معاونت سلامت

آزمایشگاه مرجع سلامت

صحه‌گذاری روشهاي کمی در آزمایشگاه (Quantitative) Method Validation

ویرایش اول

پائیز ۱۳۸۷

گردآورندگان : آزرم نامی - دکتر فریده رضی

فهرست :	
مقدمه	
بررسی دقت	
مقایسه دقت دو روش آزمایشگاهی	
بررسی صحت	
مقایسه روشها	
آزمون بازیابی	
بررسی محدوده گزارشدهی	
تصمیم‌گیری در مورد روش آزمایشگاهی	
بررسی محدوده مرجع	

مقدمه :

استفاده از یک روش یا کیت جدید در آزمایشگاه امری عادی و روزمره است. بدیهی است آزمایشگاه می‌بایست ضمن دقت در انتخاب روش بر اساس شرایط خاص خود، قبل از استفاده از آن برای گزارشدهی به بیمار روش جدید را بررسی و تائید نماید.

ازآنجائیکه عملکرد یک روش آزمایشگاهی تحت تاثیر عوامل متعددی مانند، شماره‌ساختهای مختلف کیت، معرف، کالیبراتور ، تغییر تامین‌کنندگان، اثرات حمل و نقل و نگهداری، شرایط آب و هوایی، کیفیت آب، پایداری جریان برق و طبیعتا مهارت کاربر دارد، لازم است هر آزمایشگاه خود قابلیت روش را ارزیابی نماید.

برای بررسی روشهای کمیquantitative که قبلا توسط شرکت سازنده مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند لازم است حداقل پارامترهای

۱- دقت
۲- صحت
۳- محدوده گزارشدهی و
٤- محدوده مرجع

مورد ارزیابی قرار گیرد. در مورد روشهایی که در آزمایشگاه طراحی و اجرا می‌شوند و نیز روشهایی که در آزمایشگاه تغییر می‌یابند علاوه بر موارد فوق می‌بایست حساسیت ، تداخلات و سایر موارد با توجه به روش مورد ارزیابی قرار گیرد.

در دستورالعمل حاضر روشهای ارزیابی و صحه‌گذاری روشها بر اساس مراجع مختلف بصورت ساده و مختصر بیان شده است و برای کسب اطلاعات بیشتر می‌توان از مراجع انتهای دستورالعمل و نیز سایر منابع معتبر استفاده نمود.

۱- بررسي دقت از طريق آزمون تكرارپذيري

بررسي تكرارپذيري يكي از گامهاي اوليه در بررسي يک روش آزمايشگاهي بوده و بمنظور تخمين ميزان عدم دقت يا خطاي راندوم (اتفاقی) آزمايش بكار مي‌رود.

چه نمونه‌هایی می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند :

برای این مطالعه باید نمونه‌های مناسبی انتخاب نمود. محلولهای استاندارد، مواد کنترلی و نمونه‌های انسانی همگی می‌توانند برای این منظور استفاده شوند.

• محلولهای استاندارد در مورد بسیاری از آنالیتها و در غلظتهای مختلف به آسانی قابل دستیابی هستند ولی بعلت اینکه ماتریکس آنها نسبت به نمونه انسانی ساده تر است (نمونه سرم انسان دارای پروتئین بالاتری می‌باشد) ممکن است عدم دقت حاصله از آزمایش آنها بسیار خوب و دور از واقعیت باشد.
• مواد کنترلی از منابع تجاری مختلف در حجمها و غلظتهای مختلف و با پایداری طولانی قابل دستیابی هستند. ماتریکس آنها مشابهت بیشتری نسبت به نمونه انسانی دارد ولی نتیجه حاصل از آزمایش آنها می‌تواند متاثر از عواملی همچون پایدارکننده‌ها، لیوفیلیزاسیون ، برخی افزودنی‌هابرای افزایش مقادیر و تشدید فعالیت آنزیمها و نیز به حجم رساندن باشد.
• از مخلوط نمونه‌های تازه انسانی می‌توان برای مدت کوتاه استفاده کرد مثل آزمایشات دوبل در یک روز

نمونه‌ها در چند غلظت و با چه مقادیری انتخاب شوند :
اینکه نمونه ها در چند غلظت و در چه غلظتی مورد بررسی قرار گیرند بستگی به محدوده تصمیم‌گیری بالینی Decision level دارد . بعنوان مثال برای گلوکز می‌توان ۳ نمونه در غلظتهای ۵۰mg/dL (هیپوگلیسمی) ، ۱۲۰mg/dL (محدوده تشخیصی دیابت) و ۱۶۰mg/dL (محدوده مورد استفاده در GTT) انتخاب نمود و برای کلسترول ۲ نمونه در مقادیر ۲۰۰mg/dL و ۲۴۰mg/dL مناسب می‌باشد.

مدت مطالعه و تعداد دفعات آزمایش :
بطور معمول تکرارپذیري با ۲۰ بار آزمایش کمیت در یک نمونه و محاسبه میانگین و انحراف معیار بدست مي‌آید. مدت مطالعه باید به اندازه‌ای باشد که باعث گردد با تاثیر متغیرهایي که بطور معمول در آزمایشگاه وجود دارند، نتایج واقعي‌تري بدست آید . اگر مطالعه‌اي کوتاه مدت (مثلا در یک سری کاری Within run) انجام شود، طبیعتا نتایج نزدیک به هم حاصل مي‌گردند که باعث می‌شود تخمینی خوش‌بینانه از میزان عدم دقت بدست آید. ولی بهتر است ۲۰ خوانده از آزمایش نمونه در سری های کاری مختلف (Between run) و از طریق یکی از راههای زیر بدست آید:
○ارجح است این تعداد خوانده از تکرار آزمایش در ۲۰ روز کاري (٤ هفته) حاصل گردد.
○روش دیگر، انجام آزمایش بصورت دوتایي در ۱۰ روز کاري است.
○در صورت عدم امکان اجراي روشهاي فوق مي‌توان در ٥ روز کاري ، نمونه را ٤ باردر هر روز آزمایش نمود.

محاسبات آماری :
خطای راندوم از طریق محاسبه انحراف معیار و ضریب انحراف و با استفاده از فرمولهای زیر بدست می‌آید.

$$mean = \frac{\sum x_i}{n} \qquad CV\% = \frac{SD * 100}{mean}$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (xi - mean)^2}{n-1}}$$

CV : ضریب انحراف (Coefficient of variation)
x_i : هر تک خوانده
SD: انحراف معیار (Standard deviation)
mean : میانگین
n : تعداد خوانده‌ها

با توجه به اینکه میزان انحراف معیار تابعی از غلظت نمونه مورد بررسی می‌باشد، بطور معمول CV% شاخص بهتری از عدم دقت سیستم اندازه‌گیری، ارائه می‌دهد.

تفسیر نتایج:

نتیجه حاصله بر حسب CV% با عدم دقت مجاز آزمایشگاه یا ادعای سازنده مندرج در دستورالعمل کیت یا دستگاه مقایسه می‌گردد. CV% حاصله باید کمتر یا معادل عدم دقت مجاز باشد.

مثال:

آزمایشگاهی برای اندازه‌گیری سدیم دستگاه فلیم‌فتومتر خریداری و کنترل تجاری را ۲۰ بار مورد آزمایش قرار داده و نتایج زیر را بدست آورده است :

۱۲٤	۱۲۹	۱۳۲	۱۳۲
۱۲٦	۱۲۹	۱٤۳	۱۲۳
۱۳۲	۱۲۷	۱۳۲	۱۲۹
۱۲۳	۱۳۲	۱۳۲	۱۲٥
۱۳۲	۱۳۲	۱۲۸	۱۲۸

همانطور که در جدول مشاهده می‌شود محدوده نتایج بین ۱۲۳ تا ۱٤۳ قرائت گردیده است. میانگین ۱۲۹,٥ و انحراف معیار معادل ٤,٥ می‌باشد. با محاسبه نتایج فوق CV% در حدود ۳,٥٪ بدست میآید که با هیچیک از معیارهای خطای مجاز همخوانی ندارد.
پس از بررسی مراحل کاری ، تماس با شرکت پشتیبان و تنظیم مجدد سیستم نتایج زیر حاصل گردیده که در آن میانگین۱۳۱ ، انحراف معیار۱,۰٥ و CV% معادل ۰,۸٪ بوده که با معیار CLIA (۰,۷٦٪) مطابقت دارد.

۱۳۲	۱۳۰	۱۳۲	۱۳۰
۱۳۱	۱۳۲	۱۲۹	۱۳۰
۱۲۹	۱۳۱	۱۳۱	۱۳۲
۱۳۱	۱۳۲	۱۳۲	۱۳۰
۱۳۱	۱۳۲	۱۳۲	۱۳۲

مقایسه دقت دو روش آزمایشگاهی:

برای اینکه دقت و بعبارتی تکرارپذیری دو روش آزمایشگاهی با یکدیگر مقایسه شود، می‌توان از آزمون آماری F-Test استفاده نمود. برای انجام این آزمون ابتدا یک نمونه با هر دو روش به دفعات مورد آزمایش قرار می‌گیرد. سپس انحراف معیار هردو گروه نتایج محاسبه و در فرمول F قرار می‌گیرد می‌گردد. صرف نظر از نوع روش آزمایشگاهی، انحراف معیار بزرگتر در صورت کسر و انحراف معیار کوچکتر در مخرج کسر قرار داده می‌شود:

$$\boldsymbol{F = \frac{(SD_1)^2}{(SD_2)^2}}$$

منظور از SD_1 انحراف معیار بزرگتر و SD_2 انحراف معیار کوچکتر است. برای تفسیر نتیجه می‌بایست عدد حاصله از فرمول بالا را با توجه به تعداد تکرار آزمایش، با جدول مقادیر بحرانی F که در کتب آماری قابل دستیابی است، مقایسه نمود. اگر عدد حاصله از میزان F بحرانی بیشتر باشد، اختلاف معنی‌دار بوده و تکرارپذیری روشی که انحراف معیار کوچکتری دارد، به لحاظ آماری نیز بهتر است و اگر عدد حاصله از میزان F بحرانی کمتر باشد، اختلاف معنی‌دار نبوده و تکرارپذیری دو روش با هم تفاوت ندارند.

مثال : ازمایشگاهی برای اندازه‌گیری آمیلاز دو نوع کیت خریداری و می‌خواهد تکرارپذیری آنها را با هم مقایسه نماید. بدین منظور یک نمونه کنترلی را با هر دو روش ۲۰ بار آزمایش و نتایج زیر را بدست آورده است

کیت تحت کنترل		کیت آزمایشگاه	
۹۰	۷۸	۹۷	۹۸
۸۸	۸۹	۹٤	۸۹
۹۸	٦۳	۹۳	۸۷
۸۷	۹٦	۹۷	۷٦
۸۹	۹٥	۹٦	۷۹
۹۲	۷٦	۹۳	۹۷
۹۰	۹۸	۸۹	۹٥
۸۸	۹٦	۸۸	۹۸
٦٥	۹۸	۷۹	۸۸
۷٦	۹۰	۸٦	۸۹

برای استفاده از فرمول F به روش زیر عمل می‌نماید:

$$\boldsymbol{F = \frac{(90.4)^2}{(87.1)^2}}$$

$$\boldsymbol{F = 1.07}$$

با مراجعه به جدول F مقدار F بحرانی برای ۲۰ بار تکرار (درجه آزادی بابر است با n-۱

۹۰,٤	mean	۸۷,۱	mean
٦,٦٥	SD	۱۰,۳٥	SD

یعنی ۱-۲۰ یا ۱۹) با $P = ۰,۰٥$ معادل ۲,۱٦ بدست می‌آید.

نظر به اینکه عدد F در محاسبات آماری آزمایشگاه ۱,۰۷ بوده که کمتر از ۲,۱٦ است، تکرارپذیری دو روش باهم اختلاف معنی‌دار ندارد.

۲- بررسي صحت :

صحت یک روش آزمایشگاهي از راههاي مختلفي بررسي می‌گردد که یکي از آنها اندازه‌گیری کمیت مورد نظر در ماده مرجع و مقایسه نتیجه حاصله با مقدار مورد انتظارمي‌باشد. باید در نظر داشت کنترلهاي تجاري که در انواع مختلف در بازار عرضه مي‌شوند عموما ارزش صحتي ندارند و نباید براي این منظور استفاده شوند. تنها موادي براي این منظور قابل استفاده هستند که توسط روشهاي مرجع تعیین مقدار شده یا توسط روش مورد بررسی و در مقابل ماده مرجع تعیین ارزش شده باشند.

متاسفانه براي بسیاري از پارامترها مواد یا روشهاي مرجع در دسترس نیست و یا حتي علیرغم عملکرد قابل قبول روش آزمایشگاهي بر روي نمونه‌هاي انساني، به دلایل مختلف مانند اثرات زمینه‌ای خوانش مقادیر ماده مرجع بدرستي انجام نمي‌گیرد.

بهمین جهت روش دوم بررسي صحت از طریق مقایسه روشها Comparison between method ارزش پیدا مي‌کند.

۲-۱ آزمون مقایسه روشها Comparison of methods experiment

آزمون مقایسه روشها بمنظور بررسي خطاي سیستماتیک و عدم صحت انجام مي‌گردد. در این آزمون، خطاي سیستماتیک بر مبناي تفاوت نتایجي که از آزمایش نمونه بیماران ، با استفاده از روش جدید(تحت آزمون) و روش مورد مقایسه بدست آمده است، تخمین زده مي‌شود.

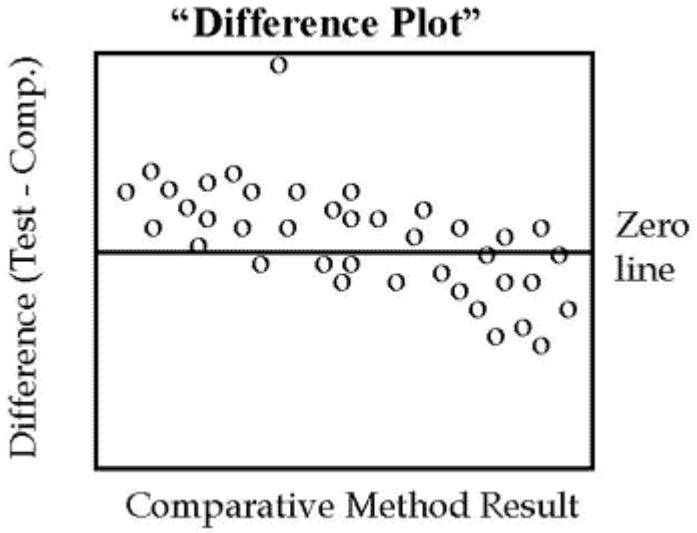
نکات مهم : در انتخاب روشي که در این ارزیابي به عنوان روش مقایسه‌اي استفاده مي‌شود، باید دقت کافي مبذول داشت. زیرا تفسیر نتایج ، بر مبناي ارزش نتایج روش مورد مقایسه و اطمینان از درستي آن انجام شده و تفاوت نتایج حاصله بعنوان خطاي ناشي از روش مورد ارزیابي تلقي خواهد شد. در صورت امکان بهتر است از روش مرجع Reference Method جهت مقایسه استفاده شود.

واژه روش مرجع معرف روشي است كه داراي كيفيت بسيار بالا بوده و خود در مقابل روش قطعي يا Definitive Method يا از طريق رديابي به مواد استاندارد مرجع Standard Reference Material صحيح شناخته شده است.
واژه روش مقايسه‌اي Comparative Method عنوان معمولتري است كه دلالت بر درستي يا نادرستي نتايج و وجود شواهد مستند نمي‌نمايد. اغلب روشهاي رايج آزمايشگاهي در اين گروه رده‌بندي مي‌شوند. هنگام استفاده از اين اينگونه روشها بعنوان روش مورد مقايسه در ارزيابي روشها، بايد نتايج دو روش به دقت مورد مطالعه قرار گيرند. اگر اختلاف نتايج بين دو روش ناچيز باشد بدين معناست كه هر دو روش داراي صحت نسبي مي‌باشند ولي اگر اختلاف زياد باشد بايد مشخص گردد كداميک از روشها صحيح نبوده‌اند.

تعداد نمونه:
حداقل تعداد نمونه كه بايد توسط هر دو روش بررسي شوند، ٤٠ نمونه تعيين شده است. اين نمونه‌ها بايد به گونه‌اي انتخاب شود كه محدوده غلظتي قابل اندازه‌گيري دو روش مورد آزمون و مقايسه‌اي را پوشش داده و نمونه‌هاي با غلظت طبيعي و غيرطبيعي را در بر گيرند. وجود غلظتهاي مختلف بحدي مهم است كه در برخي مقالات عنوان شده كه از آزمايش ٢٠ نمونه كه با دقت انتخاب شده و پراكندگي غلظت آنها در تمام گستره اندازه‌گيري باشد ، اطلاعات بيشتري نسبت به ١٠٠ نمونه كه فاقد اين خصوصيات باشد، بدست مي‌آيد.

محدوده زماني:
براي به حداقل رساندن اثر خطاي سيستماتيک ناشي از يک سري كاري، توصيه مي‌شود ارزيابي مقايسه روشها در روزهاي مختلف انجام شود. حداقل دوره زماني ٥ روز تعيين شده است و روزانه ٨ نمونه بايد با دو روش آزمايش شود.

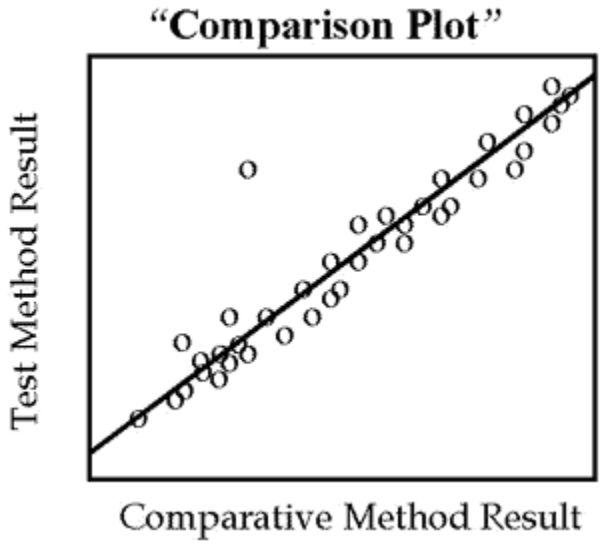
تفسير نتايج :
اساسي ترين روش تحليل، رسم نمودار مقايسه نتايج و بررسي چشمي اختلافات بين نتايج دو روش است. در مورد روشهايي كه انتظار مي‌رود انطباق نقطه به نقطه داشته باشند ، نمودار تفاوتها Difference Plot مورد استفاده قرار مي‌گيرد.



در اين نمودار هر نقطه نشانگر تفاوت نتايج دو روش مختلف در آزمايش يک نمونه و محور صفر نشاندهنده عدم اختلاف نتايج دو روش مي‌باشد. بعبارتي وقتي نقاط، روي محور صفر يا در دو طرف محور صفر و با فاصله اندک نسبت به آن قرار گيرند، بدين معناست که نتايج حاصل از دو روش با هم اختلاف کمي دارند. . وجود هر خوانده دورافتاده نشاندهنده تفاوت نتايج آزمايش حاصل از اندازه‌گيری کميت در يک نمونه، با دو روش بوده و جهت اطمينان از آن، بهتر است نمونه دوباره بررسي شود.

هرگاه در مورد روشهايي که با هم مقايسه مي‌شوند انتظار تطابق نقطه به نقطه نداشته باشيم مي‌بايد از نمودار Comparison Plot استفاده نمود. که مثال آن واکنشهاي آنزيمي مي‌باشد.

در اين نمودار محور X نشانگر روش مقايسه‌اي و نمودار Y نشانگر نتايج روش تحت بررسي مي‌باشد. نقاط تلاقي نتايج روش مورد بررسي روي نمودار نشان داه شده و بهترين خط از بين نقاط ترسيم مي‌شود.



هدف اصلي اين نمودار تشخيص فوري نقاط دور افتاده مي‌باشد تا بتوان تازمانيكه نمونه ها در دسترس هستند ، بررسي مجددي روي آنها صورت داد.

محاسبات آماري:

محاسبات آماري بمنظور تعيين مقادير خطاي سيستماتيک بهتر است در محدوده تصميم‌گيري باليني انجام شود. فرمول رگرسيون خطي و تعيين Slope و Intercept در اين محاسبات مورد استفاده قرار مي‌گيرد.

$Y = a + bX_c$

$SE = Y_c - X_c$

Y : نتيجه روش مورد بررسي

Slope : b

X_c: نتيجه روش مقايسه اي در محدوده تصميم گيري باليني

Intercept : a

SE :خطاي سيستماتيک

بطور مثال در مقايسه دو روش اندازه‌گيري كلسترول، از رگرسيون خطي نتايجی بشرح زير حاصل گرديده است :

a : Intercept معادل ۲mg/dL و b: Slope معادل ۱,۰۳

بعبارتی $Y = ۲ + ۱,۰۳ X_c$

بنابراين در غلظت ۲۰۰mg/dL كلسترول، Y از طريق فرمول زير بدست مي‌آيد:

$Y = ۲ + ۱,۰۳ * ۲۰۰ = ۲۰۸$

در واقع اگر نتيجه آزمايش با روش مورد مقايسه ۲۰۰ mg/dL باشد ، جواب روش تحت آزمون معادلmg/dL ۲۰۸ خواهد بود.

و خطاي سيستماتيک برابر با ۸mg/dL خواهد بود. يعني

$SE = ۲۰۸ - ۲۰۰ = ۸ mg/dL$

ضريب همبستگي r بمنظور برآورد كفايت محدوده مورد بررسي نمونه‌ها و ارزش رگرسيون خطي استفاده مي‌شود. اگر r معادل يا بيش از ۰,۹۹ بود مي‌توان از رگرسيون خطي ساده استفاده كرد و هر گاه كمتر از آن بود بايد نمونه‌هاي بيشتري آزمايش شود يا از محاسبات آماري T-Test يا ساير آزمونهاي آماري پيچيده ، جهت تخمين خطاي سيستماتيک استفاده شود.

در مقايسه روشهايي كه دامنه اندازه‌گيري كوچكي دارند مانند سديم يا كلسيم بهتر است ميانگين تفاوت روشها مورد بررسي قرار گيرد كه همان

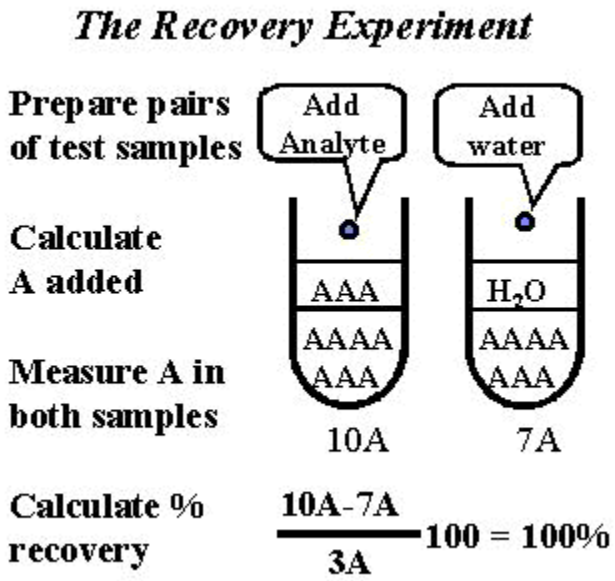
تفاوت میانگین نتایج دو روش بوده و به آن تورش یا Bias نیز اطلاق می‌شود. این شاخص از طریق Paired t test تخمین زده می‌شود.

مجموع خطاي سيستماتيک و خطاي تصادفي بايد از خطاي مجاز کمتر باشد.

۲-۲ آزمون بازیابی Recovery :

بازیابی یک روش کلاسیک برای بررسی عملکرد روشهای آزمایشگاهی می‌باشد ولی بدلیل اشتباهاتی که بطور رایج در تفسیر نتایج رخ می‌دهد کمتر استفاده شده و بجای آن آزمون "مقایسه روشها" بیشتر مد نظر قرار گرفته است ولی در نبود یک روش مقایسه‌ای قابل اعتماد، بازیابی اهمیت بیشتری می‌یابد.
آزمون بازیابی بمنظور تخمین خطای Proportional بکار می‌رود. این نوع خطا اغلب بعلت وجود ماده‌ای در زمینه نمونه که با آنالیت واکنش داده و با معرف رقابت می‌کند ایجاد شده و با افزایش غلظت آنالیت، افزایش می‌یابد. این مطالعه بمنظور بررسی محلولهای کالیبراسیون نیز استفاده می‌گردد.

روش اجرا:
یک نمونه به حجم مساوی در دو لوله ریخته شده در مرحله بعد به حجم مساوی در یکی از آنها آب و در دیگری محلولی که حاوی آنالیت مورد بررسی است (اغلب استاندارد یا محاولهای کالیبراسیون) ریخته می‌شود. هر دو لوله با روش آزمایشگاهی تحت بررسی آزمایش شده و نتایج با هم مقایسه می‌گردد. (شکل زیر)



نکات مهم:

- باید در نظر داشت حجم استاندارد اضافه شده در مقابل حجم نمونه میبایست به حدي باشد که باعث اثرات زمینه اي matrix effect نگردد. در این مورد نسبت ۱۰% پیشنهاد میگردد بعنوان مثال ۰,۱mL از استاندارد به ۰,۹ یا ۱mL اضافه گردد.
- درستي پیپت کردن : با توجه به اینکه حجم نمونه برداشت شده نقش اساسي در آزمون بازیابي دارد، میبایست براي اجراي این آزمون از کارشناسان با تجربه و وسایل با کیفیت استفاده نمود.
- غلظت اضافه شده : نظر به اینکه میبایست براي جلوگیري از اثرات زمینه اي ، حجم استاندارد برداشتي را به حداقل برسانیم، غلظت اولیه استاندارد میبایست بالا باشد بعنوان مثال ۵۰۰ یا ۱۰۰۰mg/dL براي گلوکز
- تعداد دفعات آزمایش بر روي نمونه: پس از تهیه نمونه ها براي به حداقل رساندن خطاي راندم باید نمونه هاي تهیه شده را ۲-٤ با مورد آزمایش قرار داد.
- تعداد نمونه هاي انساني : تعدادي نمونه هاي انساني که در این آزمایش مورد استفاده قرار میگیرند بستگي به آنالیت مورد بررسي دارد. مثلا در مورد پروتئین تعداد کمي نمونه کافي است ولي در مورد بررسي داروها شاید لازم باشد تعداد بیشتري نمونه آزمایش شود.
- تائید روش انجام آزمون : بهتر است نمونه هاي تهیه شده، علاوه بر روش تحت کنترل، با روش مقایسه اي نیز آزمایش شوند. این کار باعث میشود خطاهایي مانند عدم پایداري استاندارد، اشکال در تهیه نمونه و مخلوط نکردن نمونه ها ، شناسایي گردد.

محاسبات :

۱- غلظت آنالیتي را که به نمونه اضافه کرده اید محاسبه نمائید

Standard concentration × (ml standard) / (ml standard + ml specimen)

مثال :اگر براي یک روش اندازه گیري کلسیم آزمون بازیابي انجام میدهید، در صورتیکه ۰,۱ ml از استاندارد ۲۰ mg/dL را به ۱ میلیلیتر سرم اضافه نمائید، مقدار اضافه شده برابر خواهد بود با

۲۰*(۰,۱/۱,۱) =۱,۸۲ mg/dL.

۲- نمونه موجود در هر دولوله (لوله اي که به آن رقیقکننده اضافه شده و لوله اي که به آن آنالیت اضافه شده) را حداقل بصورت دوبل مورد آزمایش قرار دهید و میانگین نتایج را بدست آورید.

Sample A addition = (۱۱,٤ +۱۱,٦)/۲ = ۱۱,۵ mg/dL;

Sample B addition = (۱۱,۲ + ۱۱,۰)/۲ = ۱۱,۱ mg/dL;

Sample A dilution = (٩,٧ + ٩,٩)/٢ = ٩,٨ mg/dL;

Sample B dilution = (٩,٥ + ٩,٥)/٢ = ٩,٥ mg/dL;

٣- اختلاف بين دو نمونه كه به آنها رقيق‌كننده و آناليت اضافه شده محاسبه نمائيد.

Sample A addition = ١١,٥, Sample A dilution = ٩,٨, difference = ١,٧ mg/dL

Sample B addition = ١١,١, Sample B dilution = ٩,٥, difference = ١,٦ mg/dL

بازيابي را از تقسيم اختلاف نتايج دو نمونه حاوي رقيق‌كننده و آناليت (كه در بالا بدست آمد) بر غلظت اضافه شده (كه در بند ١ بدست آمد) محاسبه نمائيد.

(١,٧ mg/dL/١,٨٢ mg/dL)١٠٠ = ٩٣,٤٪ recovery

(١,٦ mg/dL/١,٨٢ mg/dL)١٠٠ = ٨٧,٩٪ recovery

٤- ميانگين بازيابي را محاسبه نمائيد

(٩٣,٤ + ٨٧,٩)/٢ = ٩٠,٦٪ average recovery

٦- مقدار خطاي نسبي يا proportional error را محاسبه نمائيد.

١٠٠ - ٩٠,٦ = ٩,٤٪ proportional error

تفسير :

نتايج حاصله مي‌تواند با Bias% مجاز مقايسه گردد.

۳- بررسی محدوده گزارشدهی از طریق آزمون خطی بودن Linearity

بررسی میزان خطی بودن یک روش ازمایشگاهی، بمنظور بررسی محدوده گزار شدهی بکار می‌رود . با انجام این آزمایش می‌توان محدوده غلظتی را که با استفاده از روش مورد نظر بطور قابل اعتماد قابل گزارش می‌باشد، تعیین کرد.
در این آزمون یک سری از نمونه‌ها با غلظت مشخص و یا نمونه‌های رقیق شده، آزمایش و نتایج آنها پس از نمایش روی نمودار، بصورت چشمی بررسی می‌گردد.

چه نمونه‌هایی می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند :

- بسیاری از تولیدکنندگان سری محلولهای استاندارد با غلظتهای مختلف و مشخص تولید می‌کنند که می‌توانند برای کنترل خطی بودن بکار روند.
- نمونه‌های بیماران با غلظتهای بالا می‌تواند رقیق شده و برای بررسی خطی بودن بکار رود.
- Spike نمودن یک نمونه نیز می‌تواند منجر به تهیه نمونه‌ای با غلظت بالا گردد که خود برای بررسی خطی بودن بکار می‌رود.

رقیق کننده‌ها:

برای رقت‌سازی باید با توجه به ماتریکس نمونه، از رقیق‌کننده مناسب استفاده شود. برخی آنالیتهای بیوشیمی را می‌توان آب یا سالین رقیق نمود. گاهی لازم است نمونه سرم با غلظت بسیار کم از ماده مورد بررسی، بعنوان رقیق‌کننده استفاده گردد. در هر حال برای انتخاب رقیق‌کننده اولین انتخاب توصیه سازنده است.

طرز تهیه:

اگر H بعنوان نمونه با غلظت بالا وL بعنوان نمونه با غلظت پائین در نظر گرفته شود می‌توان رقیق سازی را بشکل زیر انجام داد:

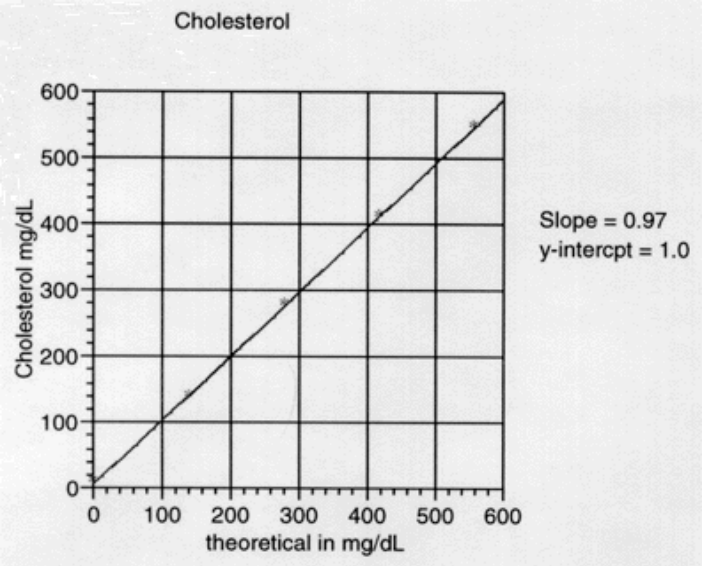
۳ قسمت H و ۱ قسمت L (رقت ¾)
۲ قسمت H و ۲ قسمت L (رقت ½)
۱ قسمت H و ۳ قسمت L (رقت ¼)

با توجه با نیاز می‌توان رقتهای دیگری نیز تهیه نمود.
رقتهای تهیه شده و نمونه‌های رقیق نشده (H و L) بصورت دوتایی (در مراجع ۳تا ٤ بار آزمایش پیشنهاد شده) آزمایش می‌شوند و میانگین نتایج بعنوان نتیجه نهایی، قرار می‌گیرد.

تفسیر :

نتیجه بدست آمده روی محور Y و نتیجه مورد انتظار روی محور X نمایش داده شده و محدوده گزارشدهی با ترسیم بهترین خط که از بین نتایج عبور می‌کند تعیین می‌شود.

بعنوان مثال در شکل زیر میزان خطی بودن برای آزمایش کلسترول تا غلظت ۶۰۰ mg/dL تائید می‌شود.



تصمیم گیري در مورد نتایج ارزیابی روش آزمایشگاهي :

براي تصمیم‌گیري در مورد یک روش آزمایشگاهي باید مقادیر حاصله را با خطاي مجاز مقایسه نمود. همه موارد زیر می‌توانند براي محاسبه خطاي مجاز استفاده شوند . با بکارگیری نمودار تصمیم گیري همه آنها به نوعي لحاظ می‌شوند.

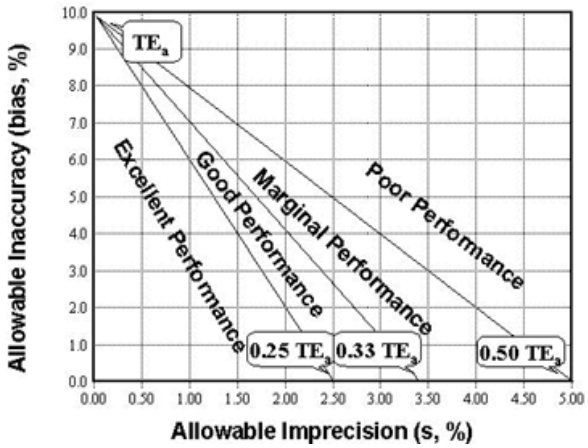
- bias + ۲SD < TEa;
- bias + ۳SD < TEa;
- bias + ٤SD < TEa

براي ترسیم این نمودار محور y را بصورت allowable inaccuracy و محور x را به بعنوان allowable imprecision نمایش دهید. خطاي مجاز به درصد در محور عمودي و نیمي از خطاي مجاز به درصد در محور افقي قرار می‌گیرد. سپس

۱- از بالاترین حد مجاز محور عمودي (در شکل زیر ۱۰٪) خطي به انتهاي محور افقي یعني TAE ۰,۵۰ (که در مثال معادل ۵٪ است) کشیده میشود.

۲- خط دوم از بالاترین مقدار محور عمودي (در شکل زیر ٪۱۰) به TAE ۰,۳۳ ، که در مثال معادل ٪۳,۳ است کشیده می‌شود.
۳- خط سوم از بالاترین نقطه به TAE ۰,۲۵ که در مثال معادل ٪۲,۵ است، کشیده مي‌شود.

این سه خط در واقع به ترتیب نمایش ۳ فرمول بالا مي‌باشند.



در مرحله بعد نتایج عدم دقت بر حسب CV% روي محور افقي و نتایج بررسي صحت بر حسب Bias% روي محور عمودي قرار گرفته و نقطه تلاقي روي نمودار نمایش داده مي‌شود. محل نقطه تلاقي نشاندهنده عملکرد سیستم آزمایشگاهي مي‌باشد.

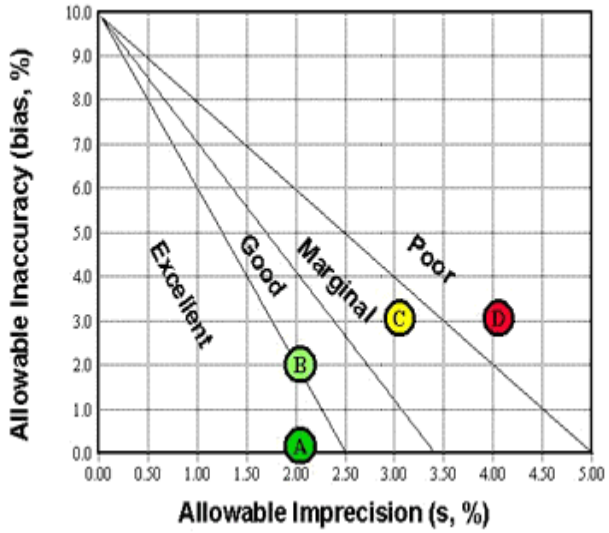
مثال : بر اساس معیارهای CLIA خطای تام مجاز کلسترول معادل ٪۱۰ است لذا نمدار مطابق توضیحات ترسیم شده و عملکرد ٤ کیت سنجش کلسترول نمایش داده شده است:

A: کیت اندازه‌گیری کلسترول که CV% آن ٪۲ و bias آن معادل ٪۰ است. با توجه به محل تقاطع CV% روي محور افقي و Bias% که در منطقه Excellent قرار گرفته، عملکرد این کیت عالی در نظر گرفته می‌شود.

B: در کیت دوم CV% برابر ٪۲ و bias معادل ٪۲ است. تقاطع نقاط در محل Good قرارگرفته و عملکرد کیت خوب در نظر گرفته می‌شود.

C: کیت سوم CV% برابر ٪۳ و bias معادل ٪۳ دارد که معیارهای NCEP می‌باشد. عملکرد بینابینی است و باید همیشه به نتایج حاصل از این کیت توجه ویژه داشت.

D: کیت سوم CV% برابر ٪٤ و bias معادل ٪۳ دارد که تقاطع نتایج در محدوده عملکرد نامناسب قرار گرفته و کیت برای استفاده در آزمایشگاه مناسب نیست.



٤- بررسی محدوده مرجع

هدف

آخرین ویژگی که درروند ارزیابی روشها مورد مطالعه قرار میگیرد، محدوده مرجعReference Interval میباشد و این بررسی فقط هنگامی ضرورت میابد که کیت ویژگی عملکردی (مقادیر عدم دقت و عدم صحت و مجموعا خطای تام) قابل قبولی داشته باشد .

مقدمه

واژه "محدوده مرجع "که مدتهاست جایگزین واژه منسوخ "دامنه طبیعی" (Normal Range) گردیده ، بطور معمول از ارزیابی کمیت های مختلف در نمونه های بدست آمده از افرادی با ویژگی های مشخص و تعریف شده (گروه مرجع)، بدست می‌آید . روشهای انتخاب افراد وگروه مرجع در استانداردهای IFCC وCLSI (NCCLS C٢٨-A) شرح داده شده است . در این مراجع، حداقل تعداد نمونه و افراد مورد بررسی ، ١٢٠ نمونه در نظر گرفته شده که با استفاده از معیارهای جداسازی و گروه بندی انتخاب میشوند.

تهیه و معرفی" محدوده مرجع " نیازمند برنامه ریژی ، کنترل و مستند سازی بسیاردقیق بوده و کلیه عوامل پیش از تجزیه و پس از تجزیه باید کاملا در این روند مشخص باشند . نیاز به تعیین محدوده مرجع معمولا هنگامی محسوس است که یک آزمایشگاه در دستورالعمل کیتها و یا روشهای تایید شده قبلی تغییراتی انجام داده ویآ از روشهای راه اندازی شده درهمان آزمایشگاه استفاده مینماید .

از آنجایی که تعیین محدوده مرجع با توجه به دستورالعمل‌های استاندارد ، شرایط کاری دشوار ونیاز به صرف هزینه قابل توجه و تنوع کیتها و روشهای مورد استفاده آزمایشگاهها برای اکثر آزمایشگاهها میسر نمی باشد، سازندگان کیتها در تعیین محدوده مرجع مورد اطمینان نقش مهمی

ایفا نموده و آزمایشگاهها میتوانند فقط امکان انتقال و استفاده از محدوده معرفی شده را بررسی نمایند .

با توجه به ضرورت و اهمیت پدیده " انتقال محدوده مرجع "،در این دستورالعمل "روشهای انتقال محدوده مرجع " معرفی میشود .

روشهای بررسی قابل قبول بودن انتقال محدوده مرجع

■حالت اول - انتقال محدوده مرجع یک کمیت از یک آزمایشگاه به ازمایشگاه دیگر زمانیکه از سیستم اندازه گیری (روش و ابزار) یکسان استفاده میشود :

۱- Divine judgment

در این حالت باید کلیه اطلاعات دموگرافیک و جغرافیایی نمونه ها ی مورد اندازه گیری با هردو روش (روشی که برای آن قبلا محدوده مرجع تعیین شده و روشی که میخواهد از محدوده مرجع این روش استفاده نماید) وهمچنین جزئیات دستورالعملهای قبل و حین تجزیه ، ویژگیهای عملکردی ، مجموعه کامل ارزشهای مرجع و روشهای محاسبه محدوده مرجع در هردو روش در دسترس بوده و در صورتیکه انطباق آنها مورد قضاوت مسئول آزمایشگاه قرار گرفته و این انطباق مورد تائید مسئول آزمایشگاه قرار گیرد ، استفاده از محدوده مرجع از پیش تعیین شده ، بدون هیچگونه ارزیابی عملی در آزمایشگاه با مسئولیت مسئول آزمایشگاه میسر میباشد .

۲- ارزیابی عملی محدوده مرجع با ۲۰ نمونه :

در این روش نمونه های ۲۰ فرد (جمعیت مرجع روش جدید) در صورتیکه این افراد دارای شرایط جغرافیایی ودموگرافیک مشابه با جمعیت مرجع روش قبل (روشی که برای آن محدوده مرجع تعیین شده است) باشند، مورد اندازه گیری کمیت خاص قرار میگیرد .(بطور مثال مانند زمانیکه برای کیت اول مورد استفاده در آزمایشگاه، محدوده مرجع قابل اطیمنان تعیین شده و آزمایشگاه میخواهد روش فعلی را به روش دوم تغییر دهد). اگر حداکثردو نتیجه از نتایج حاصله در محدوده مرجع روش قبل قرار گیرد آزمایشگاه میتواند از آن محدوده مرجع برای روش جدید استفاده نماید . اگر بیش از دونتیجه خارج از محدوده مرجع قرار گیرد در اینصورت میباید ۲۰ فرد دیگر انتخاب شده و برروی آنان آزمایش انجام شود اگر مجددا بیش از ۲ نتیجه خارج ازمحدوده مرجع قرار گیرد یعنی از این محدوده مرجع نمی‌توان استفاده کرد و باید برای روش اخیر محدوده مرجع جدید تعیین گردد.

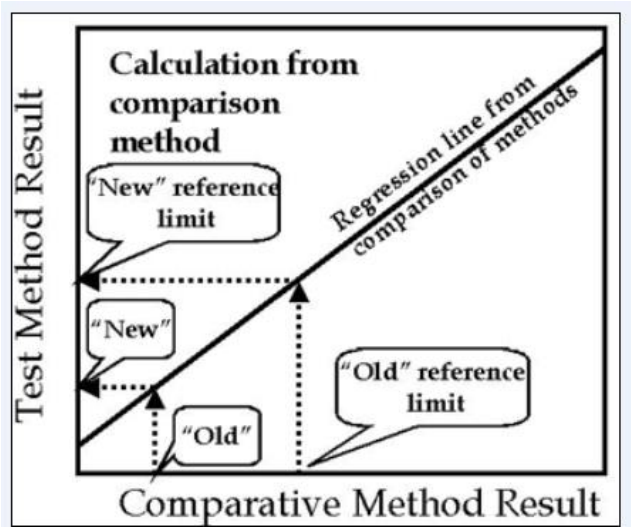
۳- ارزیابی عملی محدوده مرجع با ٦۰ نمونه

در این روش میباید نتایج حاصله از اندازه‌گیری کمیت خاص در ٦۰ فرد را با محدوده مرجع کیت قبل مقایسه نمود . پس از انجام آزمایش بر روی نمونه ها ، موارد دورافتاده حذف شده و از روشهای محاسباتی خاص مطابق دستورالعمل برای حذف خوانده های دور افتاده ، تطابق با محدوده روش

مورد مقایسه پیروی نمود. در صورتیکه تفاوت معنی داری بین نتایج دو روش مشاهده شد میباید تعداد نمونه را افزایش داده مطالعه کامل محدوده مرجع انجام شود. طبق دستورالعملها برای تعیین محدوده مرجع حداقل میباید نتایج حاصله از اندازه گیری یک کمیت در ۱۲۰ فرد مرجع مورد مطالعه قرار گیرند. دشواری مرحله مقایسه آماری، جذابیت استفاده از روش قبل (استفاده از ۲۰ نمونه) را بیشتر میکند.

٤- استفاده از محاسبه رگرسیون خطی

در صورتیکه محدوده مرجع روش مورد استفاده آزمایشگاه، در همان آزمایشگاه تعیین شده باشد و آزمایشگاه در صدد استفاده از روش جدیدی باشد، میتواند با استفاده از محاسبات رگرسیون ، از محدوده مرجع روش قبل استفاده نموده و برای روش جدید محدوده مرجع معرفی نماید .



در رابطه $Y = a + bX$ اگر $x=۱۵۰$ U/l و $a=۱$ و $b=۲$ باشد ، پس Y برابر خواهد بود با

$Y = ۱+ ۲*۱۵۰=۳۰۱$ U/l

یعنی اگر حدمرجع

■ **حالت دوم - زمانیکه جمعیت مورد بررسی با جمعیت مرجع اولیه انطباق داشته ولی از سیستم های اندازه گیری (روش و ابزار) مختلف استفاده میشود با مطابق دستورالعمل مقایسه روشها استفاده نمود .**

۱- ٤۰ نمونه سرم بیمار در گستره اندازه گیری روشها انتخاب شود

۲- به مدت ۵ روز ، روزانه ۸ نمونه در حداکثر فاصله زمانی دو ساعت با هردوروش مورد اندازه گیری قرار گیرد .
۳- هرروز نتایج را بلافاصله برروی نمودار برده وارتباط نتایج بطور چشمی بررسی میشود هرگونه خوانده دور از انتظار میباید تکرار گردد.
٤- اگر نتایج تفاوت حاصل شده باشد کلیه مراحل ۵ روز دیگر تکرار میگردد.
۵- correlation / coefficient انجام شده و اگر r > ۰. ۹ بود رگرسیون خطی ساده انجام شده و خطای سیستماتیک در محدوده تصمیم گیری تخمین زده میشود. در این مرحله می‌توان
٦- اگر r<۰. ۹ باشد خطای میانگین خوانده هارا از طریق t-test محاسبه کرده وسپس خطای کلی در محدوده تصمیم گیری تخمین زده میشود.

Y = a + bX

SE (systematic error) = Y - X

ALP comparison study :

X= ۲۰۰ mg/dl

Y = a + bX

a=۲ slope=۱ , ۰۳

Y = ۲ , ۰ + ۱ , ۰۳X =۲۰۸

systematic error = ۲۰۸-۲۰۰ = ۸

مـراجع :

١. *Burtis C.A , Ashwood E.R ,TIETZ Textbook of clinical chemistry Fourth edition , Saunders , ٢٠٠٦ ,*

٢. *Burtis C.A , Ashwood E.R ,TIETZ Textbook of clinical chemistry, Third edition , Saunders , ١٩٩٩*

٣. *McPhersonR.A, PincusM.R , Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, SAUNDERS ELSEVIER , ٢٠٠٦,pp.*

٤. *Fraser C.G, Generation and application of analytical goals in laboratory medicine, Ann. ١st.super.sanita. vol. ٢٧,N. ٣(١٩٩١).pp. ٣٦٩- ٣٧٦*

٥. *Badrick T , Quality leadership and quality control, Clin Biochem Rev Vol ٢٤ August ٢٠٠٣/pp.٨١- ٣*

٦.*Ricos C, Alvarez V, Cava F, Garcia-Lario JV, Hernandez A, Jimenez CV, Minchinela J, Perich C, Simon M. "Current databases on biologic variation: pros, cons and progress." Scand J Clin Lab Invest ١٩٩٩;٥٩:٤٩١- ٥٠٠*

٧. *NCCLS Document* EP٩-A٢ Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline—Second Edition

٨.*NCCLS Document C٢٤-A٢ Vol. ١٩ No. ٥ Statistical Quality Control for Quantitative Measurements: Principles and Definitions; Approved Guideline—Second Edition, February ١٩٩٩*

٩.*NCCLS Document EP١٣- R Laboratory Statistic – Standard deviation : A Report, Agust ١٩٩٥*

١٠. *NCCLS Document*

١١. *James O. Westgard, Ph.D.*METHOD VALIDATION - THE COMPARISON OF METHODS EXPERIMENT

١٢. *James O. Westgard, Ph.D.*METHOD VALIDATION - THE DECISION ON METHOD PERFORMANCE

١٣. *James O. Westgard, Ph.D.* METHOD VALIDATION - THE INTERFERENCE AND RECOVERY EXPERIMENTS

١٤. *James O. Westgard, Ph.D.* METHOD VALIDATION - THE LINEARITY OR REPORTABLE RANGE EXPERIMENT

١٥. *James O. Westgard, Ph.D.* METHOD VALIDATION -THE REPLICATION EXPERIMENT

١٦. *James O. Westgard, Ph.D.* METHOD VALIDATION - REFERENCE INTERVAL TRANSFERENCE