

(Quantitative)

Method Validation

(Quantitative)

Method Validation

- :

(Quantitative)

Method Validation

	فهرست :
	مقدمه
	بررسی دقت
	مقایسه دقت دو روش آزمایشگاهی
	بررسی صحت
	مقایسه روشها
	آزمون بازیابی
	بررسی محدوده گزارشدهی
	تصمیم گیری 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 مشتریان روش جدید را بررسی و تأیید نماید.

از آنجائیکه 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 طبیعتاً مهارت کاربر دارد، لازم است هر آزمایشگاه خود قابلیت روش را ارزیابی نماید.

برای بررسی روشهای کمی quantitative که قبلاً توسط شرکت سازنده مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند لازم است حداقل پارامترهای

دقت

صحت

محدوده گزارشدهی و

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 صحت‌گذاری روشها بر اساس مراجع مختلف بصورت ساده و مختصر بیان شده است و برای کسب اطلاعات بیشتر می‌توان از مراجع انتهایی دستورالعمل و نیز سایر منابع معتبر استفاده نمود.

۱- بررسی دقت از طریق آزمون تکرارپذیری

بررسی تکرارپذیری یکی از گامهای اولیه در بررسی یک روش آزمایشگاهی بوده و بمنظور تخمین میزان عدم دقت یا خطای راندوم (اتفاقی) آزمایش بکار می‌رود.

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 بعلاوه 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.

(Quantitative)

Method Validation

- 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 می تواند متاثر از عواملی همچون پایدارکننده ها، لیوفیلیزاسیون، برخی افزودنی ها برای افزایش مقادیر و تشدید فعالیت آنزیمها و نیز به حجم رساندن باشد.
- از مخلوط نمونه های تازه انسانی می توان برای مدت کوتاه استفاده کرد مثل آزمایشات دوپل در یک روز

نمونه ها 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 تصمیم گیری بالینی Decision level دارد. بعنوان مثال برای گلوکز می توان ۳ نمونه در غلظتهای 50mg/dL (هیپوگلیسمی)، 120mg/dL (محدوده تشخیصی دیابت) و 160mg/dL (محدوده مورد استفاده در GTT) انتخاب نمود و برای کلسترول ۲ نمونه در مقادیر 200mg/dL و 240mg/dL مناسب می باشد.

مدت مطالعه و تعداد دفعات آزمایش :

بطور معمول تکرارپذیری با ۲۰ بار آزمایش کمیت در یک نمونه و محاسبه میانگین و انحراف معیار بدست می آید. مدت مطالعه باید به اندازه ای باشد که باعث گردد با تاثیر متغیرهایی که بطور معمول در آزمایشگاه وجود دارند، نتایج واقعی تری بدست آید. اگر مطالعه ای کوتاه مدت (مثلا در یک سری کاری Within run) انجام شود، طبیعتا نتایج نزدیک به هم حاصل می گردند که باعث می شود تخمینی خوش بینانه 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 کاری (۴ هفته) حاصل گردد.
- روش دیگر، انجام آزمایش بصورت دوتایی در ۱۰ روز کاری است.
- در صورت عدم امکان اجرای روشهای فوق می توان در ۵ روز کاری، نمونه را ۴ بار در هر روز آزمایش نمود.

محاسبات آماری :

خطای راندوم از طریق محاسبه انحراف معیار و ضریب انحراف و با استفاده از فرمولهای زیر بدست می آید.

$$mean = \frac{\sum x_i}{n} \quad SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - mean)^2}{n - 1}} \quad CV\% = \frac{SD * 100}{mean}$$

CV : ضریب انحراف (Coefficient of variation)

x_i : هر تک خوانده

SD: انحراف معیار (Standard deviation)

mean : میانگین

n : تعداد خوانده ها

با توجه به اینکه میزان انحراف معیار تابعی از غلظت نمونه مورد بررسی می باشد، بطور معمول CV% شاخص بهتری از عدم دقت سیستم اندازه گیری، ارائه می دهد.

تفسیر نتایج:

(Quantitative)

Method Validation

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 فلیم‌فتمتر خریداری و کنترل تجاری را ۲۰ بار مورد آزمایش قرار داده و نتایج زیر را بدست آورده است :

132	132	129	124
123	143	129	126
129	132	127	132
125	132	132	123
128	128	132	132

همانطور که در جدول مشاهده می‌شود محدوده نتایج بین 123 تا 143 قرائت گردیده است. میانگین 129.5 و انحراف معیار معادل 4.5 می‌باشد. با محاسبه نتایج فوق CV% در حدود 3.5% 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 میانگین 131، انحراف معیار 1.05 و CV% معادل 0.8% بوده که با معیار CLIA (0.76%) مطابقت دارد.

132	130	132	130
131	132	129	130
129	131	131	132
131	132	132	130
131	132	132	132

مقایسه دقت دو روش آزمایشگاهی:

برای اینکه دقت و عبارتی 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 هر دو 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:

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

منظور از SD₁ انحراف معیار بزرگتر و SD₂ انحراف معیار کوچکتر است.

(Quantitative)

Method Validation

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: آزمایشگاهی 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

برای استفاده از فرمول F به روش زیر عمل می‌نماید:

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

$$F = 1.07$$

با مراجعه به جدول F مقدار F بحرانی برای ۲۰ بار تکرار (درجه آزادی بابار است با n-1 یعنی ۱۹-۲۰ یا ۱۹) با $P = 0.05$ معادل 2.16 بدست می‌آید.

نظر به اینکه عدد F در محاسبات آماری آزمایشگاه 1.07 بوده که کمتر از 2.16 است، تکرارپذیری دو روش باهم اختلاف معنی‌دار ندارد.

90	78	97	98
88	89	94	89
98	63	93	87
87	96	97	76
89	95	96	79
92	76	93	97
90	98	89	95
88	96	88	98
65	98	79	88
76	90	86	89
mean	87.1	mean	90.4
SD	10.35	SD	6.65

۲- بررسی صحت:

صحت یک روش آزمایشگاهی از راههای مختلفی بررسی می‌گردد که یکی از آنها اندازه‌گیری کمیت مورد نظر در ماده مرجع و مقایسه نتیجه حاصله با مقدار مورد انتظار می‌باشد. باید در نظر داشت کنترل‌های تجاری که در انواع مختلف در بازار عرضه می‌شوند عموماً ارزش صحتی ندارند 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.

متأسفانه برای بسیاری از پارامترها مواد یا روشهای مرجع در دسترس نیست و یا حتی علیرغم عملکرد قابل قبول روش آزمایشگاهی بر روی نمونه‌های انسانی، به دلایل مختلف مانند اثرات زمینه‌ای خوانش مقادیر ماده مرجع بدرستی انجام نمی‌گیرد.

بهین جهت روش دوم بررسی صحت از طریق مقایسه روشها Comparison between method ارزش پیدا می‌کند.

۲-۱ آزمون مقایسه روشها Comparison of methods experiment

آزمون مقایسه روشها بمنظور بررسی خطای سیستماتیک و عدم صحت انجام می‌گردد. در این آزمون، خطای سیستماتیک بر مبنای تفاوت نتایجی که از آزمایش نمونه بیماران، با استفاده از روش جدید (تحت آزمون) و روش مورد مقایسه بدست آمده است، تخمین زده می‌شود.

(Quantitative)

Method Validation

نکات مهم: در انتخاب روشی که در این ارزیابی به عنوان روش مقایسه‌ای استفاده می‌شود، باید دقت کافی مبذول داشت. زیرا تفسیر نتایج، بر مبنای ارزش نتایج روش مورد مقایسه و اطمینان از درستی آن انجام شده و تفاوت نتایج حاصله بعنوان خطای ناشی از روش مورد ارزیابی تلقی خواهد شد. در صورت امکان بهتر است از روش مرجع Reference Method جهت مقایسه استفاده شود.

واژه روش مرجع معرف روشی است که دارای کیفیت بسیار بالا بوده و خود در مقابل روش قطعی یا Definitive Method یا از طریق ردیابی به مواد استاندارد مرجع Standard Reference Material صحیح شناخته شده است.

واژه روش مقایسه‌ای Comparative Method عنوان معمولتری است که دلالت بر درستی یا نادرستی نتایج و وجود شواهد مستند نمی‌نماید. اغلب روشهای رایج آزمایشگاهی در این گروه رده‌بندی می‌شوند. هنگام استفاده از این اینگونه روشها بعنوان روش مورد مقایسه در ارزیابی روشها، باید نتایج دو روش به دقت مورد مطالعه قرار گیرند. اگر اختلاف نتایج بین دو روش ناچیز باشد بدین معناست که هر دو روش دارای صحت نسبی می‌باشند ولی اگر اختلاف زیاد باشد باید مشخص گردد کدامیک از روشها صحیح نبوده‌اند.

تعداد نمونه:

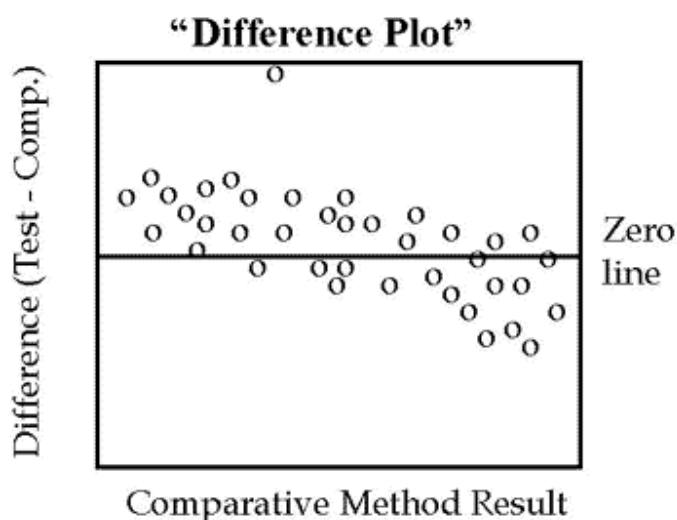
حداقل تعداد نمونه که باید توسط هر دو روش بررسی شوند، ۴۰ نمونه تعیین شده است. این نمونه‌ها باید به گونه‌ای انتخاب شود که محدوده غلظتی قابل اندازه‌گیری دو روش مورد آزمون و مقایسه‌ای را پوشش داده و نمونه‌های با غلظت طبیعی و غیرطبیعی را در بر گیرند. وجود غلظتهای مختلف بحدی مهم است که در برخی مقالات عنوان شده که از آزمایش ۲۰ نمونه که با دقت انتخاب شده و پراکندگی غلظت آنها در تمام گستره اندازه‌گیری باشد، اطلاعات بیشتری نسبت به ۱۰۰ نمونه که فاقد این خصوصیات باشد، بدست می‌آید.

محدوده زمانی:

برای به حداقل رساندن اثر خطای سیستماتیک ناشی از یک سری کاری، توصیه می‌شود ارزیابی مقایسه روشها در روزهای مختلف انجام شود. حداقل دوره زمانی ۵ روز تعیین شده است و روزانه ۸ نمونه باید با دو روش آزمایش شود.

تفسیر نتایج:

اساسی‌ترین روش تحلیل، رسم نمودار مقایسه نتایج و بررسی چشمی اختلافات بین نتایج دو روش است. در مورد روشهایی که انتظار می‌رود انطباق نقطه به نقطه داشته باشند، نمودار تفاوتها Difference Plot مورد استفاده قرار می‌گیرد.



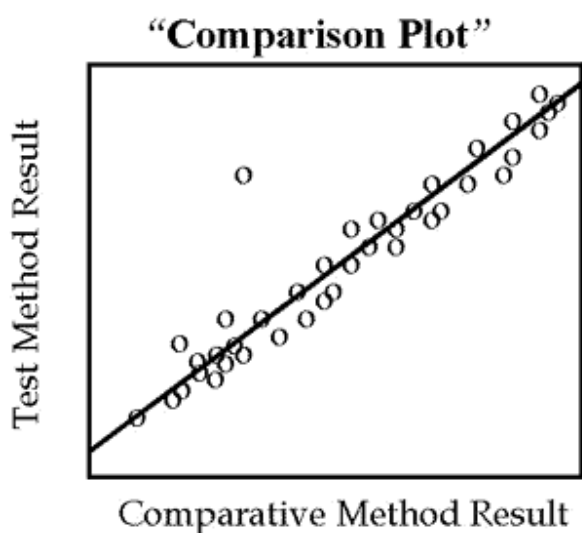
(Quantitative)

Method Validation

در این نمودار هر نقطه نشانگر تفاوت نتایج دو روش مختلف در آزمایش یک نمونه و محور صفر نشاندهنده عدم اختلاف نتایج دو روش می‌باشد. عبارتی وقتی نقاط، روی محور صفر یا در دو طرف محور صفر و با فاصله اندک نسبت به آن قرار گیرند، بدین معناست که نتایج حاصل از دو روش با هم اختلاف کمی دارند. وجود هر خواننده دورافتاده نشاندهنده تفاوت نتایج آزمایش حاصل از اندازه‌گیری کمیت در یک نمونه، با دو روش بوده و جهت اطمینان از آن، بهتر است نمونه دوباره بررسی شود.

هرگاه در مورد روشهایی که با هم مقایسه می‌شوند انتظار تطابق نقطه به نقطه نداشته باشیم می‌باید از نمودار Comparison Plot استفاده نمود. که مثال آن واکنشهای آنزیمی می‌باشد.

در این نمودار محور X نشانگر روش مقایسه‌ای و نمودار Y نشانگر نتایج روش تحت بررسی می‌باشد. نقاط تلاقی نتایج روش مورد بررسی روی نمودار نشان داده شده و بهترین خط از بین نقاط ترسیم می‌شود.



هدف اصلی این نمودار تشخیص فوری نقاط دور افتاده می‌باشد تا بتوان تا زمانیکه نمونه‌ها در دسترس هستند، بررسی مجددی روی آنها صورت داد.

محاسبات آماری:

محاسبات آماری بمنظور تعیین مقادیر خطای سیستماتیک بهتر است در محدوده تصمیم‌گیری بالینی انجام شود. فرمول رگرسیون خطی و تعیین Slope و Intercept در این محاسبات مورد استفاده قرار می‌گیرد.

$$Y = a + bX_c$$

$$SE = Y_c - X_c$$

Slope : b

Y : نتیجه روش مورد بررسی

Intercept : a

X_c: نتیجه روش مقایسه‌ای در محدوده تصمیم‌گیری بالینی

SE: خطای سیستماتیک

بطور مثال در مقایسه دو روش اندازه‌گیری کلسترول، از رگرسیون خطی نتایجی بشرح زیر حاصل گردیده است :

Intercept : معادل 2mg/dL و Slope :b معادل 1.03

(Quantitative)

Method Validation

$$Y = 2 + 1.03 X_c \quad \text{بعبارتی}$$

بنابراین در غلظت 200mg/dL کلسترول، Y از طریق فرمول زیر بدست می‌آید:

$$Y = 2 + 1.03 * 200 = 208$$

در واقع اگر نتیجه آزمایش با روش مورد مقایسه 200 mg/dL باشد، جواب روش تحت آزمون معادل 208 mg/dL خواهد بود.

و خطای سیستماتیک برابر با 8mg/dL خواهد بود. یعنی

$$SE = 208 - 200 = 8\text{mg/dL}$$

ضریب همبستگی ۲ بمنظور برآورد کفایت محدوده مورد بررسی نمونه‌ها و ارزش رگرسیون خطی استفاده می‌شود. اگر ۲ معادل یا بیش از 0.99 بود می‌توان از رگرسیون خطی ساده استفاده کرد و هر گاه کمتر از آن بود باید نمونه‌های بیشتری آزمایش شود یا از محاسبات آماری T-Test یا سایر آزمون‌های آماری پیچیده، جهت تخمین خطای سیستماتیک استفاده شود.

در مقایسه روشهایی که دامنه اندازه‌گیری کوچکی دارند مانند سدیم یا کلسیم بهتر است میانگین تفاوت روشها مورد بررسی قرار گیرد که 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 خطای سیستماتیک و خطای تصادفی باید از خطای 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.

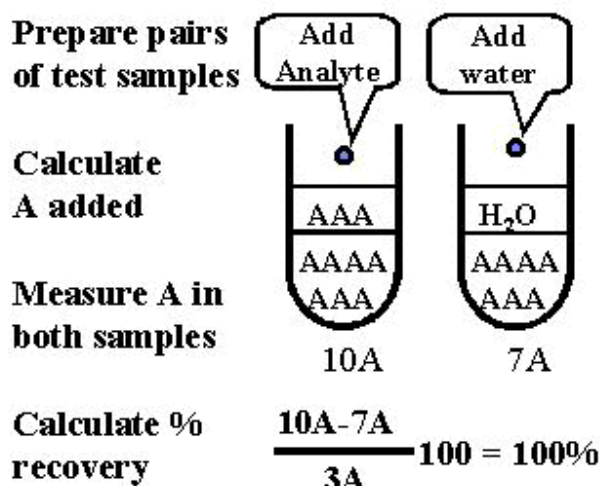
روش اجرا:

(Quantitative)

Method Validation

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 محلولهای کالیبراسیون) ریخته می‌شود. هر دو لوله با روش آزمایشگاهی تحت بررسی آزمایش شده و نتایج با هم مقایسه می‌گردد. (شکل زیر)

The Recovery Experiment



نکات مهم:

- باید در نظر داشت حجم استاندارد اضافه شده در مقابل حجم نمونه می‌بایست به حدی باشد که باعث اثرات زمینه ای matrix effect نگردد. در این مورد نسبت ۱۰٪ پیشنهاد می‌گردد بعنوان مثال 0.1mL از استاندارد به 0.9 یا 1mL اضافه گردد.
- درستی پیمت کردن: با توجه به اینکه حجم نمونه برداشت شده نقش اساسی در آزمون بازیابی دارد، می‌بایست برای اجرای این آزمون از کارشناسان با تجربه و وسایل با کیفیت استفاده نمود.
- غلظت اضافه شده: نظر به اینکه می‌بایست برای جلوگیری از اثرات زمینه‌ای، حجم استاندارد برداشتی را به حداقل برسانیم، غلظت اولیه استاندارد می‌بایست بالا باشد بعنوان مثال ۵۰۰ یا ۱۰۰۰ mg/dL برای گلوکز
- تعداد دفعات آزمایش بر روی نمونه: پس از تهیه نمونه‌ها برای به حداقل رساندن خطای راندم باید نمونه‌های تهیه شده را ۲-۴ با مورد آزمایش قرار داد.
- تعداد نمونه‌های انسانی: تعدادی نمونه‌های انسانی که در این آزمایش مورد استفاده قرار می‌گیرند بستگی به آنالیت مورد بررسی دارد. مثلاً در مورد پروتئین تعداد کمی نمونه کافی است ولی در مورد بررسی داروها شاید لازم باشد تعداد بیشتری نمونه آزمایش شود.
- تأیید روش انجام آزمون: بهتر است نمونه‌های تهیه شده، علاوه بر روش تحت کنترل، با روش مقایسه‌ای نیز آزمایش شوند. این کار باعث می‌شود خطاهایی مانند عدم پایداری استاندارد، اشکال در تهیه نمونه و مخلوط نکردن نمونه‌ها، شناسایی گردد.

محاسبات:

۱- غلظت آنالیتی را که به نمونه اضافه کرده‌اید محاسبه نمائید

Standard concentration \times (ml standard) / (ml standard + ml specimen)

(Quantitative)

Method Validation

مثال: اگر برای یک روش اندازه گیری کلسیم آزمون بازیابی انجام می‌دهید، در صورتیکه 0.1 ml از استاندارد 20 mg/dL را به ۱ میلی لیتر سرم اضافه نمائید، مقدار اضافه شده برابر خواهد بود با

$$20 * (0.1/1.1) = 1.82 \text{ mg/dL.}$$

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

$$\text{Sample A addition} = (11.4 + 11.6)/2 = 11.5 \text{ mg/dL;}$$

$$\text{Sample B addition} = (11.2 + 11.0)/2 = 11.1 \text{ mg/dL;}$$

$$\text{Sample A dilution} = (9.7 + 9.9)/2 = 9.8 \text{ mg/dL;}$$

$$\text{Sample B dilution} = (9.5 + 9.5)/2 = 9.5 \text{ mg/dL;}$$

۳- اختلاف بین دو نمونه که به آنها رقیق‌کننده و آنالیت اضافه شده محاسبه نمائید.

$$\text{Sample A addition} = 11.5, \text{ Sample A dilution} = 9.8, \text{ difference} = 1.7 \text{ mg/dL}$$

$$\text{Sample B addition} = 11.1, \text{ Sample B dilution} = 9.5, \text{ difference} = 1.6 \text{ mg/dL}$$

بازیابی را از تقسیم اختلاف نتایج دو نمونه حاوی رقیق‌کننده و آنالیت (که در بالا بدست آمد) بر غلظت اضافه شده (که در بند ۱ بدست آمد) محاسبه نمائید.

$$(1.7 \text{ mg/dL} / 1.82 \text{ mg/dL}) 100 = 93.4\% \text{ recovery}$$

$$(1.6 \text{ mg/dL} / 1.82 \text{ mg/dL}) 100 = 87.9\% \text{ recovery}$$

۴- میانگین بازیابی را محاسبه نمائید

$$(93.4 + 87.9)/2 = 90.6\% \text{ average recovery}$$

۶- مقدار خطای نسبی یا proportional error را محاسبه نمائید.

$$100 - 90.6 = 9.4\% \text{ proportional error}$$

تفسیر :

نتایج حاصله می‌تواند با Bias% مجاز مقایسه گردد.

۳- بررسی محدوده گزارشدهی از طریق آزمون خطی بودن Linearity

بررسی میزان خطی بودن یک روش آزمایشگاهی، بمنظور بررسی محدوده گزارشدهی 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 و L بعنوان نمونه با غلظت پائین در نظر گرفته شود می‌توان رقیق‌سازی را بشکل زیر انجام داد:

۳ قسمت H و ۱ قسمت L (رقت $\frac{3}{4}$)

۲ قسمت H و ۲ قسمت L (رقت $\frac{1}{2}$)

۱ قسمت H و ۳ قسمت L (رقت $\frac{1}{4}$)

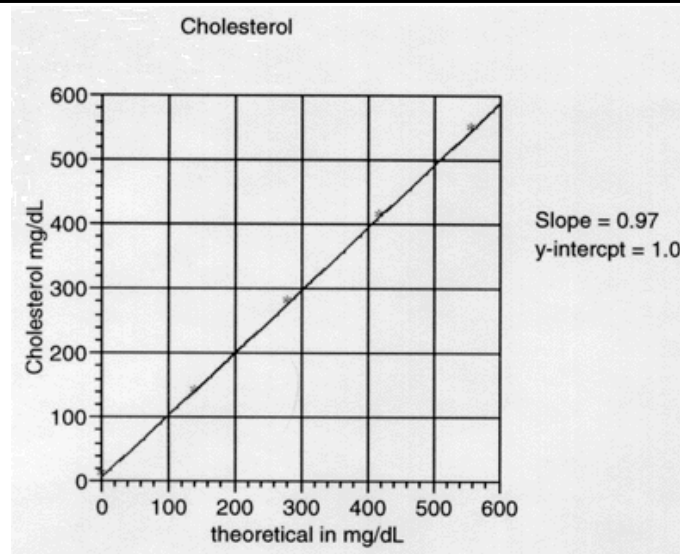
با توجه با نیاز می‌توان رقت‌های دیگری نیز تهیه نمود.

رقت‌های تهیه شده و نمونه‌های رقیق نشده (H و L) بصورت دوتایی (در مراجع ۳ تا ۴ 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 600 mg/dL تأیید می‌شود.



تصمیم گیری در مورد نتایج ارزیابی روش آزمایشگاهی :

برای تصمیم گیری در مورد یک روش آزمایشگاهی باید مقادیر حاصله را با خطای مجاز مقایسه نمود. همه موارد زیر می توانند برای محاسبه خطای مجاز استفاده شوند . با بکارگیری نمودار تصمیم گیری همه آنها به نوعی لحاظ می شوند.

- $\text{bias} + 2\text{SD} < \text{TEa}$;
- $\text{bias} + 3\text{SD} < \text{TEa}$;
- $\text{bias} + 4\text{SD} < \text{TEa}$

برای ترسیم این نمودار محور y را بصورت $\text{allowable inaccuracy}$ و محور x را به عنوان $\text{allowable imprecision}$ نمایش دهید. خطای مجاز به درصد در محور عمودی و نیمی از خطای مجاز به درصد در محور افقی قرار می گیرد. سپس

۱- از بالاترین حد مجاز محور عمودی (در شکل زیر 10%) خطی به انتهای محور افقی یعنی 0.50 TAE (که در مثال معادل 5% است) کشیده میشود.

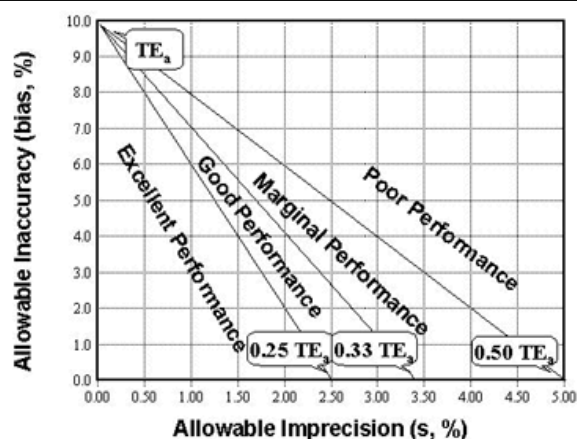
۲- خط دوم از بالاترین مقدار محور عمودی (در شکل زیر 10%) به 0.33 TAE ، که در مثال معادل 3.3% است کشیده می شود.

۳- خط سوم از بالاترین نقطه به 0.25 TAE که در مثال معادل 2.5% است، کشیده می شود.

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

(Quantitative)

Method Validation



در مرحله بعد نتایج عدم دقت بر حسب CV% روی محور افقی و نتایج بررسی صحت بر حسب Bias% روی محور عمودی قرار گرفته و نقطه تلاقی روی نمودار نمایش داده می‌شود. محل نقطه تلاقی نشان‌دهنده عملکرد سیستم آزمایشگاهی می‌باشد.

مثال : بر اساس معیارهای CLIA خطای تام مجاز کلسترول معادل 10% است لذا نمدار مطابق توضیحات ترسیم شده و عملکرد 4 کیت سنجش کلسترول نمایش داده شده است:

A: کیت اندازه‌گیری کلسترول که CV% آن 2% و bias آن معادل 0% است. با توجه به محل تقاطع CV% روی محور افقی و Bias% که در منطقه Excellent قرار گرفته، عملکرد این کیت عالی در نظر گرفته می‌شود.

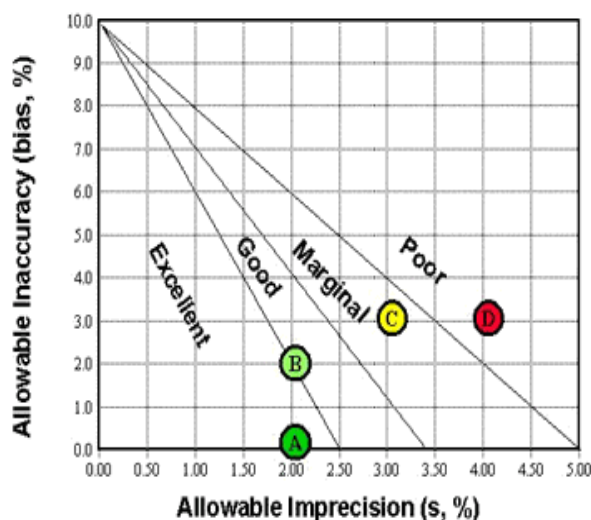
B: در کیت دوم CV% برابر 2% و bias معادل 2% است. تقاطع نقاط در محل Good قرار گرفته و عملکرد کیت خوب در نظر گرفته می‌شود.

C: کیت سوم CV% برابر 3% و bias معادل 3% 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 4% و bias معادل 3% دارد که تقاطع نتایج در محدوده عملکرد نامناسب قرار گرفته و کیت برای استفاده در آزمایشگاه مناسب نیست.

(Quantitative)

Method Validation



۴- بررسی محدوده مرجع

هدف

آخرین ویژگی که در روند ارزیابی روشها مورد مطالعه قرار میگیرد، محدوده مرجع Reference Interval میباشد و این بررسی فقط هنگامی ضرورت مییابد 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 می آید. روشهای انتخاب افراد و گروه مرجع در استانداردهای IFCC و CLSI (NCCLS C28-A) شرح داده شده است. در این مراجع، حداقل تعداد نمونه و افراد مورد بررسی، ۱۲۰ 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 بسیار دقیق بوده و کلیه عوامل پیش از تجزیه و پس از تجزیه باید کاملاً در این روند مشخص باشند. نیاز به تعیین محدوده مرجع معمولاً هنگامی محسوس است که یک آزمایشگاه در دستورالعمل کیتها و یا روشهای تایید شده قبلی تغییراتی انجام داده و یا از روشهای راه اندازی شده در همان آزمایشگاه استفاده مینماید.

از آنجایی که تعیین محدوده مرجع با توجه به دستورالعمل های استاندارد، شرایط کاری دشوار و نیاز 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

Method Validation

■ حالت اول - انتقال محدوده مرجع یک کمیت از یک آزمایشگاه به آزمایشگاه 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 های مورد اندازه گیری با هردو روش (روشی که برای آن قبلاً محدوده مرجع تعیین شده و روشی که میخواهد از محدوده مرجع این روش استفاده نماید) و همچنین 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 تأیید 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 :

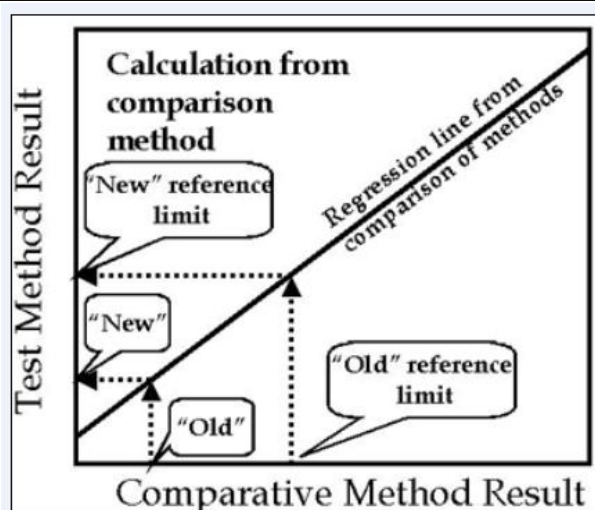
در این روش نمونه‌های ۲۰ فرد (جمعیت مرجع روش جدید) در صورتیکه این افراد دارای شرایط جغرافیایی و دموگرافیک مشابه با جمعیت مرجع روش قبل (روشی که برای آن محدوده مرجع تعیین شده است) باشند، مورد اندازه گیری کمیت خاص قرار میگیرند. (بطور مثال مانند زمانیکه برای کیت اول مورد استفاده در آزمایشگاه، محدوده مرجع قابل اطمینان تعیین شده و آزمایشگاه میخواهد روش فعلی را به روش دوم تغییر دهد). اگر حداکثر دو 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 دو نتیجه خارج از محدوده مرجع قرار گیرد در اینصورت میباید ۲۰ فرد دیگر انتخاب شده و بر روی آنان آزمایش انجام شود اگر مجدداً بیش از ۲ نتیجه خارج از محدوده 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 ۶۰ نمونه

در این روش میباید نتایج حاصله از اندازه‌گیری کمیت خاص در ۶۰ فرد را با محدوده مرجع کیت قبل مقایسه نمود. پس از انجام آزمایش بر روی نمونه‌ها، موارد دورافتاده حذف شده و از روشهای محاسباتی خاص مطابق دستورالعمل برای حذف خواننده‌های 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.

۴- 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 $x=150$ U/ l و $a=1$ و $b=2$ باشد، پس Y برابر خواهد بود با

$$Y = 1 + 2 \cdot 150 = 301 \text{ U/ l}$$

یعنی اگر حد مرجع

■ 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- ۴۰ 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 هر دور روش مورد اندازه گیری قرار گیرد .

۳- هر روز نتایج را بلافاصله بر روی نمودار برده و ارتباط نتایج بطور چشمی بررسی میشود هرگونه خوانده دور از انتظار میباشد تکرار گردد.

۴- اگر نتایج تفاوت حاصل شده باشد کلیه مراحل ۵ روز دیگر تکرار میگردد.

۵- correlation / coefficient انجام شده و اگر $r > 0.9$ بود رگرسیون خطی ساده انجام شده و خطای سیستماتیک در محدوده تصمیم گیری

تخمین زده میشود. در این مرحله می توان

۶- اگر $r < 0.9$ باشد خطای میانگین خوانده هارا از طریق t-test محاسبه کرده و سپس خطای کلی در محدوده تصمیم گیری تخمین زده میشود.

Method Validation

$$Y = a + bX$$

$$SE \text{ (systematic error)} = Y - X$$

ALP comparison study :

$$X = 200 \text{ mg/dl}$$

$$Y = a + bX$$

$$a = 2 \quad \text{slope} = 1.03$$

$$Y = 2.0 + 1.03X = 208$$

$$\text{systematic error} = 208 - 200 = 8$$

1. Burtis C.A , Ashwood E.R ,TIETZ Textbook of clinical chemistry Fourth edition , Saunders , 2006 ,
2. Burtis C.A , Ashwood E.R ,TIETZ Textbook of clinical chemistry, Third edition , Saunders , 1999
3. McPherson R.A, Pincus M.R , Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, SAUNDERS ELSEVIER ,2006,pp.
4. Fraser C.G, Generation and application of analytical goals in laboratory medicine, Ann.1st.super.sanita. vol.27,N.3(1991).pp.369-376
5. Badrick T , Quality leadership and quality control, Clin Biochem Rev Vol 24 August 2003/pp.81-3
6. 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 1999;59:491-500
7. NCCLS Document EP9-A2 Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline—Second Edition
8. NCCLS Document C24-A2 Vol. 19 No. 5 Statistical Quality Control for Quantitative Measurements: Principles and Definitions; Approved Guideline—Second Edition, February 1999
9. NCCLS Document EP13- R Laboratory Statistic – Standard deviation : A Report, Agust 1995
10. NCCLS Document
11. James O. Westgard, Ph.D. METHOD VALIDATION - THE COMPARISON OF METHODS EXPERIMENT
12. James O. Westgard, Ph.D. METHOD VALIDATION - THE DECISION ON METHOD PERFORMANCE
13. James O. Westgard, Ph.D. METHOD VALIDATION - THE INTERFERENCE AND RECOVERY EXPERIMENTS
14. James O. Westgard, Ph.D. METHOD VALIDATION - THE LINEARITY OR REPORTABLE RANGE EXPERIMENT
15. James O. Westgard, Ph.D. METHOD VALIDATION -THE REPLICATION EXPERIMENT
16. James O. Westgard, Ph.D. METHOD VALIDATION - REFERENCE INTERVAL TRANSFERENCE