



وبینار صحه گذاری و تایید روش ها

پنجمین قسمت از مجموعه ی هفتگانه کنترل کیفیت تخصصی

بهمن ماه 1404- دکتر مظفر جبّاری

4	صحت‌گذاری
6	منافع صحت‌گذاری
9	عوامل مؤثر در تعیین فواصل زمانی کالیبراسیون
10	بررسی میانگین یا تارگت ادعایی تولیدکننده
11	تأیید محدوده ادعایی تولیدکننده
13	ارزیابی کیت
13	انواع CV
13	CV درون دوری Intraassay
13	CV بین دوری Interassay
13	CV درون فردی
13	CV بین فردی
14	CV تجمعی Cumulative
14	CV تجمعی Pooled CV
14	روش‌های تعیین Bias در آزمایشگاه
14	خطاهای مجاز در آزمایشگاه
15	تأیید دقت
15	تکرارپذیری
15	نوسان درون دوری
15	تجدیدپذیری
17	ارزیابی صحت
17	استفاده از آزمون Ttest و مقایسه روش‌ها
17	تأیید صحت با استفاده نمونه بیماران
19	ارزیابی کنترل
19	بررسی میانگین یا تارگت ادعایی تولیدکننده
20	تأیید محدوده ادعایی تولیدکننده
21	ارزیابی کیت
21	تأیید دقت
27	آزمون F یا Fratio

29	ارزیابی صحت
	تأیید به روش CLSI EP15 این آزمون بر اساس سند CLSI EP15-A2 انجام می‌شود. در این بررسی اگر مقدار Bias آزمایشگاه در محدوده تأیید قرار داشته باشد. ادعای تولیدکننده تأیید می‌شود. روش پیشنهادی CLSI EP15 برای تأیید درستی شامل دو شکل است: . استفاده از نمونه‌های بیماران 2. استفاده از مواد مرجع دارای مقادیر مشخص
29	تأیید صحت با استفاده نمونه بیماران
31	تأیید Bias به روش CLIA
32	ارزیابی محدوده مرجع
32	تأیید محدوده مرجع
34	تعیین محدوده مرجع
34	خارج کردن داده‌های پرت
37	ارزیابی محدوده خطی کیت
37	ارزیابی محدوده خطی بر اساس خطای کل مجاز
40	محدوده‌های پائین سنجش
41	مرز شاهد
42	محدوده تشخیص
43	محدوده کمی

وبینار صحت‌گذاری و تأیید روش‌ها

صحت‌گذاری

بخش مهمی از تضمین کیفیت است که دستورالعمل‌های اجرایی و مراحل انجام تست را ارزیابی نموده و در نهایت اطمینان از کیفیت و اثربخشی و قابلیت اطمینان از تست را نشان می‌دهد. صحت‌گذاری روش‌ها، اساساً فرایند تعریف یک الزام آنالیتیکال و تأیید این نکته است که آیا قابلیت‌های روش موردنظر با کاربردهای آن مطابقت دارند یا خیر؟ صحت‌گذاری ابزاری مناسب برای کنترل تغییرات در سیستم آزمایشگاه است؛ به این شکل که در زمان ارائه یک روش یا دستگاه جدید یا نرم‌افزار جدید عملکرد صحیح آن را تأیید کرده و اطمینان حاصل می‌نماید. صحت‌گذاری روش معمولاً رابطه تنگاتنگی با توسعه روش دارد. بسیاری از ویژگی‌های عملکردی روش که با صحت‌گذاری روش مرتبط هستند، معمولاً به عنوان بخشی از توسعه روش ارزیابی می‌شوند. آزمون‌هایی که احتمالاً بر روی مواد یکسان در شرایط یکسان انجام می‌گیرند، به طور معمول

به نتایج یکسانی ختم نمی‌شوند، این به دلیل وجود خطاهای ذاتی اتفاقی در هر رویه است، عواملی که بر نتایج یک آزمون تأثیر گذاشته و قابل کنترل نیستند. در تفسیر عملی داده‌های یک آزمون، این متغیرهای ذاتی می‌بایست محاسبه شوند؛ به عبارتی اختلاف بین نتایج آزمون و مقدار واقعی، ناشی از مقادیر خطاهای اتفاقی است که سبب انحراف نتایج آزمون از مقادیر واقعی است.

در کاربرد یکرویه آزمون‌های پارامترهای مختلفی در تغییرات نتایج آزمون شرکت دارند:

اپراتور

دستگاه مورد استفاده

کالیبراسیون دستگاه

شرایط شامل دما، رطوبت، فشار هوا

کنترل کیفیت Quality Control: مجموعه فرایندها و فعالیت‌هایی که باهدف حصول اطمینان از کیفیت محصولات یا خدمات در یک سازمان انجام می‌شود. (آزمون‌های کنترل کیفی - ارزیابی داده‌ها - ممیزی)

تضمین کیفیت Quality Assurance: مجموعه فعالیت‌ها و فرایندهای که به منظور نظارت بر فرایندهای کنترل کیفیت و حصول اطمینان از اینکه محصولات یا خدمات به استانداردهای کیفیت مشخص شده و انتظارات مشتریان پاسخ می‌دهند، انجام می‌شود. (تأکید روی پیشگیری)

مدیریت کیفیت Quality Management: مجموعه فعالیت‌ها و فرایندهایی که به تعیین اهداف و چهارچوب‌های موردنظر در فرایندهای کنترل کیفیت و بهبود مستمر می‌پردازد (با پیروی از استانداردهایی نظیر ISO)



هدف از ص‌ح‌ه‌ گ‌ذ‌ار‌ی روش‌ها

به طور خلاصه هدف از ص‌ح‌ه‌ گ‌ذ‌ار‌ی شامل موارد زیر است:

شناسایی منابع خطای بالقوه و سنجش کمی آنها.

تعیین اینکه آیا روش آزمون برای استفاده در نظر گرفته شده مناسب است یا خیر؟

اثبات اینکه یک روش می‌تواند برای تصمیم‌سازی مورد استفاده قرار گیرد.

برآورده سازی الزامات مراجع اعتباردهی و قانونی، مانند نظام تأیید صلاحیت، اداره استاندارد، وزارت بهداشت و...

به صورت روزانه میلیون‌ها اندازه‌گیری و آزمون در آزمایشگاه‌های سراسر دنیا انجام می‌شوند. نتایج، پشتیبان تصمیمات مهمی هستند به عنوان مثال روشی برای ارزش‌گذاری کالاها با اهداف تجاری، پشتیبانی از سلامت، بررسی کیفیت مواد دارویی، آب آشامیدنی، غذا و خوراک دام و فراهم کردن شواهد در تحقیقات جنایی. به صورت تقریبی هر جنبه‌ای از جامعه به شکلی توسط فعالیت‌های آزمون، حمایت می‌شود.

بسیاری از کارکنان آزمایشگاه می‌دانند که انجام ص‌ح‌ه‌ گ‌ذ‌ار‌ی روش آزمون دارای اهمیت زیادی است؛ ولی اینکه به صورت دقیق چرا، چگونه و چه هنگامی ص‌ح‌ه‌ گ‌ذ‌ار‌ی روش‌های آزمون میبایست انجام شود، همواره شفاف نیست. مطابق با الزامات استاندارد ایزو 15189 و ایزو 17025 چهار دسته روش آزمون نیاز به ص‌ح‌ه‌ گ‌ذ‌ار‌ی دارند:

(الف) روش‌های استاندارد نشده؛

(ب) روش‌های تدوین شده توسط آزمایشگاه؛

(ج) روش‌های استاندارد که خارج از حوزه کاربرد موردنظر آنها به کار گرفته می‌شوند؛

(د) روش‌های اصلاح شده.

ص‌ح‌ه‌ گ‌ذ‌ار‌ی روش آزمون فرایندی است که طی آن آزمایشگاه اثبات می‌کند که آیا روش آزمون مناسب برای هدف یا استفاده موردنظر است یا خیر. بدین معنی که آزمون‌های انجام شده بایستی باتوجه به عدم قطعیت اندازه‌گیری،

هزینه، زمان و غیره مناسب باشند. گزارش ارائه شده بایستی داده های مربوط به نتیجه آزمون را به شکلی ارائه نماید که مشتری بتواند به راحتی آن را تفسیر کند و نتیجه گیری های مقتضی را اتخاذ نماید.

برای چه صحه گذاری روش ضروری است؟

برای اثبات اینکه آنچه ما ادعا می کنیم درست است.

برای افزایش ارزش نتایج آزمون.

برای توجیه اعتماد مشتری.

و...

منافع صحه گذاری

- مقررات قانونی در آزمایشگاه رعایت شده و آزمایشگاه مطمئن می شود که تست های قابل اعتماد هستند و جواب های قابل قبول و صحیح ارائه می دهد.
- کاهش هزینه ها و افزایش بهره وری.
- افزایش سهم بازار در شرایط رقابت.
- بهبود شهرت و اعتبار.
- بهبود روحیه کارکنان.
- افزایش منافع و امنیت شغلی.
- زندگی بهتر برای آحاد جامعه.
- به دست آوردن مزیت های رقابتی در بین رقبای.

مراحل اجرایی فرایند صحه گذاری

مراحل اجرایی صحه گذاری به ترتیب اولویت به صورت زیر است:

Precision دقت

Accuracy صحت

خطی بودن Linearity یا محدوده گزارش دهی یا Reportable Range

Specificity ویژگی

Sensitivity حساسیت

Reference Interval Calculation تعیین محدوده مرجع

Reference Interval Verification تأیید محدوده مرجع

Reference Interval Transferences انتقال محدوده مرجع

Decision Limit تعیین محدوده تصمیم‌گیری

Recovery بازیافت

Interference تداخل

Uncertainty عدم قطعیت

Verification of Analytic Accuracy تأیید صحت دستگاه

Comparison Methods مقایسه روش‌ها

به‌غیر از موارد فوق، موارد دیگری نیز در آزمایشگاه وجود دارد که می‌توانند برای اطمینان از اعتبار روش آنها را ارزیابی نمود. مانند:

تعیین مرزهای پائین سنجش شامل:

Limit of Blank LoB - محدوده شاهد

Limit of Detection LoD - محدوده سنجش مرزی

Limit of Quantitation (Limit of Quantification) LoQ - محدوده مرز اندازه‌گیری

تعیین محدوده اطمینان Confidence Interval

Verification Interval تعیین محدوده تأیید

و...

مؤسسه غذا و داروی آمریکا (FDA) بر اساس پیچیدگی، تست‌ها را به دودسته آزمایش‌های صرف‌نظرکردنی یا بدون پیچیدگی و آزمایش‌های صرف‌نظرکردنی با پیچیدگی متوسط و بالا تقسیم کرده است.

- Waived tests (No complexity)
- Non-waived tests (moderate & high complexity)

Waived tests approved by FDA, verification of performance characteristics

- Accuracy
- Precision
- Reportable range of test results / Linearity
- Reference interval

Non-waived tests modified or developed in-house Establishing

- Accuracy & Precision
- Analytical sensitivity & specificity
- Reportable range of test results

- Reference interval
- Any other performance characteristic required for test performance

آزمایش‌های صرف‌نظرکردنی

آزمایش‌های صرف‌نظرکردنی شامل آن دسته از آزمایش‌هایی می‌شوند که از نظر CLIA و مراکز مشابه و یا دستورالعمل‌های کشوری نیاز به صحت‌گذاری توسط مصرف‌کننده ندارند. این آزمایش‌ها معمولاً پیچیدگی زیادی در روش انجام نداشته و پزشکان بر اساس نتایج آن در خصوص درمان یا تشخیص بیماری تصمیم‌گیری نمی‌کنند. بسیاری از آزمایش‌هایی که بر بالین بیمار انجام می‌گیرد (POCT) و تست‌های غربالگری از این دسته هستند. معمولاً تجهیزات مورد استفاده برای انجام این آزمایش‌ها در اکثر موارد نیاز به فرایند صحت‌گذاری دارند و به‌عنوان راهنما و کلید تشخیصی برای انجام آزمایش‌های تکمیلی یا تأییدکننده است و توسط پزشکان در مطب یا در بعضی از مراکز بهداشتی یا مراکز غربالگری و مراکز مشابه جهت راهنمایی اولیه برای پزشکان انجام می‌گیرد.

آزمایش‌های صرف‌نظرنکردنی

آزمایش‌های صرف‌نظرنکردنی شامل بیشتر آزمایش‌هایی می‌شوند که به‌طور معمول در آزمایشگاه‌های پزشکی انجام می‌شوند. بر اساس ضوابط و مقررات بسیاری از کشورها از جمله CLIA بایستی قبل از استفاده این روش‌ها و آزمایش‌های مرتبط در آزمایشگاه صحت‌گذاری و یا تصدیق انجام گیرد. آزمایش‌های صرف‌نظرنکردنی خود نیز به دو دسته آزمایش‌هایی با پیچیدگی‌های کم که بیشتر شامل روش‌های خودکار و بسته می‌شوند و آزمایش‌هایی با پیچیدگی‌های بالا که بیشتر شامل روش‌های دستی می‌شوند تقسیم می‌شود. مؤسسه CLIA توصیه می‌کند که برای تست‌های Waived طبق دستورالعمل سازنده رفتار شود و صحت‌گذاری برای تست‌هایی که از پیچیدگی بیشتری برخوردار است انجام شود. ولی اگر آزمایشگاه در روش خود تغییر ایجاد کند یا خود روشی را راه‌اندازی کرده باشد اقدامات بیشتری برای صحت‌گذاری روش باید انجام دهد. همچنین CLIA تأکید نموده بعد از این بررسی‌ها به تصمیم‌گیری در مورد کنترل کیفیت و کالیبراسیون و همچنین صحت‌گذاری‌های دوره‌ای نیازمندیم.

زمان انجام کالیبراسیون

دوره‌های کالیبراسیون بر اساس منابع مختلف به‌طور کلی بر اساس الگوی زیر است؛ ولی فواصل زمانی کالیبراسیون تجهیزات یک بحث علمی است که در ادامه به آن اشاره می‌شود.

- هر تجربه ای که یک تغییر تدریجی را مطرح کند نیاز به کالیبراسیون دارد.
- وجود نتایج غیرقابل قبول نتایج کنترل که با راه‌کارهای دیگر حل نشده باشد.
- بر اساس مقررات CLIA حداقل هر 6 ماه یک بار باید کالیبراسیون تجدید شود.

- طبق دستورالعمل سازنده در فواصل کوتاه‌تر ممکن است نیاز به کالیبراسیون باشد.
- بعد از تغییر هر شماره سریال ساخت معرف‌ها که تصدیق کالیبراسیون تأیید نشده باشد.
- بعد از هر تعمیر و سرویس دستگاه برای راه‌اندازی مجدد کالیبراسیون الزامی است

عوامل مؤثر در تعیین فواصل زمانی کالیبراسیون

- توصیه سازنده دستگاه
- تعداد دفعات و شدت استفاده از دستگاه (گسترده‌گی و دشواری کاربرد)
- شرایط محیطی و عملکردی
- عدم قطعیت اندازه‌گیری
- حداکثر خطای مجاز
- تنظیم یا تغییر در پارامترهای دستگاه
- تأثیر کمیت اندازه‌گیری شده (مانند اثر دمای بالا، بر ترموکوپل)
- داده‌های منتشرشده درباره وسایل اندازه‌گیری مشابه
- نوع دستگاه
- روند تغییرات داده‌های حاصل از نتایج ارزیابی‌های قبلی
- سوابق نگهداری و تعمیر
- تواتر و کیفیت ارزیابی‌های میاندوره‌ای
- نحوه حمل‌ونقل دستگاه
- سطح آموزش کارکنان
- هزینه کالیبراسیون

ارزیابی کنترل

کنترل دقت نیز مانند کیت‌ها باید بر اساس معیارهای مورد استفاده ارزیابی شوند و باتوجه به میزان عدم دقت و عدم صحت روش‌های اندازه‌گیری در آزمایشگاه مقدار میانگین و محدوده ادعایی تولیدکننده نیز باید بر اساس تغییرات آزمایشگاه تعیین شوند.

این ارزیابی از این جهت لازم است که به دلیل اختلاف شرایط اندازه‌گیری تولیدکننده و آزمایشگاه ممکن است مقادیر اعلام شده توسط تولیدکننده در آزمایشگاه قابل‌دستیابی نباشد و این مورد میتواند بر اساس مقدار صحت و

دقت اندازه‌گیری باشد و به دلیل عدم دقت و عدم صحت کیت و دستگاه ممکن است مقادیر دقیقا همان مقادیری نباشد که تولیدکننده ادعا کرده است

بررسی میانگین یا تارگت ادعایی تولیدکننده

در این ارزیابی اگر میانگین به‌دست‌آمده در محدوده مقدار اعلام شده در بروشور نباشد کنترل مردود می‌شود و باید از یک کنترل دیگر استفاده شود؛ ولی اگر مقدار میانگین به‌دست‌آمده در محدوده کنترل باشد می‌توان از کنترل استفاده کرد.

مثال :

آزمایشگاهی یک نمونه کنترل High کلسیم را 16 بار اندازه‌گیری کرده است و میانگین 14 میلی‌گرم در دسی‌لیتر و SD برابر 3 میلی‌گرم در دسی‌لیتر بدست آورده است. اگر در بروشور کنترل Target Value برابر 16 میلی‌گرم در دسی‌لیتر ادعا شده باشد. ادعای شرکت تولید کننده را ارزیابی نمائید.

مقادیر اندازه‌گیری شده کنترل کلسیم

نتیجه آزمایشگاه	
۱۴	میانگین
۳	SD
۱۶	n
۱۶	ادعای تولید کننده

باتوجه‌به اینکه یک گروه داده وجود دارد و گروه داده‌ها با میانگین جامعه (ادعای سازنده) مقایسه می‌شود، از فرمول مقایسه میانگین‌ها یا T one tail استفاده می‌شود.

$$t = \frac{\text{Bias}}{\text{SD}/\sqrt{n}}$$

باتوجه‌به داده‌های فوق و استفاده از فرمول t مقادیر محاسبه شده به‌قرار زیر است.

$$t = \frac{|14 - 16|}{3 / \sqrt{16}} = 2.67$$

مقدار بحرانی در جدول با 95٪ اطمینان برای درجه آزادی 15 برابر 2.13 است. چون مقدار t به دست آمده از t بحرانی بزرگتر است، بنابراین ادعای سازنده در آزمایشگاه تأیید نمی‌شود. بدین صورت میانگین نمونه کنترل خریداری شده تأیید نمی‌شود و آزمایشگاه باید میانگین کنترل را در آزمایشگاه بر اساس سنجش‌های متوالی (حداقل 20 روز) تعیین نماید

t Table

cum. prob	$t_{.50}$	$t_{.75}$	$t_{.80}$	$t_{.85}$	$t_{.90}$	$t_{.95}$	$t_{.975}$	$t_{.99}$	$t_{.995}$	$t_{.999}$	$t_{.9995}$
one-tail	0.50	0.25	0.20	0.15	0.10	0.05	0.025	0.01	0.005	0.001	0.0005
two-tails	1.00	0.50	0.40	0.30	0.20	0.10	0.05	0.02	0.01	0.002	0.001
df											
1	0.000	1.000	1.376	1.963	3.078	6.314	12.71	31.82	63.66	318.31	636.62
2	0.000	0.816	1.061	1.386	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	22.327	31.599
3	0.000	0.765	0.978	1.250	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	10.215	12.924
4	0.000	0.741	0.941	1.190	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	7.173	8.610
5	0.000	0.727	0.920	1.156	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	5.893	6.869
6	0.000	0.718	0.906	1.134	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	5.208	5.959
7	0.000	0.711	0.896	1.119	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.785	5.408
8	0.000	0.706	0.889	1.108	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	4.501	5.041
9	0.000	0.703	0.883	1.100	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	4.297	4.781
10	0.000	0.700	0.879	1.093	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	4.144	4.587
11	0.000	0.697	0.876	1.088	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	4.025	4.437
12	0.000	0.695	0.873	1.083	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	3.930	4.318
13	0.000	0.694	0.870	1.079	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	3.852	4.221
14	0.000	0.692	0.868	1.076	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	3.787	4.140
15	0.000	0.691	0.866	1.074	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	3.733	4.073
16	0.000	0.690	0.865	1.071	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	3.686	4.015
17	0.000	0.689	0.863	1.069	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.646	3.965
18	0.000	0.688	0.862	1.067	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.610	3.922
19	0.000	0.688	0.861	1.066	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.579	3.883
20	0.000	0.687	0.860	1.064	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.552	3.850
21	0.000	0.686	0.859	1.063	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.527	3.819
22	0.000	0.686	0.858	1.061	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.505	3.792
23	0.000	0.685	0.858	1.060	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.485	3.768
24	0.000	0.685	0.857	1.059	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.467	3.745
25	0.000	0.684	0.856	1.058	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.450	3.725
26	0.000	0.684	0.856	1.058	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.435	3.707
27	0.000	0.684	0.855	1.057	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.421	3.690

تأیید محدوده ادعایی تولیدکننده

محدوده اعلام شده نمونه کنترل معمولاً 6SD در نظر گرفته می‌شود. مگر اینکه در بروشور اعلام شود که 4SD در نظر گرفته شده است و یا بر اساس مقدار SD اعلام شده در بروشور کنترل محدوده 4SD محاسبه شده باشد. محدوده کنترل را 6SD در نظر بگیرید با معلوم بودن مقدار میانگین کنترل مقدار CV% را محاسبه کنید. باید CV% محاسبه شده کمتر از CV% مجاز باشد. اگر CV% محاسبه شده برای کنترل جدید از CV% مجاز بیشتر باشد باید محدوده کنترل اصلاح شود و محدوده جدید بر اساس سنجش‌های آزمایشگاه تعیین شود.

مثال :

محدوده تست TSH در بروشور کنترل 2.5 تا 5.5 است و مقدار میانگین کنترل برای این تست برابر 4 می‌باشد، و مقدار %CV مجاز برابر 9 است محدوده کنترل را ارزیابی نمایید.

$$SD = \frac{5.5 - 2.5}{6} = 0.5$$

$$\%CV = \frac{0.5 * 100}{4} = 12.5\%$$

در این حالت مقدار SD برابر 0.5 خواهد شد، و مقدار %CV برابر 12.5 است و چون مقدار %CV محاسبه شده بیشتر از %CV مجاز (9٪) است محدوده کنترل قابل قبول نیست و باید محدوده جدید تعریف شود. که در این صورت باید بر اساس مقدار %CV مجاز اعلام شده محدوده جدید برای کنترل محاسبه شود، و بر اساس محدوده جدید از کنترل استفاده شود.

$$\%CV = \frac{SD * 100}{Mean} \quad SD = \frac{CV * Mean}{100}$$

$$SD = \frac{9 * 4}{100} = 0.36$$

محدوده جدید کنترل

$$\text{Control Range} = \text{Mean} \pm 3 * SD$$

$$4 \pm (3 * 0.36) = 2.9 - 5.1$$

ارزیابی کیت

انواع CV

CV درون دوری Intraassay

نوسان درون دوری Intra assay Variation / Within run تفاوت میزان یک آنالیت در اندازه‌گیری‌های مختلف در یک روز (ران)

CV بین دوری Interassay

نوسان بین دوری Inter assay Variation / Between run تفاوت در اندازه‌گیری‌های یک آنالیت در روزهای (ران‌های) مختلف

CV درون فردی

CV_w CV within subject, CV_i CV Intraindividual
شکلی از نوسانات است که به دلیل تفاوت مقدار آنالیت در ساعات مختلف شبانه‌روز در یک فرد وجود دارد که به آن تغییرات درون فردی CV Intraindividual یا CV_w می‌گویند.

CV بین فردی

CV Between subject CV_B, Interindividual CV Group CV_g

شکل دیگری از نوسانات وجود دارد که به دلیل تفاوت مقدار آنالیت در نمونه‌های افراد مختلف ایجاد می‌شود که به آن تغییرات بین فردی CV Between subject یا CV group CV_g می‌گویند.

Cumulative CV تجمعی

نوع از SD انباشتی با نام SD تجمعی است که آزمایشگاه می‌تواند برای ماه‌های متوالی مختلف یک CV واحد محاسبه کند

Pooled CV تجمیعی

نوع دیگری از SD انباشتی وجود دارد و با نام SD تجمیعی که حتی آزمایشگاه می‌تواند برای سطوح مختلف کنترل خود و نیز دستگاه‌های مختلفی که در یک مرکز که از یک کیت و کنترل استفاده می‌کنند یک SD واحد محاسبه کند.

روش‌های تعیین Bias در آزمایشگاه

استفاده از سرم کنترل صحت Accuracy Control

استفاده از نتایج ارزیابی خارجی EQA Program

شرکت در برنامه Peer group

آزمون Recovery

خطاهای مجاز در آزمایشگاه

مرجع CLIA

مرجع Biological Variation

مرجع RCPA

مرجع RiliBaek

مرجع CAP و...

روش علمی استفاده از خطاهای مجاز در آزمایشگاه

تأیید دقت

دقت Precision: نزدیک بودن نتایج حاصله از اندازه‌گیری مکرر یک نمونه تحت شرایط مشخص که از طریق اجرای برنامه کنترل کیفیت داخلی که با استفاده از نمونه کنترل دقت محقق می‌شود. دقت دلالت بر تکرارپذیری دارد.

تکرارپذیری

تکرارپذیری Repeatability نزدیکی و قرابت نتایج حاصل از تکرار یک آزمایش خاص بر روی یک نمونه مشخص تحت شرایط ثابت اندازه‌گیری با تجهیزات ثابت و مشخص را تکرارپذیری می‌گویند و شرایطی است که در آن نتایج آزمون با یک روش مستقل روی نمونه‌های یکسان در یک آزمایشگاه توسط یک کاربر و با استفاده از تجهیزات یکسان در فواصل زمانی کوتاه به دست می‌آید.

نوسان درون دوری

اصطلاح **Intra-assay Variation** یا **Within-run** تفاوت میزان یک آنالیت در اندازه‌گیری‌های مختلف در یک سری کاری (ران کاری). یعنی اگر اندازه‌گیری نمونه‌ها در یک روز کاری برای یک نمونه کنترل باشد و بعد از جمع‌آوری داده‌ها **CV**% محاسبه شود در این صورت نوسان فقط درون دوری **Within-run** بوده و تغییرات داده‌ها در سنجش‌های مختلف در یک روز مورد ارزیابی قرار گرفته است.

تجدیدپذیری

شرایطی است که در آن نتایج آزمون با یک روش روی نمونه‌های یکسان در آزمایشگاه‌های مختلف توسط کاربران مختلف و با استفاده از تجهیزات مختلف به دست می‌آید. نمونه بارز آن ارزیابی خارجی کیفیت و محاسبه مقدار **CV**% ماهیانه یا **CV**% بلندمدت است.

تفاوت در اندازه‌گیری‌های یک آنالیت در روزهای (ران‌های) مختلف. یعنی اگر اندازه‌گیری نمونه کنترل در چند ران یا روز کاری (هر روز یکبار) انجام شود و داده‌ها در چند روز و هر روز یکبار با سنجش نمونه‌ها جمع‌آوری می‌شوند و بعد از جمع‌آوری داده‌ها **CV**% محاسبه می‌شود. در این صورت نوسان فقط بین دوری است، و تغییرات داده‌ها در روزهای مختلف مورد ارزیابی قرار گرفته است و حداکثر می‌تواند برابر یک‌سوم خطای کل مجاز باشد.

اگر جمع‌آوری داده‌ها در چند روز و روزانه چند بار نمونه مورد سنجش قرار گیرد عدم دقت در دو محور درون دوری و بین دوری ایجاد می‌شود که محاسبه آن با روش معمولی متفاوت است. یعنی در اندازه‌گیری در چند روز کاری

به صورت درون دوری و بین دوری **Between-run** و **within-run** و در نهایت تعداد 20 سنجش در چند روز (مثلاً 5 روز و هر روز 4 سنجش) تولید می‌شود این روش محاسبه مستقلاً دارد و با محاسبات درون دوری تنها و بین دوری تنها متفاوت است.

تأیید عدم دقت

عدم دقت بر اساس اولویت در سه وضعیت درون دور، بین دور و کلی ارزیابی می‌شود و بسته به اینکه شرکت تولیدکننده کیت بر چه مبنایی ادعا کرده است، می‌توان همان وضعیت را بررسی و در مورد تأیید و رد کیت ادعا نمود. ولی ممکن است میزان عدم دقت به صورت کل ادعا شده باشد

مثال :

یک نمونه کنترل برای آزمایش گلوکز در سطح نرمال در یک روز تعداد 30 بار آنالیز شده است. با توجه به مقدار CV% مجاز برای گلوکز بر اساس مرجع **Biological variation** برابر 2.8% است. عدم دقت روش را بررسی نمائید

میانگین	۹۹.۸
SD	۱.۴
%CV	۱.۳۹۴

چون CV آزمایشگاه (1.394) کمتر از CV مجاز (2.8) است لذا عدم دقت تکرار پذیری کیت تأیید می‌شود.

استفاده از آزمون Chi2

برای مقایسه عدم دقت بر حسب SD مصرف‌کننده و تولیدکننده می‌توان از آزمون آماری Chi2 به صورت زیر استفاده کرد.

$$Chi^2 = \frac{SD_{lab}^2 * (n_{lab} - 1)}{SD_{clam}^2}$$

با استفاده از روش قبل محاسبه مقدار SD برای آزمایشگاه و مقایسه آن با SD ادعایی تولیدکننده اگر مقدار SD آزمایشگاه بیشتر از مقدار SD ادعایی باشد، دقت کیت تأیید نمی‌شود در این صورت می‌توان از آزمون Chi-2 استفاده کرد و اگر مقدار Chi-2 محاسبه شده کمتر از مقدار Chi-2 بحرانی بر اساس درجه آزادی باشد دقت کیت تأیید می‌شود.

ارزیابی صحت

بهترین و ساده‌ترین آزمون ارزیابی صحت استفاده از آزمون t است.

$$t_n = \frac{\bar{d}}{sd} \sqrt{n}$$

استفاده از آزمون Ttest و مقایسه روش‌ها

برای بررسی صحت می‌توان با استفاده از آزمون‌های مقایسه‌ای یا شرکت در برنامه‌های ارزیابی خارجی کیفیت و بر اساس نتایج به‌دست‌آمده به صحت عملکرد پی برد و در کنترل کیفیت داخلی با استفاده از آزمون T اقدام به بررسی صحت دستگاه نمود.

تأیید صحت با استفاده نمونه بیماران

در روش CLSI با افزودن و کاستن مقدار (SEM*tcrit) به نامیزانی ادعایی سازنده (Biasclaime) مقدار محدوده تأیید یا Verification Interval محاسبه می‌شود و مقدار Bias آزمایشگاه با مقدار محدوده تأیید مقایسه می‌شود و اگر مقدار Bias آزمایشگاه در محدوده تأیید قرار گیرد نامیزانی ادعایی تأیید می‌شود. اساس این روش، استفاده از محدوده تأیید ۹۰ درصد است. برای این کار آزمایشگاه باید روی هم ۲۰ نمونه را در یک دوره زمانی ۳ تا ۴ روزه (روزانه ۵ تا ۷ نمونه بیمار) با روش مورد بررسی و نیز روش مرجع آزمایش کند. سپس میانگین اختلاف‌ها را که برابر عدم صحت محاسبه شده در آزمایشگاه است و انحراف معیار اختلافها SDdiff را تعیین کند. با داشتن Sddiff می‌توان از رابطه زیر محدوده تأیید ۹۰ درصد را حساب کرد

$$\text{Verification Interval}_{90\%} = \text{Bias}_{\text{claime}} \pm (T_{\text{crit}} * \text{SEM})$$

$$\text{Verification Interval}_{90\%} = \text{Bias}_{\text{claime}} \pm (T_{\text{crit}} * \text{SD} / \sqrt{n})$$

مثال :

سازنده کیت کلسیم ادعا کرده است که کیت تولید شده دارای Bias = 0 بوده و نامیزانی ندارد و آزمایشگاه با استفاده از کیت موردنظر آنالیت را ۲۵ بار سنجش کرده و مقدار SD برابر ۰.۸ و مقدار Bias را برابر ۰.۹ به‌دست آورده است

نتیجه آزمایشگاه	
۰.۹ mg/dl	Bias mg/dl
۰.۸ mg/dl	SD mg/dl
۲۵	n
۰	ادعای تولید کننده

$$\text{Verification Interval}_{\%90} = \text{Bias}_{\text{Claime}} \pm (T_{\text{crit}\%90} * \text{SD} / \sqrt{n})$$

$$T_{\text{crit}\%90} (df=24) = 2.064$$

$$\text{Verification Interval}_{\%90} = 0 + (2.064 * 0.16) = 0.33$$

$$\text{Verification Interval}_{\%90} = 0 - (2.064 * 0.16) = -0.33$$

در این ارزیابی چون مقدار Bias آزمایشگاه (0.9) در محدوده تأیید بین -0.33 و +0.33 قرار ندارد بنابراین ادعای تولید کننده تأیید نمی شود

کنترل‌ها و کیت‌ها قبل از استفاده باید از جنبه‌های مختلف ارزیابی و به اصطلاح اعتبارسنجی و صحت‌گذاری شوند اقدامات عملی برای ارزیابی کیت‌ها به ترتیب اولویت عبارتند از:

1. ارزیابی دقت Precision Verification که شامل دو نوع ارزیابی است: یکی تکرارپذیری Repeatability یا عدم دقت درون دوری و کوتاه‌مدت و دیگری تکثیرپذیری یا تجدیدپذیری Reproducibility یا عدم دقت بین دوری یا بلندمدت است.

2. Accuracy Verification ارزیابی و تأیید صحت

3. Reference Interval Verification ارزیابی و تأیید محدوده مرجع

4. Linearity / Reportable Range ارزیابی خطی بودن یا محدوده گزارش‌دهی

5. Sensitivity & Specificity ارزیابی حساسیت و ویژگی

6. Detection limits ارزیابی محدوده‌های پائین سنجش

7. Functional Sensitivity / Analytical حساسیت عملکردی یا حساسیت آنالیتیکی

Sensitivity

8. پایداری و استواری در مقابل عوامل بیرونی (Robustness)

9. ارزیابی عدم قطعیت

10. و ...

ارزیابی کنترل

کنترل دقت نیز مانند کیت‌ها باید بر اساس معیارهای مورد استفاده ارزیابی شوند و باتوجه به میزان عدم دقت و عدم صحت روش‌های اندازه‌گیری در آزمایشگاه مقدار میانگین و محدوده ادعایی تولیدکننده نیز باید بر اساس تغییرات آزمایشگاه تعیین شوند. این ارزیابی از این جهت لازم است که به دلیل اختلاف شرایط اندازه‌گیری تولیدکننده و آزمایشگاه ممکن است مقادیر اعلام شده توسط تولیدکننده در آزمایشگاه قابل‌دستیابی نباشد.

بررسی میانگین یا تارگت ادعایی تولیدکننده

در این ارزیابی اگر میانگین به‌دست‌آمده در محدوده مقدار اعلام شده در بروشور نباشد کنترل مردود می‌شود و باید از یک کنترل دیگر استفاده شود؛ ولی اگر مقدار میانگین به‌دست‌آمده در محدوده کنترل باشد می‌توان از کنترل استفاده کرد.

مثال 3:

آزمایشگاهی یک نمونه کنترل High کلسیم را 16 بار اندازه‌گیری کرده است و میانگین 14 میلی‌گرم در دسی‌لیتر و SD برابر 3 میلی‌گرم در دسی‌لیتر بدست آورده است. اگر در بروشور کنترل Target Value برابر 16 میلی‌گرم در دسی‌لیتر و محدوده از 13 تا 19 ادعا شده باشد. ادعای شرکت تولید کننده را ارزیابی نمائید.

جدول شماره ۳-۱: مقادیر اندازه‌گیری شده کنترل کلسیم

نتیجه آزمایشگاه	
۱۴	میانگین
۳	SD
۱۶	n
۱۶	ادعای تولید کننده

باتوجه به اینکه یک گروه داده وجود دارد و گروه داده‌ها با میانگین جامعه (ادعای سازنده) مقایسه می‌شود، از فرمول مقایسه میانگین‌ها یا T one tail استفاده می‌شود.

$$t = \frac{\text{Bias}}{\text{SD}/\sqrt{n}}$$

$$t = \frac{|14 - 16|}{3 / \sqrt{16}} = 2.67$$

مقدار t بحرانی در جدول با 95٪ اطمینان برای درجه آزادی 15 برابر 2.14 است. چون مقدار t به دست آمده از t بحرانی بزرگ‌تر است، بنابراین ادعای سازنده در آزمایشگاه تأیید نمی‌شود و آزمایشگاه باید میانگین کنترل را در آزمایشگاه بر اساس سنجش‌های متوالی (حداقل 20 روز) تعیین نماید.

تأیید محدوده ادعایی تولیدکننده

محدوده اعلام شده نمونه کنترل معمولاً 6SD در نظر گرفته می‌شود. مگر اینکه در بروشور اعلام شود که 4SD در نظر گرفته شده است و یا بر اساس مقدار SD اعلام شده در بروشور کنترل محدوده 4SD محاسبه شده باشد. برای این ارزیابی محدوده کنترل را 4SD (6SD) در نظر بگیرید با معلوم بودن مقدار میانگین کنترل مقدار CV را محاسبه کنید. باید CV محاسبه شده کمتر از CV مجاز باشد. اگر CV محاسبه شده برای کنترل جدید از CV مجاز بیشتر باشد باید محدوده کنترل اصلاح شود و محدوده جدید بر اساس سنجش‌های آزمایشگاه تعیین شود.

مثال 4:

محدوده تست TSH در بروشور کنترل 3.1 تا 4.9 است و مقدار میانگین (تارگت) کنترل برای این تست برابر 4 اعلام شده است و مقدار CV مجاز برابر 9 درصد است. محدوده کنترل را ارزیابی نمایید.

$$SD = \frac{4.9 - 3.1}{6} = 0.3$$

$$\%CV = \frac{0.3 * 100}{4} = 7.5\%$$

در این ارزیابی مقدار SD برابر 0.3 است و مقدار CV محاسبه شده با توجه به مقدار SD محاسبه شده برابر 7.5 درصد است و چون مقدار CV محاسبه شده برای کنترل بر اساس پارامترهای اعلام شده از طرف شرکت تولیدکننده در بروشور، کوچکتر از CV مجاز است، بنابراین محدوده کنترل تأیید می‌شود

مثال 5 :

محدوده تست TSH در بروشور کنترل 2.5 تا 5.5 است و مقدار میانگین کنترل برای این تست برابر 4 می‌باشد، و مقدار %CV مجاز برابر 9 است محدوده کنترل را ارزیابی نمائید.
در این حالت مقدار SD برابر 0.5 خواهد شد، و مقدار %CV برابر 12.5 است و چون مقدار %CV محاسبه شده بیشتر از %CV مجاز (9٪) است محدوده کنترل قابل قبول نیست و باید محدوده جدید تعریف شود. که در این صورت باید بر اساس مقدار %CV مجاز اعلام شده محدوده جدید برای کنترل محاسبه شود، و بر اساس محدوده جدید از کنترل استفاده شود.

$$\%CV = \frac{SD * 100}{Mean} \quad SD = \frac{CV * Mean}{100}$$

$$SD = \frac{9 * 4}{100} = 0.36$$

محدوده جدید کنترل

$$\text{Control Range} = \text{Mean} \pm 3 * SD$$

$$4 \pm (3 * 0.36) = 2.9 - 5.1$$

موسسه آموزشی تریتا آکادمی

ارزیابی کیت

تأیید دقت

اولین قدم در تأیید عدم دقت روش تعیین مقدار عدم دقت درون دوری Intra assay است. برای تعیین عدم دقت درون دوری یک نمونه کنترل و یا نمونه بیمار در یک روز کاری تعداد 20 تا 30 بار آنالیز شده و با استفاده از فرمول‌های تعیین مقدار SDw و میانگین، مقدار %CV محاسبه می‌شود و مقدار %CVw محاسبه شده با %CV مجاز مقایسه می‌شود. اگر مقدار محاسبه شده کمتر از مقدار مجاز باشد عدم دقت روش تأیید می‌شود. مقدار %CV مجاز برای تغییرات درون دور حداکثر برابر یک چهارم خطای کل مجاز در نظر گرفته می‌شود.

جدول شماره ۳-۳: نمونه ای از گزارش ادعای سازنده برای عدم دقت کیت

Intra-assay Precision n=20	Mean (g/dl)	SD (g/dl)	CV (%)
Sample 1	92.5	1.10	1.19
Sample 2	121	1.02	0.84
Sample 3	292	2.01	0.69

Inter-assay Precision n=20	Mean (g/dl)	SD (g/dl)	CV (%)
Sample 1	64.2	1.12	1.74
Sample 2	122	1.57	1.28
Sample 3	296	4.41	1.49

مثال 6 :

یک نمونه کنترل برای آزمایش گلوکز در سطح نرمال در یک روز تعداد 30 بار آنالیز شده است. با توجه با مقدار %CV مجاز برای گلوکز بر اساس مرجع Biological variation برابر 2.8٪ است. عدم دقت روش را بررسی نمائید.

جدول شماره ۳-۴: نمایش سنجش درون دوری در یک اندازه گیری روزانه

L	J	I	H	
مقدار	روز	مقدار	روز	
۹۹	۱۶	۱۰۲	۱	116
۹۸	۱۷	۱۰۰	۲	117
۹۸	۱۸	۹۹	۳	118
۱۰۱	۱۹	۱۰۱	۴	119
۱۰۰	۲۰	۹۹	۵	120
۱۰۱	۲۱	۱۰۲	۶	121
۱۰۲	۲۲	۹۸	۷	122
۹۹	۲۳	۱۰۰	۸	123
۱۰۱	۲۴	۱۰۱	۹	124
۱۰۰	۲۵	۱۰۰	۱۰	125
۱۰۰	۲۶	۹۹	۱۱	126
۱۰۱	۲۷	۹۸	۱۲	127
۱۰۲	۲۸	۱۰۱	۱۳	128
۹۹	۲۹	۹۸	۱۴	129
۹۸	۳۰	۹۸	۱۵	130
				131
				132
				133
				134

شرط تأیید عدم دقت درون دوری یا کوتاه‌مدت ادعایی تولیدکننده:

$$\%CV_{within-run} \leq \%CV \text{ Accepted}$$

$$\%CV_{within-run} \leq \frac{1}{4} TEa$$

دومین قدم در تأیید عدم دقت روش، تعیین مقدار عدم دقت بین دوری **Inter assay** است. برای تعیین عدم دقت بین دوری یک نمونه کنترل (به دلیل عدم پایداری نمونه برای مدت طولانی، از نمونه استفاده نمی‌شود) در 20 تا 30 روز کاری و هر روز یک بار آنالیز شده و با استفاده از فرمول‌های تعیین مقدار **SDb** و میانگین، مقدار **CVb** محاسبه می‌شود و مقدار **CVb** محاسبه شده با **CV** مجاز مقایسه می‌شود. اگر مقدار محاسبه شده کمتر از مقدار مجاز باشد عدم دقت روش تأیید می‌شود. مقدار **CV** مجاز برای تغییرات بین دور حداکثر برابر یک سوم خطای کل مجاز در نظر گرفته می‌شود.

یک نمونه کنترل برای آزمایش گلوکز در سطح نرمال در یک ماه و هر روز یک بار آنالیز شده است. با توجه به مقدار **CV** مجاز برای گلوکز بر اساس مرجع **Biological variation** برابر 2.8٪ عدم دقت روش را بررسی نمائید.



جدول شماره ۳-۵: نمایش سنجش بین دوری در ۳۰ روز اندازه گیری

K	J	I	H	
مقدار	روز	مقدار	روز	94
۹۵	۱۶	۱۰۱	۱	95
۹۵	۱۷	۱۰۱	۲	96
۹۵	۱۸	۱۰۰	۳	97
۹۴	۱۹	۱۰۰	۴	98
۹۴	۲۰	۹۹	۵	99
۹۳	۲۱	۱۰۰	۶	100
۹۴	۲۲	۹۸	۷	101
۹۳	۲۳	۹۸	۸	102
۹۲	۲۴	۹۸	۹	103
۹۲	۲۵	۹۷	۱۰	104
۹۲	۲۶	۹۷	۱۱	105
۹۱	۲۷	۹۷	۱۲	106
۹۱	۲۸	۹۶	۱۳	107
۹۱	۲۹	۹۶	۱۴	108
۹۱	۳۰	۹۶	۱۵	109
		۹۵.۶	میانگین	110
		۳.۲	SD	111
		۳.۳۵۱	%CV	112

شرط تأیید عدم دقت بین دوری یا بلندمدت ادعایی تولیدکننده:

$$\%CV_{\text{between-run}} \leq \%CV_{\text{accepted}}$$

$$\% CV_{\text{between-run}} \leq 1/3 TEa$$

معمولاً شرکت تولیدکننده در سه سطح Low، Normal، High میزان SD و %CV را ارائه می کند. اگر SD آزمایشگاه کمتر از SD ادعایی تولیدکننده باشد، عدم دقت کیت مورد قبول است، و اگر بالاتر باشد طبق فرمول زیر و با جدول مربع کای (chi-square test) چک می شود.

استفاده از آزمون Chi2

برای مقایسه عدم دقت بر حسب SD مصرف‌کننده و تولیدکننده می‌توان از آزمون آماری Chi2 به‌صورت زیر استفاده کرد

$$Chi^2 = \frac{SD_{lab}^2 * (n_{lab} - 1)}{SD_{clam}^2}$$

اگر مقدار Chi-2 محاسبه شده کمتر از مقدار Chi-2 بحرانی بر اساس درجه آزادی باشد دقت کیت تأیید می‌شود.

مثال 7:

یک شرکت تولیدکننده کیت گلوکز ادعا می‌کند که $SD=3.4$ میلی‌گرم در دسی‌لیتر است. آزمایشگاه با 20 بار سنجش مقدار $SD=4$ بدست آورده است. آیا دقت کیت موردنظر تأیید می‌شود؟
باتوجه به مقدار SD محاسبه شده و SD ادعا شده توسط تولیدکننده با روش اول یعنی مقایسه مقدار SD محاسبه شده با SD ادعا شده تأیید نمی‌شود، چون مقدار SD محاسبه شده بزرگ‌تر از مقدار ادعا شده است؛ بنابراین با فرمول Chi2 مجدداً ارزیابی می‌شود.

$$Chi^2 = \frac{SD_{lab}^2 * (n - 1)}{SD_{claim}^2}$$

$$Chi^2 = \frac{4^2 * (20 - 1)}{3.4^2} = \frac{16 * 19}{11.56} = 29.68$$

جدول شماره ۳-۱۱: جدول χ^2 برای درجه آزادی ۱۹ و ضریب اطمینان ۹۵ درصد

v	Probability less than the critical value				
	0.90	0.95	0.975	0.99	0.999
1	2.706	3.841	5.024	6.635	10.828
2	4.605	5.991	7.378	9.210	13.816
3	6.251	7.815	9.348	11.345	16.266
4	7.779	9.488	11.143	13.277	18.467
5	9.236	11.070	12.833	15.086	20.515
6	10.645	12.592	14.449	16.812	22.458
7	12.017	14.067	16.013	18.475	24.322
8	13.362	15.507	17.535	20.090	26.125
9	14.684	16.919	19.023	21.666	27.877
10	15.987	18.307	20.483	23.209	29.588
11	17.275	19.675	21.920	24.725	31.264
12	18.549	21.026	23.337	26.217	32.910
13	19.812	22.362	24.736	27.688	34.528
14	21.064	23.685	26.119	29.141	36.123
15	22.307	24.996	27.488	30.578	37.697
16	23.542	26.296	28.845	32.000	39.252
17	24.769	27.587	30.191	33.409	40.790
18	25.989	28.869	31.526	34.805	42.312
19	27.204	30.144	32.852	36.191	43.820
20	28.412	31.410	34.170	37.566	45.315
21	29.615	32.671	35.479	38.932	46.797
22	30.813	33.924	36.781	40.289	48.276

باتوجه به مقدار χ^2 بحرانی در جدول شماره ۳-۱۱ برای درجه آزادی ۱۹ برابر 30.144 با محدوده اطمینان ۹۵٪ است و چون مقدار محاسبه شده در آزمایشگاه کوچک تر از مقدار بحرانی در جدول است. بنابراین دقت کیت تائید می‌شود.

آزمون F یا Fratio

زمانی که دقت یک روش تحت کنترل باشد برای تأیید دقت روش جدید دیگر نیازی به تأیید مجدد دقت کیت نیست و می‌توان از آزمون‌های مقایسه‌ای دقت استفاده کرد. ساده‌ترین آزمون مقایسه دقت، آزمون فیشر یا F test است. در این آزمون برای مقایسه دقت دو روش آزمایشگاهی اغلب تغییرات دو روش (Variance) را با هم مقایسه می‌کنند. اگر اختلاف آنها از نظر آماری مهم باشد آن را نپذیرفته و رد می‌کنند. از آنجا که واریانس مجذور انحراف معیار است بررسی این نوع تغییرات میزان دقت و یا خطای اتفاقی یا تصادفی روش را نشان می‌دهد. برای انجام این آزمون ابتدا یک نمونه با هر دو روش به دفعات مورد آزمایش قرار می‌گیرد. سپس انحراف معیار دو گروه محاسبه و در فرمول F قرار می‌گیرد، صرف‌نظر از نوع روش آزمایشگاهی، انحراف معیار بزرگ‌تر در صورت کسر و انحراف معیار کوچک‌تر در مخرج کسر قرار داده می‌شود؛ بنابراین حداقل میزان F برابر یک است و از نظر تجربی هرچه مقدار F به‌دست آمده به یک نزدیک‌تر باشد بیانگر آن است که خطای تصادفی دو آزمایش قابل‌اغماض است و اگر مقدار F بیشتر باشد واریانس یکی از روش‌ها بیشتر بوده (روشی که واریانس آن در صورت قرار گرفته است) و نشان‌دهنده تغییرات بیشتر و بالا بودن خطای اتفاقی روش است. برای تفسیر نتیجه می‌بایست عدد حاصل از محاسبه F را با توجه به تعداد تکرار آزمایش، با جدول مقادیر بحرانی F مقایسه نمود.

جدول شماره ۳-۱۲: نمایش محاسبه F با استفاده از واریانس روش آزمون و واریانس روش مرجع

روش مورد آزمایش	روش رفرانس	
۲.۳	۱.۸	SD
۲۵	۲۰	n (تعداد)
۲۴	۱۹	درجه آزادی یا df (n-۱)
۵.۲۹	۳.۲۴	Variance
۱.۶۳		F

چون واریانس بزرگ‌تر (۵/۲۹) تعدا ۲۵ بار مورد سنجش قرار گرفته است، لذا درجه آزادی صورت برابر ۲۴ و درجه آزادی مخرج برابر ۱۹ است.

جدول شماره ۳-۱۳: نمایش مقدار F بحرانی برای درجه آزادی صورت بریر ۲۴ و درجه آزادی مخرج برابر ۱۹

جدول F با احتمال ۹۵%																			
df مخرج	df صورت	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	40	60	120	∞
1	161.448	199.500	215.707	224.583	230.162	233.986	236.768	238.883	240.543	241.882	243.906	245.950	248.013	249.052	250.095	251.143	252.196	253.253	254.314
2	18.513	19.000	19.164	19.247	19.296	19.330	19.353	19.371	19.385	19.396	19.413	19.429	19.446	19.454	19.462	19.471	19.479	19.487	19.4957
3	10.128	9.552	9.277	9.117	9.014	8.941	8.887	8.845	8.812	8.786	8.745	8.703	8.660	8.639	8.617	8.594	8.572	8.549	8.5264
4	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256	6.163	6.094	6.041	5.999	5.964	5.912	5.858	5.803	5.774	5.746	5.717	5.688	5.658	5.6281
5	6.608	5.786	5.410	5.192	5.050	4.950	4.876	4.818	4.773	4.735	4.678	4.619	4.558	4.527	4.496	4.464	4.431	4.399	4.365
6	5.987	5.143	4.757	4.534	4.387	4.284	4.207	4.147	4.099	4.060	4.000	3.938	3.874	3.842	3.808	3.774	3.740	3.705	3.6689
7	5.591	4.737	4.347	4.120	3.972	3.866	3.787	3.726	3.677	3.637	3.575	3.511	3.445	3.411	3.376	3.340	3.304	3.267	3.2298
8	5.318	4.459	4.066	3.838	3.688	3.581	3.501	3.438	3.388	3.347	3.284	3.218	3.150	3.115	3.079	3.043	3.005	2.967	2.9276
9	5.117	4.257	3.863	3.633	3.482	3.374	3.293	3.230	3.179	3.137	3.073	3.006	2.937	2.901	2.864	2.826	2.787	2.748	2.7067
10	4.965	4.103	3.708	3.478	3.326	3.217	3.136	3.072	3.020	2.978	2.913	2.845	2.774	2.737	2.700	2.661	2.621	2.580	2.5379
11	4.844	3.982	3.587	3.357	3.204	3.095	3.012	2.948	2.896	2.854	2.788	2.719	2.646	2.609	2.571	2.531	2.490	2.448	2.4045
12	4.747	3.885	3.490	3.259	3.106	2.996	2.913	2.849	2.796	2.753	2.687	2.617	2.544	2.506	2.466	2.426	2.384	2.341	2.2962
13	4.667	3.806	3.411	3.179	3.025	2.915	2.832	2.767	2.714	2.671	2.604	2.533	2.459	2.420	2.380	2.339	2.297	2.252	2.2064
14	4.600	3.739	3.344	3.112	2.958	2.848	2.764	2.699	2.646	2.602	2.534	2.463	2.388	2.349	2.308	2.266	2.223	2.178	2.1307
15	4.543	3.682	3.287	3.056	2.901	2.791	2.707	2.641	2.588	2.544	2.475	2.403	2.328	2.288	2.247	2.204	2.160	2.114	2.0658
16	4.494	3.634	3.239	3.007	2.852	2.741	2.657	2.591	2.538	2.494	2.425	2.352	2.276	2.235	2.194	2.151	2.106	2.059	2.0096
17	4.451	3.592	3.197	2.965	2.810	2.699	2.614	2.548	2.494	2.450	2.381	2.308	2.230	2.190	2.148	2.104	2.058	2.011	1.9604
18	4.414	3.555	3.160	2.928	2.773	2.661	2.577	2.510	2.456	2.412	2.342	2.269	2.191	2.150	2.107	2.063	2.017	1.968	1.9168
19	4.381	3.522	3.127	2.895	2.740	2.628	2.544	2.477	2.423	2.378	2.308	2.234	2.156	2.114	2.071	2.026	1.980	1.930	1.878
20	4.351	3.493	3.098	2.866	2.711	2.599	2.514	2.447	2.393	2.348	2.278	2.203	2.124	2.083	2.039	1.994	1.946	1.896	1.8432
21	4.325	3.467	3.073	2.840	2.685	2.573	2.488	2.421	2.366	2.321	2.250	2.176	2.096	2.054	2.010	1.965	1.917	1.866	1.8117

تمرین 6:

مقدار Fratio را محاسبه کنید و با مقدار بحرانی مقایسه و نتیجه را گزارش کنید.

	A	B	C	D	E	F	G
1	دستگاه ۱			دستگاه ۲			
2	ردیف	سنجش		ردیف	سنجش		
3	۱	۱۵.۱		۱	۱۶.۸		
4	۲	۱۵.۹		۲	۱۶.۱		
5	۳	۱۵.۷		۳	۱۶.۹		
6	۴	۱۴.۹		۴	۱۷.۲		
7	۵	۱۴.۸		۵	۱۶.۵		
8	۶	۱۵.۲		۶	۱۶.۴		
9	۷	۱۵.۶		۷	۱۶.۸		
10	۸	۱۶.۱		۸	۱۷.۲		
11	۹	۱۶.۲		۹	۱۷.۳		
12	۱۰	۱۵.۴		۱۰	۱۷.۶		
13	۱۱	۱۵.۸		۱۱	۱۷.۶		
14	۱۲	۱۵		۱۲	۱۵.۴		
15	۱۳	۱۵.۴		۱۳	۱۶.۸		
16	۱۴	۱۵.۷		۱۴	۱۶.۹		
17	۱۵	۱۶.۵		۱۵	۱۶.۶		
18	۱۶	۱۴.۸		۱۶	۱۶.۳		
19	۱۷	۱۴.۸		۱۷	۱۶.۱		
20	۱۸	۱۵.۲		۱۸	۱۶.۴		
21	۱۹	۱۵.۶		۱۹	۱۶.۵		
22	۲۰	۱۵.۴		۲۰	۱۶.۴		
23	۲۱	۱۴.۸		SD	۰.۵۳۹		
24	۲۲	۱۴.۹					
25	۲۳	۱۵.۵					
26	۲۴	۱۵.۶					
27	۲۵	۱۵.۸					
28	SD	۰.۴۷۷					
29							
30							
31	F test						
32	F critical	۲۰.۳۹					

ارزیابی صحت

صحت یک روش آزمایشگاهی از راه‌های مختلفی بررسی می‌گردد که یکی از آنها اندازه‌گیری کمیت موردنظر در ماده مرجع و مقایسه نتیجه حاصله با مقدار موردانتظار است. کنترل‌های تجاری که در انواع مختلف در بازار عرضه می‌شوند عموماً برای ارزیابی صحت نیستند و نباید برای این منظور استفاده شوند. تنها موادی برای این منظور قابل استفاده هستند که توسط روش‌های مرجع تعیین مقدار شده یا توسط روش مورد بررسی و در مقابل ماده مرجع تعیین ارزش شده باشند و در ردیف مواد SRM و CRM باشند.

تأیید Bias=0 و Bias ≠ 0 متفاوت بوده و برای Bias=0 بهتر است از آزمون T و برای Bias ≠ 0 از روش‌های CLIA و CLSI EP-15 استفاده شود. ولی از روش‌های CLIA و CLSI EP-15 می‌توان برای همه موارد استفاده کرد.

تأیید به روش CLSI EP15

این آزمون بر اساس سند CLSI EP15-A2 انجام می‌شود. در این بررسی اگر مقدار Bias آزمایشگاه در محدوده تأیید قرار داشته باشد، ادعای تولیدکننده تأیید می‌شود.

روش پیشنهادی CLSI EP15 برای تأیید درستی شامل دو شکل است:

1. استفاده از نمونه‌های بیماران

2. استفاده از مواد مرجع دارای مقادیر مشخص

تأیید صحت با استفاده نمونه بیماران

در روش CLSI با افزودن و کاستن مقدار (SEM*tcrit) به نامیزانی ادعایی سازنده (Bias_{claim}) مقدار محدوده تأیید یا Verification Interval محاسبه می‌شود و مقدار Bias آزمایشگاه با مقدار محدوده تأیید مقایسه می‌شود و اگر مقدار Bias آزمایشگاه در محدوده تأیید قرار گیرد نامیزانی ادعایی تأیید می‌شود. اساس این روش، استفاده از محدوده تأیید ۹۰ درصد است. برای این کار آزمایشگاه باید روی هم ۲۰ نمونه را در یک دوره زمانی ۳ تا ۴ روزه (روزانه ۵ تا ۷ نمونه بیمار) با روش مورد بررسی و نیز روش مرجع آزمایش کند. سپس میانگین اختلاف‌ها را که برابر عدم صحت محاسبه شده در آزمایشگاه است و انحراف معیار اختلاف‌ها SDdiff را تعیین کند. با داشتن SDdiff می‌توان از رابطه زیر محدوده تأیید ۹۰ درصد را حساب کرد:

$$\text{Verification Interval}_{90\%} = \text{Bias}_{\text{Claim}} \pm (T_{\text{crit}} * \text{SEM})$$

$$\text{Verification Interval}_{90\%} = \text{Bias}_{\text{Claim}} \pm (T_{\text{crit}} * \text{SD} / \sqrt{n})$$

مثال :

سازنده کیت کلسیم ادعا کرده است که کیت تولید شده دارای $Bias = 0$ بوده و نامیزانی ندارد و آزمایشگاه با استفاده از کیت موردنظر آنالیت را 25 بار سنجش کرده و مقدار SD برابر 0.8 و مقدار Bias را برابر 0.9 به‌دست آورده است ادعای سازنده را به روش CLSI EP-15 ارزیابی کنید.

جدول شماره ۳-۲۲: مقادیر ادعا شده توسط تولید کننده برای کیت کلسیم

نتیجه آزمایشگاه	
۰.۹ mg/dl	Bias mg/dl
۰.۸ mg/dl	SD mg/dl
۲۵	n
۰	ادعای تولید کننده

$$\text{Verification Interval}_{\%90} = \text{Bias}_{\text{Claime}} \pm (T_{\text{crit}\%90} * \text{SD} / \sqrt{n})$$

$$T_{\text{crit}\%90} (df=24) = ۲.۰۶۴$$

$$\text{Verification Interval}_{\%90} = ۰ + (۲.۰۶۴ * ۰.۱۶) = ۰.۳۳$$

$$\text{Verification Interval}_{\%90} = ۰ - (۲.۰۶۴ * ۰.۱۶) = -۰.۳۳$$

در این ارزیابی چون مقدار Bias آزمایشگاه (0.9) در محدوده تأیید بین -0.33 و +0.33 قرار ندارد؛ بنابراین ادعای ولید کننده تأیید نمی‌شود .

چنانچه نامیزانی آزمایشگاه درون محدوده تأیید قرار گیرد، با احتمال ۹۰ درصد نامیزانی معنی‌داری وجود ندارد. در این صورت می‌توان نتیجه گرفت که عملکرد آزمایشگاه سازگار با ادعای سازنده است و بنابراین عملکرد آزمایشگاه تأیید می‌شود و می‌تواند برای بررسی کیفیت روش سنجش و نیز تعیین برنامه پایش کیفیت، از نامیزانی ادعایی شرکت استفاده کند.

تأیید Bias به روش CLIA

استفاده از CLIA Method محدوده اطمینان (Confidence Interval) در روش CLIA با افزودن و کاستن مقدار به نامیزانی آزمایشگاه ($Bias_{Lab}$) مقدار محدوده اطمینان یا Confidence Interval محاسبه می‌شود و مقدار Bias ادعایی تولید کننده با مقدار محدوده اطمینان مقایسه می‌شود. و اگر مقدار Bias ادعایی تولید کننده در محدوده اطمینان قرار گیرد نامیزانی ادعایی تأیید می‌شود.

در این بررسی اگر Bias ادعایی شرکت سازنده در محدوده اطمینان آزمایشگاه قرار گیرد ادعای سازنده تأیید می‌شود.

$$Confidence\ Interval_{\%95} = Bias_{Lab} \pm (T_{crit\%95} * SD / \sqrt{n})$$

مثال :

سازنده کیت کلسیم ادعا کرده است که کیت تولید شده دارای $Bias = 0$ بوده و هیچ‌گونه نامیزانی ندارد و آزمایشگاه با استفاده از کیت موردنظر آنالیت را 25 بار قرائت کرده و مقدار SD را برابر 0.8 و مقدار Bias را برابر 0.9 به‌دست آورده است.

جدول شماره ۳-۲۳: مقادیر ادعا شده توسط تولید کننده برای کیت کلسیم

نتیجه آزمایشگاه	
۰.۹ mg/dl	Bias mg/dl
۰.۸ mg/dl	SD mg/dl
۲۵	n
۰	ادعای تولید کننده

$$Confidence\ Interval_{\%95} = Bias_{Lab} \pm (T_{crit\%95} * SD / \sqrt{n})$$

$$T_{crit\%95} (df=24) = 1.711$$

$$Confidence\ Interval_{\%95} = 0.9 - (1.711 * 0.16) = 0.627$$

$$Confidence\ Interval_{\%95} = 0.9 + (1.711 * 0.16) = 1.173$$

در این ارزیابی چون مقدار Bias ادعایی تولیدکننده (0) در محدوده اطمینان بین 0.627 و 1.173 قرار ندارد بنابراین ادعای تولیدکننده تأیید نمی‌شود.

چنانچه نامیزانی ادعایی درون محدوده اطمینان قرار بگیرد، با احتمال ۹۵ درصد نامیزانی معنی‌داری وجود ندارد. در این صورت می‌توان نتیجه گرفت که عملکرد آزمایشگاه سازگار با ادعای سازنده است؛ بنابراین، عملکرد آزمایشگاه تأیید می‌شود و می‌تواند برای بررسی کیفیت روش سنجش و نیز تعیین برنامه پایش کیفیت، از نامیزانی ادعایی شرکت استفاده کند.

ارزیابی محدوده مرجع

بر اساس الزامات استاندارد ISO 15189 و کشوری، هر آزمایشگاهی باید برای مراجعین خود بر اساس دستگاه، کیت و روش مورد استفاده مقدار محدوده مرجع را تعیین نماید و این مقدار ممکن است با مقادیر رایج در آزمایشگاه‌های دیگر متفاوت باشد. بسیاری از آزمایشگاه‌ها این مقدار را از مراجع مختلف و بروشور کیت‌ها استخراج کرده و استفاده می‌کنند و تولیدکنندگان کیت‌ها نیز این مقادیر را از مراجع خارجی استخراج می‌کنند که هر دو اشتباه است.

تعیین محدوده مرجع در آزمایشگاه بسیار ساده است. ولی ابتدا لازم است شرایط پیش‌نیاز و مقدمات این مطالعه فراهم شود.

1- مهمترین شرط این است که تعداد افراد سالم برای این مطالعه بایستی حداقل 120 نفر انتخاب شوند. اگر مقدار محدوده مرجع بر اساس جنس و سن متغیر باشد، لازم است از هر جنس و محدوده سنی این تعداد انتخاب شوند. باتوجه به اینکه بر اساس توصیه مراجع CLSI, IFCC حداقل تعداد نمونه 120 عدد عنوان شده است. ولی در آزمایشگاه‌های معمولی بر اساس توصیه FDA و برخی مراجع معتبر دیگر می‌توانند با حداقل 20 الی 40 نمونه محدوده مرجع را تعیین نمایند.

2- این افراد باید از نظر پزشکی سالم باشند. توجه داشته باشید سالم بودن معادل نداشتن بیماری نیست.

3- نمونه‌ها در بهترین شرایط کار آزمایشگاه از نظر دستگاه و معرف‌ها و... باید تعیین مقدار شوند.

4- عوامل ژنتیکی در این اندازه‌گیریها مؤثر خواهند بود.

تأیید محدوده مرجع

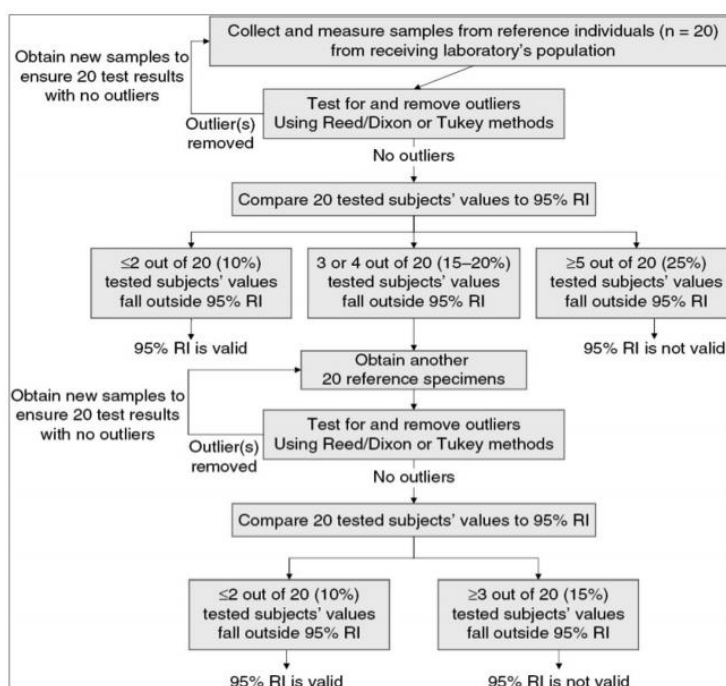
قبل از استفاده از کیت و یا با تغییر سریال هر کیت صحت‌گذاری و تأیید محدوده مرجع باید ارزیابی شود. ساده‌ترین روش ارزیابی و تأیید محدوده مرجع بر اساس سند CLSI EP28-A3c به صورت زیر عمل می‌شود. تعداد 20 فرد سالم انتخاب می‌شود و آنالیت مورد نظر سنجش می‌گردد. بعد از خارج کردن نتایج پرت مقادیر

باقی‌مانده را نگاه کنید. اگر حداکثر تا دو مورد (10 درصد از 20 نمونه) خارج از محدوده پیشنهادی کیت باشد، محدوده مرجع با 95 درصد اطمینان تأیید می‌شود و اگر بیشتر از 5 مورد (25 درصد از 20 نمونه) خارج از محدوده پیشنهادی کیت باشد محدوده مرجع تأیید نمی‌شود.

اگر 2 تا 5 مورد (بیشتر از 10 درصد و کمتر از 25 درصد در تعداد داده‌های بالاتر) خارج از محدوده پیشنهادی کیت باشد، آزمایش با حداقل 20 داده دیگر تکرار می‌شود، اگر در تکرار آزمایش، باز اگر حداکثر تا دو مورد (10 درصد) خارج از محدوده پیشنهادی کیت شد، محدوده مرجع تأیید می‌شود و اگر بیشتر از دو مورد (10 درصد) خارج از محدوده پیشنهادی کیت باشد محدوده مرجع تأیید نمی‌شود.

اگر محدوده مرجع کیت تأیید نشود باید محدوده مرجع بر اساس استانداردهای موجود با روش‌های مختلف برای کیت در آزمایشگاه تعیین شود.

شکل شماره ۳-۲: الگوریتم تأیید محدوده مرجع بر اساس سند CLSI EP28-A3c



تعیین محدوده مرجع

اگر تستی از توزیع نرمال پیروی کند و توزیع مقادیر بر اساس توزیع گوسین باشد. بهتر است از روش پارامتری استفاده شود .

اگر مشخص نیست که تست از توزیع نرمال پیروی می‌کند یا نه از روش نان پارامتری استفاده شود. یعنی با استفاده از روش‌های غیرپارامتری می‌توان برای نمونه‌های توزیع نرمال هم محدوده مرجع را محاسبه کرد .

اگر عدد صفر هم جزء محدوده مرجع باشد از روش لگاریتمی و یا قانون احتمالات استفاده می‌شود. مانند بیل‌روبین، ولی برای بقیه پارامترها هم می‌توان از روش لگاریتمی و احتمالات استفاده کرد .

بنابراین، مهم این است که بدانید روش لگاریتمی برای ارزیابی این نوع دامنه طبیعی مناسب‌تر است و یا ارزیابی پارامتریک برای توزیع نرمال مناسب‌تر است. اگر پراکندگی داده‌ها از قانون پراکندگی نرمال (Gaussian) تبعیت کند، بهتر است از روش پارامتریک استفاده شود.

خارج کردن داده‌های پرت

برای خارج کردن داده‌های پرت از روش‌های مختلفی مانند روش Mendenhall ، Dixon ، Tukey Freund & Perles ، & Sincich استفاده از عدد Z و... استفاده می‌شود. در اینجا روش Dixon که نسبت به روش‌های دیگر ساده‌تر است، توضیح داده می‌شود .

روش Dixon برای حذف داده‌های پرت برای این کار به ترتیب زیر عمل نمایید :

- داده‌ها را به ترتیب صعودی از کوچک به بزرگ ردیف کنید .
- برای شناسایی مقادیر پرت با استفاده از فرمول دیکسون (Dixons Range Test) به طریق زیر عمل می‌شود :

- اختلاف دو داده متوالی آخر و دو داده متوالی اول را به دست آورید (D) .
- مقدار اختلاف حداکثر و حداقل داده را نیز محاسبه کنید (R) .
- نسبت D/R باید کمتر از یک‌سوم یا کمتر از 0.33 باشد. اگر این نسبت بیشتر از یک‌سوم (0.33) باشد داده اول یا داده آخر (یا هر دو) به‌عنوان داده پرت در نظر گرفته شده و از جمع داده‌ها حذف می‌شود .
- پس از حذف داده‌های مرحله اول، مجدداً محاسبات بالا (مراحل 1 تا 3) را برای مقادیر باقیمانده انجام دهید و اگر داده‌های خارج از این نسبت باشد از سری داده‌ها حذف نمایید .
- این عمل را آن‌قدر تکرار کنید تا جایی که نسبت زیر برقرار شود . ($r=D/R < 0.33$)

مثال 15:

تعداد 20 داده برای محاسبه محدوده مرجع TSH به صورت زیر از کمترین به بیشترین مقدار مرتب شده‌اند برای محاسبه محدوده مرجع به صورت زیر عمل می‌شود.

جدول شماره ۳-۳۵: داده‌های حاصل از اندازه‌گیری TSH برای ارزیابی محدوده مرجع

ردیف	مقدار TSH	ردیف	مقدار TSH
۱	۰.۳	۱۱	۵.۱
۲	۳.۲	۱۲	۵.۲
۳	۳.۴	۱۳	۵.۲
۴	۳.۶	۱۴	۵.۲
۵	۳.۷	۱۵	۵.۲
۶	۳.۸	۱۶	۵.۲
۷	۴.۵	۱۷	۵.۲
۸	۴.۶	۱۸	۵.۳
۹	۴.۷	۱۹	۵.۵
۱۰	۴.۸	۲۰	۸.۲

محاسبه شاخص r برای کوچک‌ترین داده

$$r = \frac{D}{R} = \frac{3.2 - 0.3}{8.2 - 0.3} = \frac{2.9}{7.9} = 0.37$$

محاسبه شاخص r برای بزرگ‌ترین داده

$$r = \frac{D}{R} = \frac{8.2 - 5.5}{8.2 - 0.3} = \frac{2.7}{7.9} = 0.34$$

باتوجه به اینکه مقدار r برای کوچک‌ترین و بزرگ‌ترین داده بیشتر از 0.33 است، بنابراین هر دو داده 0.3 و 8.2 جزء داده پرت در نظر گرفته می‌شود، و باید حذف شوند.

بعد از حذف دو داده بالا، همین عملیات برای داده‌های باقیمانده اعمال می‌شود و مقادیر r برای کوچک‌ترین و بزرگ‌ترین داده (ابتدا و انتهای داده‌ها) محاسبه شده و با مقدار بحرانی مقایسه می‌شود. در این حالت بعد از حذف مقادیر 0.3 و 8.2 کمترین و بیشترین داده گروه برابر 3.2 و 5.5 خواهد بود و عملیات محاسبات برای گروه جدید انجام می‌شود.

محاسبه شاخص r برای ابتدای داده‌های جدید:

$$r = \frac{D}{R} = \frac{3.4 - 3.2}{5.5 - 3.2} = \frac{0.2}{2.3} = 0.09$$

محاسبه شاخص r برای انتهای داده‌های جدید:

$$r = \frac{D}{R} = \frac{5.5 - 5.3}{5.5 - 3.2} = \frac{0.2}{2.3} = 0.09$$

همان‌طور که ملاحظه می‌شود مقدار r یا شاخص دیکسون برای ابتدا و انتهای داده‌های سری دوم کمتر از 0.33 بوده و نمایانگر این است که داده‌های 3.2 و 5.5 جز داده‌های پرت نبوده و داده‌های اصلی هستند. بنابراین گروه داده‌هایی که باید محاسبات ارزیابی محدوده مرجع بر روی آنها انجام شود از 3.2 تا 5.5 در مجموعه داده‌ها هستند

برای محاسبه محدوده مرجع به روش پارامتری بعد از خارج کردن داده‌های پرت میانگین و انحراف معیار داده‌های باقیمانده محاسبه می‌شود و با استفاده از فرمول زیر مقدار محدوده مرجع بر اساس مقدار ضریب اطمینان در نظر گرفته شده محاسبه می‌شود. ضریب اطمینان معمولاً 95 درصد در نظر گرفته می‌شود.

$$\text{Reference Interval} = \text{Mean} \pm 1.96\text{SD}$$

$$\text{High limit RI} = 4.63 + (1.96 * 0.75) = 6.11$$

$$\text{Low limit RI} = 4.63 - (1.96 * 0.75) = 3.16$$

جدول شماره ۳-۴۱: مقادیر میانگین و SD مقادیر باقیمانده بعد از حذف داده‌های پرت برای TSH

مقدار	ردیف	مقدار	ردیف
۵.۱	۱۰	۳.۲	۱
۵.۲	۱۱	۳.۴	۲
۵.۲	۱۲	۳.۶	۳
۵.۲	۱۳	۳.۷	۴
۵.۲	۱۴	۳.۸	۵
۵.۲	۱۵	۴.۵	۶
۵.۲	۱۶	۴.۶	۷
۵.۳	۱۷	۴.۷	۸
۵.۵	۱۸	۴.۸	۹
Average		4.63	
SD		0.75	

ارزیابی محدوده خطی کیت

خطی بودن هر روش، با مقادیر مختلف اهمیت زیادی دارد. اگر در آزمایش، نتایج مختلف حاصل از اندازه‌گیری بر روی یک خط مستقیم قرار گیرند، و یا با اختلاف منطقی از خط ایده‌آل پراکنده شده باشند، آزمایش خطی است.

طبق توصیه CLSI آزمون خطی بودن نیاز به حداقل 5 نقطه (5 غلظت مختلف آنالیت) حداقل غلظت، غلظت 25 درصد، غلظت 50 درصد، غلظت 75 درصد و حداکثر غلظت دارد و در این آزمون ماتریکس نمونه اهمیت زیادی دارد و تهیه رقت‌های مختلف از نمونه یا استاندارد با رقیق‌کننده‌هایی غیر از نمونه سرم انسانی مانند آب مقطر، خطای اندازه‌گیری را افزایش می‌دهند و تشخیص خطی بودن به‌درستی انجام نمی‌شود؛ بنابراین توصیه می‌شود برای ارزیابی محدوده بالای خطی بودن از نمونه‌های سرم انسانی با مقادیر بالا و پائین استفاده شود و برای تهیه نمونه‌های بینابینی از مخلوط کردن نمونه‌های بالا و پائین استفاده شود. در مورد آزمون خطی چند نکته حائز اهمیت است. این ارزیابی دو کاربرد دارد. یکی برای تعیین محدوده گزارش‌دهی Reportable Range و دیگری به‌عنوان یک تست غیرمستقیم در تعیین درستی روش است.

ارزیابی محدوده خطی بر اساس خطای کل مجاز

آزمایشی خطی است که مقادیر حاصله از آزمایش رقت‌های مختلف از آنالیت موردنظر روی خط مستقیم قرار گیرند. در سال 1993 مؤسسه CLSI تعریف دقیق‌تری ارائه داد. "نتایج یک آزمایش زمانی خطی است که خط حاصل از Fitted Polynominal با خط ایده‌آل که از معادله Linear Regression به دست می‌آید تفاوت معنی‌داری نداشته باشد. در سال 2003 این تعریف با اندک تغییری از CLSI بنام EP-G پذیرفته شد.

برای انجام این بررسی نیاز است که دست‌کم 5 غلظت گوناگون از آنالیت موردنظر را تهیه کرد. حداقل 5 نقطه 0٪، 25٪، 50٪، 75٪ و 100٪ برای ارزیابی خطی بودن الزامی است.

روش کار

برای 5 نقطه با توجه به مقدار حجم نهایی نمونه، مقادیر مختلفی از نمونه‌های رقیق و غلیظ را با هم مخلوط نمائید.

فرمول محاسبه رقت‌ها

$$\text{Concentration} = \frac{C1V1 + C5V5}{V1 + V5}$$

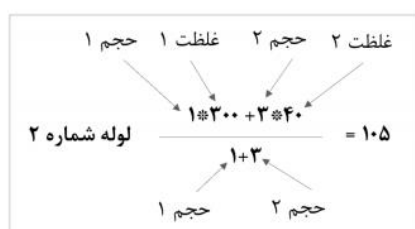
مثال:

استفاده از دو غلظت 40 و 300 برای حجم نمونه 400 میکرولیتر در ارزیابی خطی بودن کیت و مقادیر مورد نیاز هر غلظت برای رقت‌های مختلف:

جدول شماره ۳-۴: تعیین حجم نمونه و مقدار ترکیب نمونه‌های بالا و پائین برای ارزیابی خطی

H	G	F	E	D	C	
	۴۰	غلظت نمونه پائین mg/dl	۳۰۰	غلظت نمونه بالا mg/dl		37
	غلظت مورد انتظار	مقدار نمونه پائین (μl)	مقدار نمونه بالا (μl)	نسبت نمونه بالا و پائین	ردیف	38
	۴۰	۴۰۰	۰	۴ حجم نمونه پائین	۱	39
	۱۰۵	۳۰۰	۱۰۰	۱ حجم بالا + ۳ حجم پائین	۲	40
	۱۷۰	۲۰۰	۲۰۰	۲ حجم بالا + ۲ حجم پائین	۳	41
	۲۳۵	۱۰۰	۳۰۰	۳ حجم بالا + ۱ حجم پائین	۴	42
	۳۰۰	۰	۴۰۰	۴ حجم نمونه بالا	۵	43

مثلاً برای لوله دوم به روش زیر محاسبه شده است.



محاسبه غلظت‌های مختلف محلول‌های خطی برای ۵ نقطه:

$$\begin{aligned} \text{لوله شماره ۱} &= \frac{۰ * ۳۰۰ + ۳ * ۴۰}{۱ + ۳} = ۴۰ \\ \text{لوله شماره ۲} &= \frac{۱ * ۳۰۰ + ۳ * ۴۰}{۱ + ۳} = ۱۰۵ \\ \text{لوله شماره ۳} &= \frac{۲ * ۳۰۰ + ۲ * ۴۰}{۱ + ۳} = ۱۷۰ \\ \text{لوله شماره ۴} &= \frac{۳ * ۳۰۰ + ۱ * ۴۰}{۱ + ۳} = ۲۳۵ \\ \text{لوله شماره ۵} &= \frac{۴ * ۳۰۰ + ۰ * ۴۰}{۱ + ۳} = ۳۰۰ \end{aligned}$$

- برای حذف خطای تصادفی هر نمونه را 3 تا 5 بار اندازه گیری کنید. بهتر است هر نمونه حداقل سه بار اندازه گیری انجام شود.

- میانگین نمونه‌ها را محاسبه نمایید.

- اندازه اختلاف مقدار اندازه‌گیری شده را با مقدار موردانتظار محاسبه کنید و با به‌دست‌آمدن مقدار اختلاف، با استفاده از فرمول زیر مقدار Bias % را محاسبه نمایید

$$\%Bias = \frac{\text{مقدار مورد انتظار} - \text{سنجش آزمایشگاه}}{\text{مقدار مورد انتظار}} \times 100$$

- با داشتن مقدار Bias % و CV % مقدار خطای کل را محاسبه کنید. $TE = Bias + 2CV$

- مقدار خطای کل محاسبه شده را با خطای کل مجاز مقایسه کنید.

- آخرین غلظتی که مقدار خطای کل آن از خطای کل مجاز کمتر باشد، حد بالای خطی بودن را مشخص می‌کند و نمونه باید برای اندازه‌گیری غلظت‌های بالاتر از آن رقیق شود.

در این مثال محدوده خطی بودن تا غلظت 235 میلی گرم در صد میلی لیتر است و مقادیر بالاتر از آن باید رقیق شوند

جدول شماره ۳-۴۹: روش ارزیابی محدوده خطی بر اساس خطای کل مجاز

غلظت نمونه غلیظ mg/dl	۳۰۰	غلظت نمونه پالین mg/dl	۴۰	%CV آزمایشگاه	۲	%TEa	۸		
نسبت نمونه بالا و پالین	مقدار نمونه بالا (μl)	مقدار نمونه پالین(μl)	سنجش ۱	سنجش ۲	سنجش ۳	میانگین	مورد انتظار	%TE	%Recovery
۴ حجم نمونه پالین	۰	۴۰۰	۳۹	۳۸	۳۹	۳۸.۷	۴۰	۷.۳۳	۹۶.۷
۱ حجم بالا- ۳ حجم پالین	۱۰۰	۳۰۰	۱۰۴	۱۰۳	۱۰۴	۱۰۳.۷	۱۰۵	۵.۲۷	۹۸.۷
۲ حجم بالا- ۲ حجم پالین	۲۰۰	۲۰۰	۱۷۵	۱۷۴	۱۷۴	۱۷۴.۳	۱۷۰	۶.۵۵	۱۰۲.۵
۳ حجم بالا- ۱ حجم پالین	۳۰۰	۱۰۰	۲۳۰	۲۲۸	۲۲۷	۲۲۸.۳	۲۳۵	۶.۸۴	۹۷.۲
۴ حجم نمونه بالا	۴۰۰	۰	۲۸۰	۲۷۵	۲۷۴	۲۷۶.۳	۳۰۰	۱۱.۸۹	۹۲.۱

محاسبه مقادیر برای نمونه شماره ۲:

$$\text{میانگین اندازه گیری برای نمونه دوم} = \frac{۱۰۴ + ۱۰۳ + ۱۰۴}{۳} = ۱۰۳.۷$$

$$\%Bias = \frac{۱۰۳.۷ - ۱۰۵}{۱۰۵} \times ۱۰۰ = -۱.۲۷\%$$

$$\%TE = \%Bias + 2\%CV \quad ۱.۲۷ + ۲ \times ۲ = ۵.۲۷$$

مقدار Bias% برای نمونه دوم برابر 1.27٪ است و با توجه به اینکه مقدار CV% آزمایشگاه برابر 2٪ اعلام شده است بنابراین خطای کل آزمایشگاه برابر 5.27٪ است و چون کمتر از مقدار خطای کل مجاز اعلام شده در مرجع انتخاب شده است. (8٪) لذا این سنجش در محدوده خطی کیت قرار دارد. در این محاسبات مقدار خطای کل آزمایشگاه برای نمونه پنجم از طریق محاسبات برابر 11.89٪ است؛ چون مقدار خطای کل سنجش برای این نمونه بیشتر از مقدار خطای کل مجاز (8٪) است پس این نمونه در محدوده خطی کیت قرار ندارد و حداکثر محدوده خطی کیت تا غلظت 235 میلی گرم درصد و نمونه شماره 4 است که خطای کل سنجش آن کمتر از خطای کل مجاز است.

محدوده‌های پائین سنجش

حد تشخیص روش Method Detection Limit مقادیر تعیین‌شده آماری هستند که مشخص می‌کنند چگونه اندازه‌گیری یک ماده توسط یک پروتکل تحلیلی خاص را می‌توان از اندازه‌گیری‌های یک نمونه عاری از آنالیت (نویز پس‌زمینه) متمایز کرد. حد تشخیص روش مختص ماتریس، ابزار و تحلیلگر هستند و به یک روش تحلیلی به‌خوبی تعریف شده نیاز دارند. محدوده‌های پائین سنجش مکانیسم مفیدی برای مقایسه قابلیت‌های آزمایشگاه‌های مختلف با روش‌های یکسان و همچنین روش‌های تحلیلی مختلف در یک آزمایشگاه فراهم می‌کند ارزیابی محدوده‌های پائین سنجش برای همه آزمایش‌ها لازم نیست و فقط برای آنالیت‌هایی مهم است که مقادیر اندک آنها از نظر بالینی مهم است

جدول شماره ۳-۶۲: تعیین محدوده های سنجش برای آزمایش داروی کاربامازین

تعداد	کالیبراتور ۱	کالیبراتور ۲	کالیبراتور ۳	کالیبراتور ۴	کالیبراتور ۵	کالیبراتور ۶
۰	۰.۵	۲	۵	۱۰	۱۵	
۱	۰.۱۵۰	۰.۴۵۰	۱.۸۰۰	۵.۵۰۰	۱۰.۲۰۰	۱۵.۱۰۰
۲	۰.۱۱۰	۰.۵۶۰	۱.۸۸۰	۵.۲۰۰	۱۰.۵۰۰	۱۶.۲۰۰
۳	۰.۱۶۰	۰.۴۸۰	۲.۱۲۰	۵.۲۰۰	۱۰.۰۰۰	۱۵.۳۰۰
۴	۰.۱۲۰	۰.۴۴۰	۲.۱۱۰	۴.۹۰۰	۱۱.۵۰۰	۱۴.۸۰۰
۵	۰.۱۶۰	۰.۴۶۰	۲.۰۲۰	۴.۵۰۰	۱۰.۰۰۰	۱۴.۶۰۰
۶	۰.۲۲۰	۰.۵۶۰	۲.۱۳۰	۵.۲۰۰	۱۰.۰۰۰	۱۵.۳۰۰
۷	۰.۱۱۰	۰.۵۸۰	۱.۹۷۰	۵.۳۰۰	۱۰.۰۰۰	۱۵.۲۰۰
۸	۰.۱۶۰	۰.۴۲۰	۱.۸۵۰	۴.۸۰۰	۱۰.۰۰۰	۱۵.۳۰۰
۹	۰.۱۹۰	۰.۴۴۰	۱.۶۹۰	۴.۷۰۰	۱۰.۰۰۰	۱۵.۲۰۰
۱۰	۰.۳۳۰	۰.۴۵۰	۱.۸۸۰	۴.۹۰۰	۱۱.۰۰۰	۱۵.۱۰۰
۱۱	۰.۱۱۰	۰.۴۶۰	۲.۱۴۰	۵.۱۰۰	۱۱.۰۰۰	۱۵.۰۰۰
۱۲	۰.۳۳۰	۰.۴۸۰	۱.۸۹۰	۵.۳۰۰	۱۱.۰۰۰	۱۵.۰۰۰
۱۳	۰.۰۳۰	۰.۴۴۰	۲.۱۳۰	۵.۶۰۰	۱۱.۰۰۰	۱۵.۳۰۰
۱۴	۰.۱۸۰	۰.۴۶۰	۲.۱۱۰	۵.۹۰۰	۱۱.۰۰۰	۱۴.۹۰۰
۱۵	۰.۱۴۰	۰.۵۵۰	۲.۲۱۰	۵.۵۰۰	۱۱.۰۰۰	۱۴.۸۰۰
۱۶	۰.۱۰۰	۰.۵۱۰	۱.۷۸۰	۵.۱۰۰	۱۰.۰۰۰	۱۴.۲۰۰
%TE	۹۷.۴۰۷	۲۳.۲۹۰	۱۸.۰۶۳	۱۵.۸۹۵	۱۲.۲۳۱	۷.۶۱۰
Mean	۰.۱۶۲	۰.۴۸۴	۱.۹۸۲	۵.۱۶۹	۱۰.۵۱۳	۱۵.۰۸۱
SD	۰.۰۷۷	۰.۰۵۱	۰.۱۵۹	۰.۳۵۹	۰.۵۳۸	۰.۴۲۳
%CV	۴۷.۷۰۳	۱۰.۶۴۵	۸.۰۳۱	۶.۹۴۸	۵.۱۱۵	۲.۸۰۵
Bias ug/ml	۰.۱۶۲	-۰.۰۱۶	-۰.۰۱۸	-۰.۱۶۹	-۰.۵۱۲	-۰.۰۸۱

%TEa	۲۰
%Bias _{Method}	۲
%CV _{Method}	۹

مرز شاهد

برای تعیین مرز شاهد (LoB) از کالیبراتور صفر (۰) استفاده میشود و تعداد حداقل 20 تا 40 بار مورد سنجش قرار گرفته و میانگین و انحراف استاندارد خوانده های کالیبراتور صفر محاسبه شده و با استفاده از فرمول زیر مقدار مرز شاهد محاسبه میشود. منظور از مرز شاهد بزرگترین نتیجه ای است که با یک احتمال معین ممکن است از سنجش نمونه شاهد به دست آید. برای تعیین مرز شاهد باید یک نمونه عاری از آنالیت مورد نظر را، که معمولاً کالیبراتور صفر است، دست کم ۲۰ بار در یک دور یا یک روز اندازه گیری میشود، و میانگین و انحراف معیار نتایج تعیین میشود و LoB با احتمال ۹۰ درصد یا ۹۵ درصد محاسبه می شود. این یعنی ۹۰ درصد از جواب های حاصل از سنجش استاندارد صفر زیر قرار می گیرند (LoB)

$$LoB = \text{Mean}_{\text{blank}} + 1.65 SD_{\text{blank}}$$

$$\text{Mean}_{\text{blank}} = 0.162$$

$$SD_{\text{blank}} = 0.077$$

$$LoB = 0.162 + (1.65 * 0.077) = 0.289$$

محدوده تشخیص

حال اگر در یک نمونه مقدار کابامازپین واقعی 0.3 میکروگرم در میلی‌لیتر باشد و با روش بالا آن را بررسی کنیم نتیجه سنجش ما چه خواهد بود؟ آیا با اطمینان می‌توانیم بگوییم که نتایج آن بالاتر از مقدار Critical یا LoB قرار می‌گیرد؟ قطعاً نمی‌توان با اطمینان گفت که مقدار آن همیشه بالاتر از LoB یا مرز شاهد قرار می‌گیرد. چون بستگی به میزان SD روش دارد ممکن است مقداری بالاتر از LoB به دست بیاید و نیز ممکن است مقداری در محدوده شاهد به دست آید، ولی مقدار واقعی آنالیت با مقدار صفر تفاوت دارد. مقدار 0.3 که بیشتر از صفر است اصطلاح دیگری دارد و آن محدوده تشخیص است Limit of Detection یا LoD که به‌صورت ساده فرمول آن به‌قرار زیر است

$$LoD = LoB + 1.65 SD_{\text{Spiked}}$$

و با اطمینان ۹۵٪ درصد اطمینان فرمول به صورت زیر در می‌آید.

$$LoD = LoB + 2 SD_{\text{Spiked}}$$

حال اگر مقدار $LoB=0.289$ و مقدار SD کالیبراتور 1 یا همان Spiked برابر 0.051 باشد مقدار LoD با 90 درصد اطمینان برابر 0.374 میکروگرم در میلی‌لیتر خواهد شد

$$LoD = 0.289 + (1.65 * 0.051) = 0.374$$

$$\text{Limit of detection} = \text{Mean}_{\text{Blank}} + 3SD_{\text{Blank}}$$

محدوده کمی

برای ارزیابی محدوده کمی یا Limit Of Quantitation شرایطی لازم است که این شرایط بیشتر باید مدنظر قرار گیرد. ابتدا نمونه Spiked تهیه شود و نمونه بلانک که مقدار جزئی به آن آنالیت اضافه شده باشد همان Spiked است. افزودن مقدار کم آنالیت به بلانک شرایط خاصی دارد:

اولاً از یک مقداری کمتر نباشد تا دستگاه‌های ما بتوانند آن را از کالیبراتور صفر (0) متمایز کنند. از یک مقدار مجاز هم بیشتر نباشد تا از محدوده تشخیص Detection Limit فراتر برود

ثانیاً و وارد محدوده قابل‌اندازه‌گیری یا محدوده کمی Limit Of Quantitation LoQ () شود؛ بنابراین نمونه Spiked را میتوان با افزودن مقادیر متفاوتی از آنالیت در سریهای مختلف و اندازه‌گیری حداقل 20 تا 30 بار در ران‌های مختلف بدست آورد

$$MDL = SD_{\text{Spiked}} * t_{\text{critical}}$$