore onerosità in termini di risorse, è utile per investigare con maggior dettaglio eventuali non comparabilità evidenziate con altri disegni. Inoltre, a differenza del disegno 2, il disegno 1 consente la valutazione della comparabilità ad una specifica concentrazione scelta dall'operatore.

Scelta dei livelli e dei replicati

La comparabilità viene verificata ad una concentrazione di 40 U/L (si noti che in questo disegno l'operatore non è vincolato alla concentrazione del materiale del CQI). Lo stesso campione di un paziente con livello di ALT pari a 40 U/L viene analizzato per r volte su entrambe le procedure analitiche.

Utilizzando:

K=2 procedure analitiche;

$d = \text{bias}_{\max} = 5,64\%$;

σ , ripetibilità combinata (media delle ripetibilità), pari a $(3,12+5,31)/2=4,22\%$;

alfa=5% e potenza=80%;

si ricava (arrotondando per eccesso)

$$r = 2 \left[\frac{(z_{\alpha} + z_{\beta})\sigma}{d} \right]^2 = 2 \left[\frac{(1,96 + 0,842)4,22}{5,64} \right]^2 = 9.$$

Analisi statistica

Verifica presenza dati aberranti. La verifica della presenza di dati aberranti viene condotta come riportato nell'esempio 1. In accordo al test di Grubbs, nessun dato è risultato aberrante o estremo.

Calcolo bias e 95%IC. Medie dei replicati: M1=39,73; M3=40,48; DS dei replicati: DS1=0,79; DS3=1,37; DS combinata: $S = \sqrt{(0,79^2 + 1,37^2)/2} = 1,12$

Il bias tra le procedure (differenza assoluta tra le medie) risulta pari a: $|M1-M3| = |39,73-40,48| = 0,75$ U/L.

Il 95%IC del bias è quindi:

$$95\%IC = |M_1 - M_2| \pm t_{(\alpha=0,05; gl=2r-2)} S \sqrt{\frac{2}{r}} = 0,75 \pm t_{(\alpha=0,05; gl=16)} \times 1,12 \times \sqrt{\frac{2}{9}} = 0,75 \pm 2,12 \times 1,12 \times \sqrt{\frac{2}{9}} = -0,37 - 1,86;$$

dove t è preso dalla distribuzione t di Student (vedi protocollo) con gradi di libertà $gl=2r-2=16$.

Interpretazione

Poiché la media combinata (media delle medie delle procedure) è uguale a 40,1 U/L, un $\text{bias}_{\max}\%$ di 5,64% corrisponde ad un $\text{bias}_{\max}$ assoluto pari a $0,0564 \cdot 40,1 = 2,26$ U/L.

Le strumentazioni in studio (la 1 e la 3 dell'esempio 1) risultano tra loro comparabili (l'intervallo comprende lo 0 e il $\text{bias}_{\max}$ di 2,26 U/L risulta esterno all'intervallo).

Conclusioni

Alla concentrazione di 40 U/L, le procedure analitiche risultano comparabili entro un $\text{bias}_{\max}$ pari a 5,64%.

Esempio 3 (disegno 4)

Il laboratorio vuole verificare la comparabilità di 2 procedure analitiche utilizzate per la determinazione di ALT, una situata nel laboratorio centrale, la seconda posta in un presidio ospedaliero sotto il controllo del laboratorio centrale. Le 2 procedure analitiche non sono identiche (modello e produttore differenti).

Raccolta delle informazioni relative alle procedure da mettere a confronto

Le ripetibilità entro il laboratorio vengono ricavate dai dati di CQI. Le ripetibilità entro il laboratorio sono diverse lungo l'intervallo di concentrazioni (la maggiore CV_A a concentrazioni più basse risulta essere 5,1%).

Definizione dei limiti di accettabilità

Utilizzando la formula presentata nell'esempio 1 e l'imprecisione entro il laboratorio maggiore tra quelle osservate, il limite di accettabilità risulta pari a 6,0% ($14,4 - 1,65 \cdot 5,1 = 6,0\%$).

Nota: si tratta di una scelta conservativa; infatti, se si utilizza l'imprecisione entro il laboratorio maggiore, tra quelle osservate lungo l'intervallo di concentrazioni, si ottiene il bias massimo accettabile minore).

Scelta del disegno

Si decide di utilizzare il disegno sperimentale 4, in considerazione del fatto che le 2 procedure analitiche sono differenti (diverso produttore e modello).

Scelta dei livelli e dei replicati

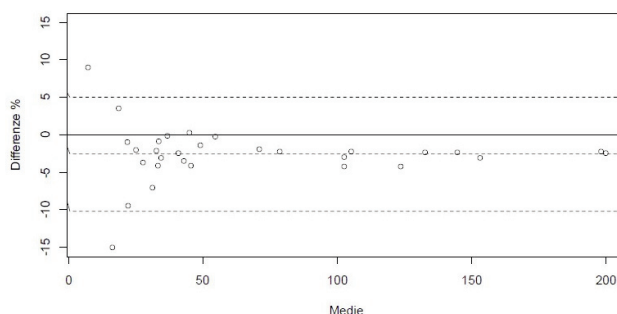
La comparabilità delle 2 procedure per ALT viene verificata utilizzando campioni che coprono un intervallo di concentrazioni da 5 a 200 U/L.

Il numero di campioni, da analizzare con entrambe le procedure analitiche, è scelto arbitrariamente uguale a 30.

Analisi statistica

Valutazione tramite grafico di Bland-Altman. Medie dei replicati: $M1=66,89$; $M3=68,69$ (medie fornite a scopo descrittivo)

Le differenze tra le 2 procedure analitiche vengono preliminarmente valutate tramite il grafico di Bland-Altman, ponendo sull'asse delle ascisse la media delle osservazioni e sull'asse delle ordinate le differenze percentuali rispetto alla media, cioè $\text{differenza}\% = [(procedura\ 1 - procedura\ 2) / (media\ delle\ 2\ procedure)] \cdot 100$. Il grafico riporta il bias calcolato % (cioè la media delle differenze %), una linea continua per un $\text{bias}\% = 0$ e altre 2 linee tratteggiate che delimitano l'intervallo corrispondente al 95% delle differenze%.



Bias% = -2,57% (media delle 30 differenze percentuali);
 DS% = 3,87% (deviazione standard delle 30 differenze percentuali);
 Intervallo che comprende il 95% delle differenze percentuali: bias% $\pm$ 1,96 x DS% = -10,16% – 5,02%

Calcolo dell'IC95% del bias. L'intervallo di confidenza del bias% risulta uguale a:

$$95\%IC = bias \pm t_{(\alpha=0,05; gl=r-1)} \frac{S}{\sqrt{r}} = -2,57 \pm t_{(\alpha=0,05; gl=29)} \frac{3,87}{\sqrt{30}} = -2,57 \pm 2,045 \times \frac{3,87}{\sqrt{30}} = -4,01\% - (-1,12\%)$$

dove t è ricavato, interpolando, dalla distribuzione t di Student (vedi protocollo) con gradi di libertà gl=2r-1=29.

Interpretazione

Le strumentazioni in studio, pur presentando un bias% statisticamente significativo (l'intervallo di confidenza non include lo 0) risultano tra loro comparabili, in quanto il bias_{max} è esterno all'intervallo (infatti il limite inferiore dell'IC95% > -bias_{max}, cioè -4,01% > -6,0%).

Conclusioni

Le procedure analitiche, nel range di concentrazioni valutate, risultano comparabili entro un bias pari a 6,0%.

Esempio 4 (disegno 3)

Le 2 procedure analitiche per la determinazione di ALT, valutate nell'esempio 3 con il disegno 4, vengono studiate anche con il disegno sperimentale 3. A tal fine, si analizzano con le 2 procedure analitiche r campioni con concentrazione entro $\pm 25\%$ delle 2 concentrazioni scelte. Le concentrazioni e i rispettivi range $\pm 25\%$ scelti sono 1) 35 U/L (25-45), 2) 70 U/L (50-90) e 3) 120 U/L (90-150).

Raccolta delle informazioni relative alle procedure da mettere a confronto

Le ripetibilità entro il laboratorio vengono ricavate dai dati di CQI. Le imprecisioni analitiche entro il Laboratorio (CV_A) sono differenti lungo il range di concentrazioni. Si decide di utilizzare l'imprecisione maggiore tra quelle presentate dalle 2 procedure alle varie concentrazioni (CV_A=5,1%).

Definizione dei limiti di accettabilità

Come nell'esempio 3, il limite di accettabilità (bias_{max}) risulta pari a 6,0%.

Scelta del disegno

Si utilizza il disegno sperimentale 3, in considerazione del fatto che le 2 procedure analitiche sono differenti (diversi produttore e modello).

Scelta dei livelli e dei replicati

La comparabilità viene verificata in questo disegno a diversi livelli di concentrazione (vedi introduzione all'esempio). Di seguito viene mostrata la sola verifica per l'intervallo 25-45 U/L.

A differenza del disegno 4, il disegno 3 prevede il calcolo del numero di replicati.

Utilizzando:

K=2 procedure analitiche;

d=bias_{max}=6,0%, che ad un livello medio di 35 U/L corrisponde a 0,06x35=2,1 U/L;

σ_d ignota stimata da s_d con

$$s_d^2 = 2s^2(1 - \rho)$$

dove s rappresenta la media delle DS delle 2 procedure a quel livello di concentrazione e ρ il coefficiente di correlazione tra le due procedure (ignoto e stimato come $\rho=0,9$). Poiché DS1=5,6 e DS2=5,8, $s=(5,6+5,8)/2=5,7$ U/L.

Quindi:

$$s_d^2 = 2s^2(1 - \rho) = 2 \times 5,7^2(1 - 0,9) = 6,5 \text{ e } s_d = \sqrt{s_d^2} = 2,55$$

alfa=5% e potenza=80%; si ricava (arrotondando per eccesso):

$$r = \left[\frac{(z_{\alpha} + z_{\beta}) \sigma_d}{d} \right]^2 = \left[\frac{(1,96 + 0,842) 2,55}{2,1} \right]^2 = 12$$

Analisi statistica

Calcolo bias e 95%IC. Medie dei replicati: M1=37,53; M2=38,74; DS delle differenze: sd=0,81;

Il bias (media in valore assoluto delle differenze) risulta pari a |D|=1,21 U/L

Il 95%IC del bias è quindi:

$$95\%IC = |D| \pm t_{(\alpha=0,05/2; gl=r-1)} \frac{s_d}{\sqrt{r}} = 1,21 \pm t_{(\alpha=0,05/2; gl=11)} \frac{0,81}{\sqrt{12}} = 1,21 \pm 2,20 \times \frac{0,81}{\sqrt{12}} = 0,70 - 1,73$$

dove t è ricavato dalla distribuzione t di Student (vedi protocollo) con gradi di libertà gl=r-1=11.

Interpretazione

Ad un livello di 35 U/L, un bias_{max}% di 6,0% corrisponde ad un bias_{max} assoluto pari a 0,06*35=2,10 U/L.

Le strumentazioni in studio, pur presentando un bias statisticamente significativo (l'IC non include lo 0), risultano tra loro comparabili (il bias_{max} è esterno all'intervallo: il limite superiore dell'IC è < il bias_{max} di 2,10 U/L).

Conclusioni

Alla concentrazione di 35 U/L, le procedure analitiche risultano comparabili entro un bias_{max} pari a 6,0% o 2,10 U/L.

Appendice A

Tabella della distribuzione del Range Studentizzato

gl	Numero di procedure analitiche																	
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
2	8,33	9,80	10,88	11,73	12,43	13,03	13,54	13,99	14,40	14,76	15,09	15,39	15,67	15,92	16,16	16,38	16,59	16,78
3	5,91	6,82	7,50	8,04	8,48	8,85	9,18	9,46	9,72	9,95	10,15	10,35	10,52	10,69	10,84	10,98	11,11	11,24
4	5,04	5,76	6,29	6,71	7,05	7,35	7,60	7,83	8,03	8,21	8,37	8,52	8,66	8,79	8,91	9,03	9,13	9,23
5	4,60	5,22	5,67	6,03	6,33	6,58	6,80	6,99	7,17	7,32	7,47	7,60	7,72	7,83	7,93	8,03	8,12	8,21
6	4,34	4,90	5,30	5,63	5,90	6,12	6,32	6,49	6,65	6,79	6,92	7,03	7,14	7,24	7,34	7,43	7,51	7,59
7	4,16	4,68	5,06	5,36	5,61	5,82	6,00	6,16	6,30	6,43	6,55	6,66	6,76	6,85	6,94	7,02	7,10	7,17
8	4,04	4,53	4,89	5,17	5,40	5,60	5,77	5,92	6,05	6,18	6,29	6,39	6,48	6,57	6,65	6,73	6,80	6,87
9	3,95	4,41	4,76	5,02	5,24	5,43	5,59	5,74	5,87	5,98	6,09	6,19	6,28	6,36	6,44	6,51	6,58	6,64
10	3,88	4,33	4,65	4,91	5,12	5,30	5,46	5,60	5,72	5,83	5,93	6,03	6,11	6,19	6,27	6,34	6,40	6,47
11	3,82	4,26	4,57	4,82	5,03	5,20	5,35	5,49	5,61	5,71	5,81	5,90	5,98	6,06	6,13	6,20	6,27	6,33
12	3,77	4,20	4,51	4,75	4,95	5,12	5,27	5,39	5,51	5,61	5,71	5,80	5,88	5,95	6,02	6,09	6,15	6,21
13	3,73	4,15	4,45	4,69	4,88	5,05	5,19	5,32	5,43	5,53	5,63	5,71	5,79	5,86	5,93	5,99	6,05	6,11
14	3,70	4,11	4,41	4,64	4,83	4,99	5,13	5,25	5,36	5,46	5,55	5,64	5,71	5,79	5,85	5,91	5,97	6,03
15	3,67	4,08	4,37	4,59	4,78	4,94	5,08	5,20	5,31	5,40	5,49	5,57	5,65	5,72	5,78	5,85	5,90	5,96
16	3,65	4,05	4,33	4,56	4,74	4,90	5,03	5,15	5,26	5,35	5,44	5,52	5,59	5,66	5,73	5,79	5,84	5,90
17	3,63	4,02	4,30	4,52	4,70	4,86	4,99	5,11	5,21	5,31	5,39	5,47	5,54	5,61	5,67	5,73	5,79	5,84
18	3,61	4,00	4,28	4,49	4,67	4,82	4,96	5,07	5,17	5,27	5,35	5,43	5,50	5,57	5,63	5,69	5,74	5,79
19	3,59	3,98	4,25	4,47	4,65	4,79	4,92	5,04	5,14	5,23	5,31	5,39	5,46	5,53	5,59	5,65	5,70	5,75
20	3,58	3,96	4,23	4,45	4,62	4,77	4,90	5,01	5,11	5,20	5,28	5,36	5,43	5,49	5,55	5,61	5,66	5,71
21	3,56	3,94	4,21	4,42	4,60	4,74	4,87	4,98	5,08	5,17	5,25	5,33	5,40	5,46	5,52	5,58	5,63	5,68
22	3,55	3,93	4,20	4,41	4,58	4,72	4,85	4,96	5,06	5,14	5,23	5,30	5,37	5,43	5,49	5,55	5,60	5,65
23	3,54	3,91	4,18	4,39	4,56	4,70	4,83	4,94	5,03	5,12	5,20	5,27	5,34	5,41	5,46	5,52	5,57	5,62
24	3,53	3,90	4,17	4,37	4,54	4,68	4,81	4,92	5,01	5,10	5,18	5,25	5,32	5,38	5,44	5,49	5,55	5,59
25	3,52	3,89	4,15	4,36	4,53	4,67	4,79	4,90	4,99	5,08	5,16	5,23	5,30	5,36	5,42	5,47	5,52	5,57
26	3,51	3,88	4,14	4,35	4,51	4,65	4,77	4,88	4,98	5,06	5,14	5,21	5,28	5,34	5,40	5,45	5,50	5,55
27	3,51	3,87	4,13	4,33	4,50	4,64	4,76	4,86	4,96	5,04	5,12	5,19	5,26	5,32	5,38	5,43	5,48	5,53
28	3,50	3,86	4,12	4,32	4,49	4,62	4,74	4,85	4,94	5,03	5,11	5,18	5,24	5,30	5,36	5,41	5,46	5,51
29	3,49	3,85	4,11	4,31	4,47	4,61	4,73	4,84	4,93	5,01	5,09	5,16	5,23	5,29	5,34	5,40	5,44	5,49
30	3,49	3,85	4,10	4,30	4,46	4,60	4,72	4,82	4,92	5,00	5,08	5,15	5,21	5,27	5,33	5,38	5,43	5,47
31	3,48	3,84	4,09	4,29	4,45	4,59	4,71	4,81	4,90	4,99	5,06	5,13	5,20	5,26	5,31	5,36	5,41	5,46
32	3,48	3,83	4,09	4,28	4,45	4,58	4,70	4,80	4,89	4,98	5,05	5,12	5,18	5,24	5,30	5,35	5,40	5,45
33	3,47	3,83	4,08	4,28	4,44	4,57	4,69	4,79	4,88	4,97	5,04	5,11	5,17	5,23	5,29	5,34	5,39	5,43
34	3,47	3,82	4,07	4,27	4,43	4,56	4,68	4,78	4,87	4,96	5,03	5,10	5,16	5,22	5,27	5,33	5,37	5,42
35	3,46	3,81	4,07	4,26	4,42	4,56	4,67	4,77	4,86	4,95	5,02	5,09	5,15	5,21	5,26	5,31	5,36	5,41
36	3,46	3,81	4,06	4,25	4,41	4,55	4,66	4,76	4,85	4,94	5,01	5,08	5,14	5,20	5,25	5,30	5,35	5,40
37	3,45	3,80	4,05	4,25	4,41	4,54	4,66	4,76	4,85	4,93	5,00	5,07	5,13	5,19	5,24	5,29	5,34	5,39
38	3,45	3,80	4,05	4,24	4,40	4,53	4,65	4,75	4,84	4,92	4,99	5,06	5,12	5,18	5,23	5,28	5,33	5,38

39	3,45	3,79	4,04	4,24	4,39	4,53	4,64	4,74	4,83	4,91	4,98	5,05	5,11	5,17	5,22	5,27	5,32	5,37
40	3,44	3,79	4,04	4,23	4,39	4,52	4,63	4,73	4,82	4,90	4,98	5,04	5,11	5,16	5,22	5,27	5,31	5,36
41	3,44	3,79	4,03	4,23	4,38	4,51	4,63	4,73	4,82	4,90	4,97	5,04	5,10	5,15	5,21	5,26	5,30	5,35
42	3,44	3,78	4,03	4,22	4,38	4,51	4,62	4,72	4,81	4,89	4,96	5,03	5,09	5,15	5,20	5,25	5,30	5,34
43	3,43	3,78	4,03	4,22	4,37	4,50	4,62	4,72	4,80	4,88	4,96	5,02	5,08	5,14	5,19	5,24	5,29	5,33
44	3,43	3,78	4,02	4,21	4,37	4,50	4,61	4,71	4,80	4,88	4,95	5,02	5,08	5,13	5,19	5,24	5,28	5,33
45	3,43	3,77	4,02	4,21	4,36	4,49	4,61	4,70	4,79	4,87	4,94	5,01	5,07	5,13	5,18	5,23	5,28	5,32
46	3,42	3,77	4,01	4,20	4,36	4,49	4,60	4,70	4,79	4,87	4,94	5,00	5,06	5,12	5,17	5,22	5,27	5,31
47	3,42	3,77	4,01	4,20	4,36	4,48	4,60	4,69	4,78	4,86	4,93	5,00	5,06	5,11	5,17	5,22	5,26	5,31
48	3,42	3,76	4,01	4,20	4,35	4,48	4,59	4,69	4,78	4,86	4,93	4,99	5,05	5,11	5,16	5,21	5,26	5,30
49	3,42	3,76	4,00	4,19	4,35	4,48	4,59	4,69	4,77	4,85	4,92	4,99	5,05	5,10	5,16	5,20	5,25	5,29
50	3,42	3,76	4,00	4,19	4,34	4,47	4,58	4,68	4,77	4,85	4,92	4,98	5,04	5,10	5,15	5,20	5,24	5,29
51	3,41	3,76	4,00	4,19	4,34	4,47	4,58	4,68	4,76	4,84	4,91	4,98	5,04	5,09	5,15	5,19	5,24	5,28
52	3,41	3,75	4,00	4,18	4,34	4,47	4,58	4,67	4,76	4,84	4,91	4,97	5,03	5,09	5,14	5,19	5,23	5,28
53	3,41	3,75	3,99	4,18	4,33	4,46	4,57	4,67	4,76	4,83	4,90	4,97	5,03	5,08	5,14	5,18	5,23	5,27
54	3,41	3,75	3,99	4,18	4,33	4,46	4,57	4,67	4,75	4,83	4,90	4,96	5,02	5,08	5,13	5,18	5,22	5,27
55	3,41	3,75	3,99	4,18	4,33	4,46	4,57	4,66	4,75	4,83	4,90	4,96	5,02	5,08	5,13	5,17	5,22	5,26
56	3,40	3,74	3,99	4,17	4,32	4,45	4,56	4,66	4,74	4,82	4,89	4,96	5,02	5,07	5,12	5,17	5,22	5,26
57	3,40	3,74	3,98	4,17	4,32	4,45	4,56	4,66	4,74	4,82	4,89	4,95	5,01	5,07	5,12	5,17	5,21	5,25
58	3,40	3,74	3,98	4,17	4,32	4,45	4,56	4,65	4,74	4,82	4,89	4,95	5,01	5,06	5,11	5,16	5,21	5,25
59	3,40	3,74	3,98	4,17	4,32	4,44	4,55	4,65	4,73	4,81	4,88	4,95	5,00	5,06	5,11	5,16	5,20	5,25
60	3,40	3,74	3,98	4,16	4,31	4,44	4,55	4,65	4,73	4,81	4,88	4,94	5,00	5,06	5,11	5,15	5,20	5,24
70	3,39	3,72	3,96	4,14	4,29	4,42	4,53	4,62	4,71	4,78	4,85	4,91	4,97	5,03	5,08	5,12	5,17	5,21
80	3,38	3,71	3,95	4,13	4,28	4,40	4,51	4,60	4,69	4,76	4,83	4,89	4,95	5,00	5,05	5,10	5,14	5,18
90	3,37	3,70	3,94	4,12	4,27	4,39	4,50	4,59	4,67	4,75	4,81	4,88	4,93	4,98	5,03	5,08	5,12	5,16
100	3,36	3,70	3,93	4,11	4,26	4,38	4,48	4,58	4,66	4,73	4,80	4,86	4,92	4,97	5,02	5,07	5,11	5,15
110	3,36	3,69	3,92	4,10	4,25	4,37	4,48	4,57	4,65	4,72	4,79	4,85	4,91	4,96	5,01	5,05	5,10	5,14
120	3,36	3,68	3,92	4,10	4,24	4,36	4,47	4,56	4,64	4,71	4,78	4,84	4,90	4,95	5,00	5,04	5,09	5,13
130	3,35	3,68	3,91	4,09	4,24	4,36	4,46	4,55	4,63	4,71	4,77	4,83	4,89	4,94	4,99	5,03	5,08	5,12
140	3,35	3,68	3,91	4,09	4,23	4,35	4,46	4,55	4,63	4,70	4,77	4,83	4,88	4,93	4,98	5,03	5,07	5,11
150	3,35	3,67	3,90	4,08	4,23	4,35	4,45	4,54	4,62	4,70	4,76	4,82	4,88	4,93	4,98	5,02	5,06	5,10
160	3,35	3,67	3,90	4,08	4,22	4,34	4,45	4,54	4,62	4,69	4,76	4,82	4,87	4,92	4,97	5,02	5,06	5,10
170	3,34	3,67	3,90	4,08	4,22	4,34	4,44	4,53	4,61	4,69	4,75	4,81	4,87	4,92	4,97	5,01	5,05	5,09
180	3,34	3,67	3,90	4,07	4,22	4,34	4,44	4,53	4,61	4,68	4,75	4,81	4,86	4,91	4,96	5,01	5,05	5,09
190	3,34	3,67	3,89	4,07	4,21	4,33	4,44	4,53	4,61	4,68	4,75	4,81	4,86	4,91	4,96	5,00	5,04	5,08
200	3,34	3,66	3,89	4,07	4,21	4,33	4,44	4,53	4,61	4,68	4,74	4,80	4,86	4,91	4,96	5,00	5,04	5,08