

به نام خدا



صحہ گذاری روشهای کمی در آزمایشگاه



سخنران: اعظم کارخانه

مسئول دپارتمان بیوشیمی آزمایشگاه رفرانس تامین اجتماعی





صحه گذاري و تصديق



• صحه گذاري Validation

- تأييد از طريق فراهم آوردن شواهد عيني در مورد اين كه الزامات و يا خواسته ها براي استفاده مورد نظر يا کاربرد خاص برآورده شده اند

• تصديق Verification

- تأييد از طريق فراهم آوردن شواهد عيني در مورد اينكه الزامات و يا خواسته هاي مشخص شده، برآورده گرديده اند.



چه روش هایی نیازمند صحه گذاری هستند



۱. روش های ابداع شده توسط آزمایشگاه
۲. روش های استاندارد با تغییرات قابل توجه
۳. روش های استاندارد خارج از دامنه کاربرد مورد نظر
۴. بسط و اصلاح روش های استاندارد



ارزیابی اولیه در خصوص اقدامات مقدماتی برای فرآیند خرید و راه اندازی

- ۱. قیمت محصول و هزینه راه اندازی
- راحتی کار با آن
- میزان دسترسی به محصول
- دستی یا دستگاهی بودن روش
- نحوه کالیبراسیون و کنترل کیفی (باز یا بسته بودن سیستم)
- شرایط محیطی لازم
- میزان زمان لازم برای انجام آزمایش
- میزان زمان لازم برای آموزش
- فضای مورد نیاز برای انبارش
- نیاز به سرویس های خاص
- بررسی اولیه ویژگی های عملکردی



پارامترهای مورد بررسی



۱. بررسی دقت
۲. بررسی صحت
 - I. بازیابی
 - II. تداخل
۳. دامنه قابل گزارش
۴. دامنه مرجع
۵. حساسیت
۶. ویژگی



جدول آزمون های مورد استفاده برای برآورد انواع خطاهای آنالیتیک

آزمون ارزیابی		انواع خطاهای آنالیتیک
نهایی	مقدماتی	خطای تصادفی
دقت برون سنجی	دقت درون سنجی	
مقایسه روش ها	تداخل	خطای سیستماتیک ثابت
	بازیابی	خطای سیستماتیک نسبی



بررسی دقت



- الف) بررسی دقت داخل آزمایشگاهی

(Within Run imprecision)

- ب) مقایسه دقت دو روش آزمایشگاهی

(Between assay imprecision)

- ج) عدم دقت بین سری های ساخت متفاوت

(Between Lot imprecision)



بررسی دقت

❖ برای بررسی دقت یک روش از چه آزمونی استفاده می شود؟

✓ آزمون تکرارپذیری

❖ چه نمونه یا نمونه هایی؟

✓ مواد استاندارد، مواد کنترلی تجاری و pooled serum

❖ چه غلظت یا غلظتهای؟

✓ بستگی به محدوده تصمیم گیری بالینی دارد.



ادامه...

❖ چه محاسبات آماری مورد نیاز است؟

✓ میانگین، انحراف معیار و ضریب پراکندگی

❖ چگونه نتایج را تفسیر نماییم؟

✓ ابتدا نتیجه حاصله بر حسب $CV\%$ را با ادعای سازنده کیت یا دستگاه مقایسه می نماییم.

✓ یا نتیجه حاصله را با CV مجاز آزمایشگاهی مقایسه می نماییم.



الف) عدم دقت داخل-دور (CV_w)



❖ اولین گام در صحنه گذاری روش، محاسبه عدم دقت داخل دور می باشد.

❖ نام دیگر آن تکرار پذیری یا Repeatability

❖ تعداد دفعات آزمایش: ۲۰ بار آزمایش در یک نمونه و در یک سری کاری



تکرارپذیری (Repeatability)

- نزدیکی میان نتایج تحت شرایط یکسان
- شرایط تکرارپذیر اندازه‌گیری شامل:
 - روش اجرایی اندازه‌گیری یکسان
 - اپراتور یکسان
 - سیستم اندازه‌گیری یکسان
 - شرایط عملیاتی یکسان
 - و مکان یکسان بوده
 - دوره زمانی کوتاه بر روی نمونه‌های یکسان یا مشابه



محاسبات مورد نیاز

• محاسبه SD_w و CV_w

$$SD_w = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n - 1}} \quad , \quad \%CV_w = \frac{SD_w}{\bar{X}} * 100$$

• معیار مقبولیت:

$$CV_w \leq 0.25 \times TE_a$$



(ب) عدم دقت بین – دور (CVb)



- داده های لازم برای محاسبه این پارامتر، طی ۲۰ دور یا روز کاری جمع آوری می شود.

• تجدید پذیری (Reproducibility)

- نزدیکی میان نتایج تحت شرایط تغییر یافته
- شرایط تجدیدپذیر اندازه گیری شامل:

■ مکان های متفاوت

■ اپراتورهای متفاوت

■ و سیستم های اندازه گیری متفاوت





محاسبات مورد نیاز

• محاسبه SD_b و CV_b

$$SD_b = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

$$\%CV_b = \frac{SD_b}{\bar{X}} \times 100$$



محاسبه عدم دقت توتال CV_T

16

$$SD_T = \sqrt{SD_W^2 + SD_b^2}$$

$$CV_T \leq 0.33 \times TE_a$$



نمونه ای از بررسی دقت

آزمایشگاهی برای اندازه گیری سدیم دستگاه فلیم فتومتر خریداری و کنترل تجاری را ۲۰ بار مورد آزمایش قرار داده و نتایج زیر را بدست آورده است :

روز پنجم	روز چهارم	روز سوّم	روز دوم	روز اول
۱۲۸	۱۲۴	۱۲۹	۱۳۲	۱۳۲
۱۲۸	۱۲۶	۱۲۹	۱۴۳	۱۲۳
۱۳۲	۱۳۲	۱۲۷	۱۳۲	۱۳۲
۱۲۹	۱۲۳	۱۳۲	۱۳۲	۱۲۵



ادامه...

- Mean= 129.5
- Sd= 4.5
- CV%= 3.4

▪ آیا دقت دستگاه مورد تایید است؟

- $\% CV_a = 0.76$



ادامه...



روز اول	روز دوم	روز سوم	روز چهارم	روز پنجم
۱۳۲	۱۳۰	۱۳۲	۱۳۱	۱۳۰
۱۳۱	۱۳۲	۱۳۰	۱۳۲	۱۳۰
۱۲۹	۱۳۱	۱۳۱	۱۳۲	۱۳۲
۱۳۱	۱۳۲	۱۳۲	۱۳۲	۱۳۰

❖ Mean= 131.1

❖ Sd=0.97

❖ CV%= 0.73



ج) مقایسه دقت دو روش آزمایشگاهی



Between-assay imprecision ❖

❖ آزمون مورد استفاده: آزمون F-test

❖ روش انجام آزمون:

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

❖ تفسیر: $F_{\text{calculated}} \leq F_{\text{critical}}$



مثال

➤ برای مقایسه تکرارپذیری ۲ نوع کیت اندازه گیری قند، میزان قند یک سرم کنترل ۲۰ مرتبه با کیت A و کیت B سنجیده شد. کدام کیت از تکرار پذیری بهتری برخوردار است؟ آیا تفاوت آماری در دقت اندازه گیری این دو کیت وجود دارد؟

97	98	96	79	79
94	89	93	97	86
93	87	89	95	88
97	76	88	98	89

کیت A

90	78	98	63	98
88	89	87	96	96
90	95	89	95	98
88	76	92	76	90

کیت B



ادامه...



	کیت A	کیت B
mean	90.4	87.1
SD	6.65	10.35
CV	7.4	11.9

$$F = \frac{(10.35)^2}{(6.65)^2} \quad F = 2.42$$

با مراجعه به جدول F مقدار F بحرانی برای 20 بار تکرار معادل 2.23 بدست می‌آید. نظر به اینکه عدد F در محاسبات آماری آزمایشگاه 2.42 بوده که بیشتر از 2.23 است، اختلاف موجود در تکرارپذیری دو روش معنی‌دار است.



جدول $F_{95\%}$

23

df2/df1	12	15	20	24	30	40	60	120	∞
1	243.9060	245.9499	248.0131	249.0518	250.0951	251.1432	252.1957	253.2529	254.3144
2	19.4125	19.4291	19.4458	19.4541	19.4624	19.4707	19.4791	19.4874	19.4957
3	8.7446	8.7029	8.6602	8.6385	8.6166	8.5944	8.5720	8.5494	8.5264
4	5.9117	5.8578	5.8025	5.7744	5.7459	5.7170	5.6877	5.6581	5.6281
5	4.6777	4.6188	4.5581	4.5272	4.4957	4.4638	4.4314	4.3985	4.3650
6	3.9999	3.9381	3.8742	3.8415	3.8082	3.7743	3.7398	3.7047	3.6689
7	3.5747	3.5107	3.4445	3.4105	3.3758	3.3404	3.3043	3.2674	3.2298
8	3.2839	3.2184	3.1503	3.1152	3.0794	3.0428	3.0053	2.9669	2.9276
9	3.0729	3.0061	2.9365	2.9005	2.8637	2.8259	2.7872	2.7475	2.7067
10	2.9130	2.8450	2.7740	2.7372	2.6996	2.6609	2.6211	2.5801	2.5379
11	2.7876	2.7186	2.6464	2.6090	2.5705	2.5309	2.4901	2.4480	2.4045
12	2.6866	2.6169	2.5436	2.5055	2.4663	2.4259	2.3842	2.3410	2.2962
13	2.6037	2.5331	2.4589	2.4202	2.3803	2.3392	2.2966	2.2524	2.2064
14	2.5342	2.4630	2.3879	2.3487	2.3082	2.2664	2.2229	2.1778	2.1307
15	2.4753	2.4034	2.3275	2.2878	2.2468	2.2043	2.1601	2.1141	2.0658
16	2.4247	2.3522	2.2756	2.2354	2.1938	2.1507	2.1058	2.0589	2.0096
17	2.3807	2.3077	2.2304	2.1898	2.1477	2.1040	2.0584	2.0107	1.9604
18	2.3421	2.2686	2.1906	2.1497	2.1071	2.0629	2.0166	1.9681	1.9168
19	2.3080	2.2341	2.1555	2.1141	2.0712	2.0264	1.9795	1.9302	1.8780



ج) عدم دقت بین سری های ساخت متفاوت (Between-lot Imprecision)

24

- هدف: مشخص کردن تفاوت از یک سری ساخت به سری ساخت دیگر
- روش بررسی: محاسبه فاصله اطمینان یا Confidence Interval برای هر دو کیت
- محاسبه CI:

$$CI = \bar{X} \pm 1.96 \times SEM$$

$$SEM = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

معیار بررسی: عدم همپوشانی بین این دو محدوده نشانده عدم تشابه بین این دو سری ساخت می باشد.



بررسی صحت (Accuracy)



- استفاده از مواد مرجع یا استاندارد
- آزمون مقایسه روشها (Comparison method)
- استفاده از نتایج ارزیابی خارجی کیفیت
- استفاده از میانگین نتایج آزمایشگاههای هم-گروه (Peer Group)
- آزمون ریکاوری
- آزمون تداخل



آزمون مقایسه روش ها

- در این آزمون، خطای سیستماتیک بر اساس تفاوت بین نتایج بیماران بین دو روش جدید و روش مورد مقایسه تخمین زده می شود.
- نکته: در این ارزیابی، انتخاب روش به عنوان روش مقایسه ای بسیار مهم است.
- روش قطعی (Definite Method)
- روش مرجع (Reference Method)
- روش مقایسه ای (Comparative Method)



چنانچه روش مقایسه ای یک روش مرجع باشد، می توان اختلاف بین نتایج اندازه گیری را به عنوان Bias روش مورد بررسی در نظر گرفت. اما چنانچه مرجع نباشد این اختلاف نمایانگر میزان درستی روش مورد نظر نیست و تنها اختلاف نتایج را می توان به عنوان میزان عدم توافق بین دو روش در نظر گرفت.



روش محاسبه خطا در سطح تصمیم گیری بالینی



- محاسبه خطای سیستماتیک: $(SE = Y_c - X_c)$
- محاسبه $Bias\% = SE * 100 / X_c$
- با استفاده از فرمول $Y_c = a + bX_c$ در آزمون مقایسه روشها می توان پارامترهای فوق را محاسبه نمود.



آزمون T- student برای نمونه های جفتی

- نتایج مربوط به آزمون t بر اساس ۵ نمونه که دو روز متوالی در هموگلوبین بررسی شده اند، در جدول نمایش داده شده است. آیا نتایج بدست آمده با یکدیگر متفاوتند؟ (با سطح معنی داری ۵٪)

n	Hb روز اول	Hb روز دوم
۱	۱۳۵	۱۳۸
۲	۱۴۲	۱۳۹
۳	۱۵۱	۱۴۹
۴	۱۳۱	۱۳۰
۵	۱۲۷	۱۲۴



ادامه...



n	Hb روز اول	Hb روز دوم	d	d ²
۱	۱۳۵	۱۳۸	-۳	۹
۲	۱۴۲	۱۳۹	۳	۹
۳	۱۵۱	۱۴۹	۲	۴
۴	۱۳۱	۱۳۰	۱	۱
۵	۱۲۷	۱۲۴	۳	۹
Σ			۶	۳۲

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

$$Sd = \sqrt{\frac{\sum d^2 - \frac{(\sum d)^2}{n}}{n-1}}$$

$$\bar{d} = \frac{6}{5} = 1.2$$

$$sd = \sqrt{\frac{32 - \frac{(6)^2}{5}}{4}} = 2.49$$

$$t_n = \frac{1.2}{2.49} \sqrt{5} = 1.079$$

$$t_t = 2.78$$

$$t_n < t_t$$



آزمون مقایسه روشها

❖ هدف:

- ✓ بررسی خطای سیستماتیک یا عدم صحت
- ❖ نمونه های مورد استفاده
- ✓ نمونه های بیماران
- ❖ غلظت آنالیت در چه غلظت یا غلظت های باید انتخاب شود؟
- ✓ در دامنه قابل گزارش
- ❖ روش جدید با چه روشی باید مقایسه گردد؟
- ✓ روش مرجع
- ✓ روش رایج آزمایشگاهی
- ❖ محدوده زمانی آزمون
- ✓ ۵ روز، روزانه ۸ نمونه



آزمون مقایسه روش ها

❖ تعداد نمونه ها:

✓ حداقل ۴۰ نمونه بیمار

✓ نمونه ها باید محدوده قابل گزارش روش را پوشش دهند.

✓ کیفیت نمونه ها از تعداد آنها مهم تر است . ۲۰ نمونه ای که با دقت انتخاب شده اند از ۱۰۰ نمونه ای که بصورت تصادفی انتخاب شده اند مفید ترند.

✓ تعداد زیاد نمونه (۱۰۰ الی ۲۰۰) برای ارزیابی تشابه ویژگی یک روش جدید با روش مرجع یا متداول ، توصیه می شود.



ادامه...



➤ بطور معمول هر نمونه یک بار با هر دو روش آزمایش می شوند. نتایج در زمان جمع آوری داده ها باید بررسی گردند و نمونه هایی با اختلاف زیاد، شناسایی و در همان زمان تکرار شوند.

➤ اندازه گیری دوتایی شامل اندازه گیری بر روی دو کپ متفاوت در ترتیب مختلف با هر دو روش است که به نوعی تکرارپذیری روش را نیز چک می کند.

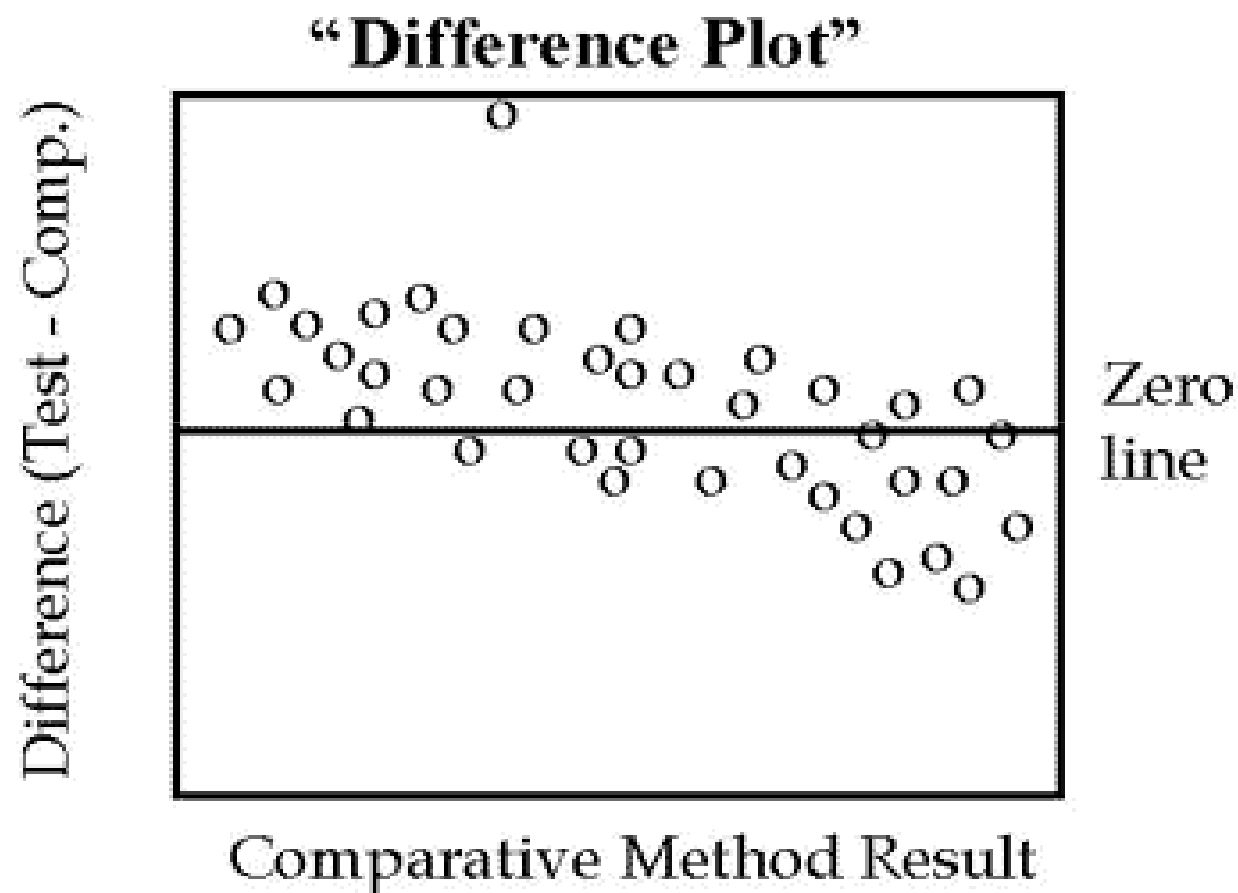
➤ نمونه ها باید در طی ۲ ساعت با هر دو روش مورد سنجش قرار گیرد، مگر آن که پایداری نمونه به جهت اندازه گیری هایی نظیر آمونیاک و لاکتات کوتاه مدت باشد.



- هدف از نمودار های اولیه داده ها، مشخص نمودن نتایج پرت است که تا زمانی که نمونه ها هنوز در دسترس هستند، بتوان آنها را مورد سنجش مجدد قرار داد.
- در صورتی که هر دو روش دارای توافق یک به یک باشند از نمودار اختلافات استفاده می شود. (difference plot)
- برای روش هایی که انتظار نمی رود تا توافق یک به یک داشته باشند نظیر آنالیت های آنزیمی، این نمودار باید بصورت نمودار مقایسه ای ترسیم گردد. (comparison plot)



نمودار اختلافات

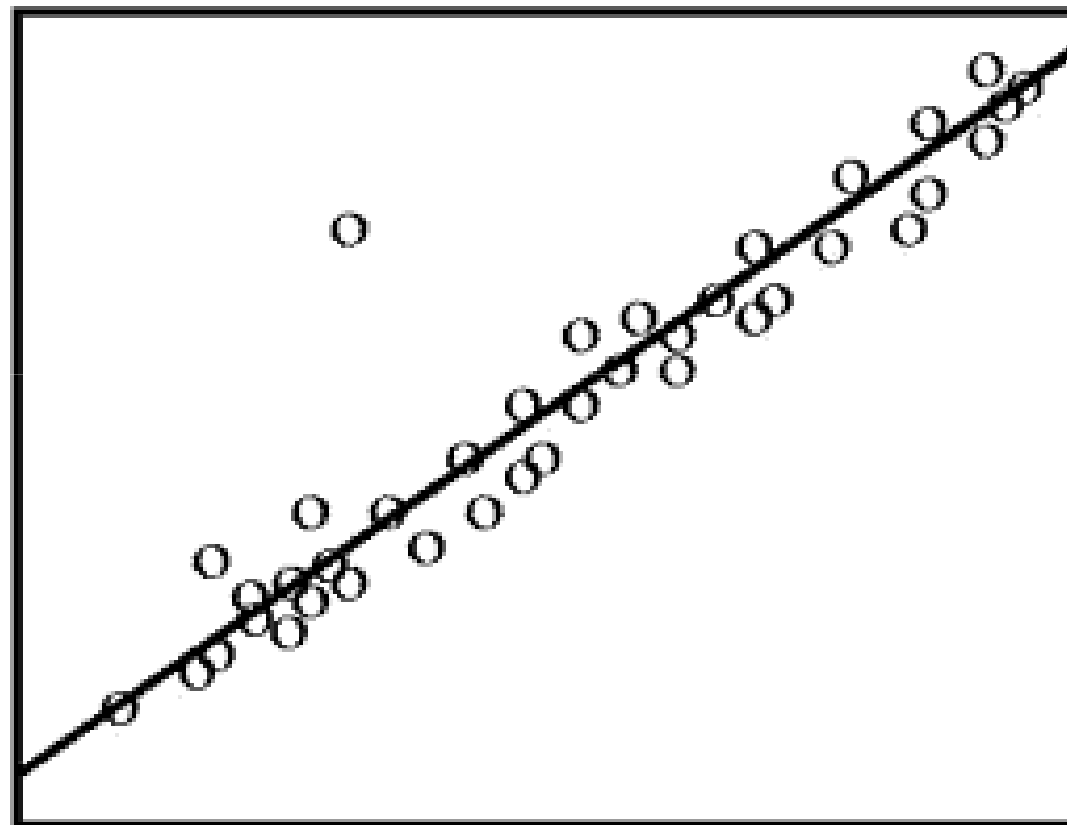




نمودار مقایسه ای

“Comparison Plot”

Test Method Result



Comparative Method Result



آزمون مقایسه روش ها - محاسبات



➤ محاسبات آماری بمنظور تعیین مقادیر خطای سیستماتیک بهتر است در محدوده تصمیم گیری بالینی انجام شود.

➤ از فرمول رگرسیون خطی استفاده می کنیم.

$$Y_c = a + bX_c$$

$$SE = Y_c - X_c$$

Intercept

slope



مثال

❖ در مطالعه مقایسه ای کلاسترول خط رگرسیون حاصل از داده ها به شکل زیر است :

$$Y = 2 + 1.03 X$$

مقدار Y در سطح بحرانی 200 برابر :

$$Y = 2 + 1.03 \times 200 = 208$$

پس خطای سیستماتیک در سطح بحرانی 200 برابر **8** میلی گرم در صد است.



آزمون مقایسه روش ها - ضریب همبستگی (r)

- از r برای ارزیابی کفایت دامنه برای برآورد مناسب شیب خط و عرض از مبدا استفاده می شود بطوریکه:
- اگر $r \geq 0.99$ است یعنی داده های موجود جهت برآورد شیب خط و عرض از مبدا کفایت می کند.
- اگر $r \leq 0.975$ است بهتر است از داده های اضافی جهت افزایش دامنه غلظتی استفاده گردد و از محاسبات t -test برای برآورد خطای سیستماتیک بر مبنای میانگین داده ها استفاده نمود.



تفسیر آزمون

➤ خطای مجاز خود را تعیین نمایید (TE_a).

➤ خطای کلی آنالیتکال روش خود را محاسبه نمایید.

$$TE_c = SE + RE \quad TE_c = \text{bias} + 3SD$$

➤ انحراف معیار روش با استفاده از آزمون تکرار پذیری و bias بین میانگین ها با

استفاده از آزمون مقایسه ای بدست می آید

➤ معیار مقبولیت: $TE_c < TE_a$



مهمترین عوامل مسبب عدم صحت



➤ مواد مداخله گر

- الف (ماده مداخله گر از جنس آنالیت مورد سنجش نیست نظیر: همولیز ، لیپمی ،
بیلروبینمی ، نگهدارنده ها، ضد انعقاد ها
- ب (ماده مداخله گر از جنس آنالیت مورد سنجش است.



آزمون تداخل

❖ هدف:

✓ برآورد خطای سیستماتیک ثابت

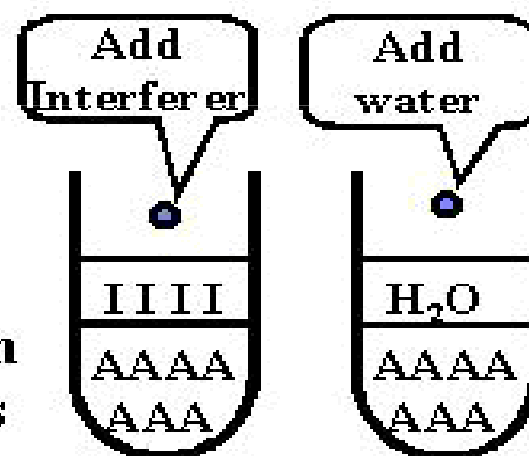
۱. تهیه نمونه

The Interference Experiment

**Prepare
pairs of test
samples**

**Measure A in
both samples**

**Calculate
difference**



7A

7A

$$7A - 7A = 0 \text{ bias}$$



ادامه...



۲. اندازه گیری نمونه ها بصورت دوپلیکه و سپس محاسبه میانگین آنها
 ۳. محاسبه اختلاف بین دو گروه خوانده (نمونه حاوی مداخله گر و نمونه پایه)
 ۴. بررسی معیار مقبولیت.
- برای این منظور از حدّ بالایی دامنه مرجع آنالیت مربوطه استفاده می شود.



مثال: آزمون تداخل برای گلوکز



sample	Rep 1	Rep 2	Average 1,2	Difference between paired samples
A + I	110	112	111	11
A + dilution	98	102	100	
B + I	106	108	107	13
B + dilution	93	95	94	
C + I	94	98	96	14
C + dilution	80	84	82	

Average interference= 12.7



بررسی معیار مقبولیت

حدّ بالایی دامنۀ مرجع گلوکز معادل 110mg/dl است.

خطای کلی مجاز گلوکز بر اساس 10% CLIA می باشد که برحسب غلظت در این محدوده معادل 11mg/dl است.

قابل قبول

❑ خطای کلی مجاز < خطای ثابت محاسبه شده ←

غیر قابل قبول

❑ خطای کلی مجاز > خطای ثابت محاسبه شده ←



مثالی از آزمون تداخل

- داده های صحه گذاری روش کلسترول: آزمون تداخل (با استفاده از برآورد خطای سیستماتیک ثابت)

Patient specimen	Base line sample 0.9 ml specimen + 0.1 ml saline				Spiked sample 0.9 ml specimen + 0.1 Bili standard			
	Result 1	Result 2	Result 3	Result 4	Result 1	Result 2	Result 3	Result 4
1	206	213	223	215	221	222	230	229
2	220	228	223	210	233	241	228	237
3	299	287	297	297	306	304	302	296
4	169	171	167	178	186	184	181	183
5	250	248	257	252	242	265	271	262
6	227	221	224	230	236	229	237	242



ادامه...

Patient sample	base	spiked	Diff(Spiked – base)
1	214.25	225.50	11.25
2	220.25	234.75	14.50
3	295.00	302.00	7.00
4	171.25	183.50	12.25
5	251.75	260.00	8.25
6	225.50	236.00	10.50

- $\text{Mean}_d = 10.63$
- $\text{TEa} = 200 * 10\% = 20$



آزمون بازیابی Recovery

❖ هدف:

✓ تخمین خطای سیستماتیک نسبی

❖ علت ایجاد خطا

✓ وجود ماده ای در ماتریکس نمونه که با آنالیت در واکنش با معرف رقابت نموده و با افزایش غلظت آنالیت، افزایش می یابد.



روش اجرای آزمون بازیابی

تهیه نمونه ➤

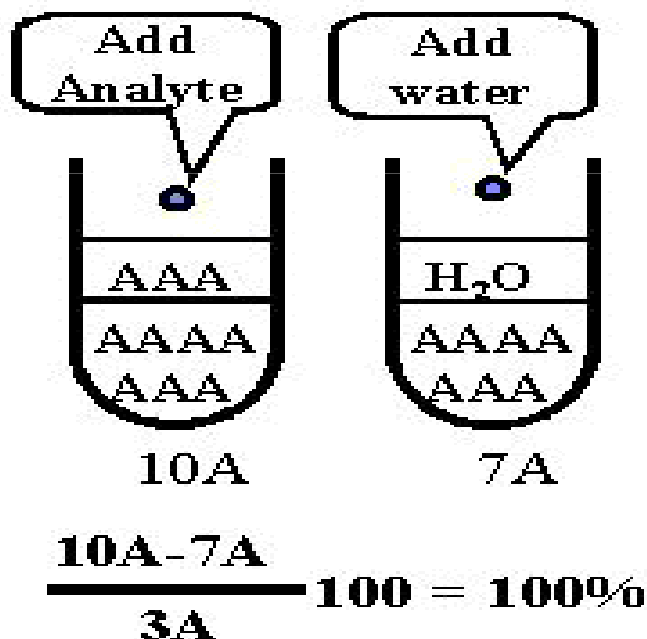
The Recovery Experiment

**Prepare pairs
of test samples**

**Calculate
A added**

**Measure A in
both samples**

**Calculate %
recovery**





محاسبات مورد نیاز

۱. غلظت آنالیتی را که به نمونه اضافه کرده‌اید با استفاده از فرمول زیر محاسبه نمایید.

$$\text{غلظت استاندارد} \times \left(\frac{\text{حجم استاندارد}}{\text{حجم نمونه} + \text{حجم استاندارد}} \right) = \text{غلظت آنالیت افزوده شده}$$



ادامه...



۲. هر نمونه را بصورت دوبلیکه اندازه گیری کرده و میانگین آنها را محاسبه نمایید.
۳. اختلاف بین میانگین نمونه محتوی رقیق کننده با میانگین نمونه محتوی استاندارد را بدست آورید.

Sample A addition - Sample A dilution

۴. میزان بازیابی را برای هر نمونه با استفاده از فرمول زیر محاسبه نمایید.

$$\text{میزان بازیابی} = \frac{\text{اختلاف میانگین محتوی رقیق کننده و میانگین محتوی استاندارد}}{\text{میزان ماده اضافه شده}} \times 100$$



ادامه...



۵. معدل بازیابی کلیه نمونه ها را بدست آورید.

۶. میزان خطای نسبی را محاسبه نمایید.

۷. بررسی معیار مقبولیت



مثال: آزمون بازیابی برای آنالیت کلسیم

۱. محاسبه غلظت آنالیت اضافه شده.

با افزودن 0.1 ml استاندارد 20 mg/dL کلسیم به 1.0 ml سرم، مقدار

اضافه شده برابر خواهد بود با:

$$\text{غلظت استاندارد} \times \left(\frac{\text{حجم استاندارد}}{\text{حجم نمونه} + \text{حجم استاندارد}} \right) = \text{غلظت آنالیت افزوده شده}$$

$$\left[\frac{0.1}{(0.1 + 1.0)} \right] * 20 = 1.82 \text{ mg/dl}$$



۲. آماده سازی نمونه ها و اندازه گیری دوبل



	addition (0.1 ml St + 1.0 ml serum)		Dilution (0.1 ml DW + 1.0 ml serum)	
	Result 1	Result 2	Result 1	Result 2
Sample A	11.4	11.6	11.2	11.0
Sample B	9.7	9.9	9.5	9.5



ادامه....

	addition (0.1 ml St + 1.0 ml serum)			Dilution (0.1 ml DW + 1.0 ml serum)		
	Rep 1	Rep 2	Mean	Rep 1	Rep 2	Mean
Sample A	11.4	11.6	11.5	9.7	9.9	9.8
Sample B	11.2	11.0	11.1	9.5	9.5	9.5

Sample A addition - Sample A dilution= 1.7

Sample B addition - Sample B dilution= 1.6



۴. محاسبه میزان بازیابی و میانگین آن

$$\text{A. } (1.7 \text{ mg/dl} / 1,82 \text{ mg/dl}) \times 100 = 93.4$$

$$\text{B. } (1.6 \text{ mg/dl} / 1,82 \text{ mg/dl}) \times 100 = 87.9$$

میانگین بازیابی:

$$[(93.4 + 87.9) / 2] = 90.6$$



۵. محاسبه میزان خطای نسبی و بررسی مقبولیت اجرا

❖ میزان خطای نسبی برابر است با:

$$100 - 90.6 = 9.4\% \checkmark$$

❖ بررسی معیار مقبولیت:

✓ مقایسه خطای مشاهده شده با میزان خطای مجاز مربوطه.

➤ معیار CLIA برای کلسیم، معادل 1 mg/dl است که بر حسب درصد برای حدّ میانی دامنه مرجع کلسیم که تقریباً 10 mg/dl است معادل 10% است.

قابل قبول

غیر قابل قبول

خطای مجاز < خطای نسبی محاسبه شده

خطای مجاز > خطای نسبی محاسبه شده



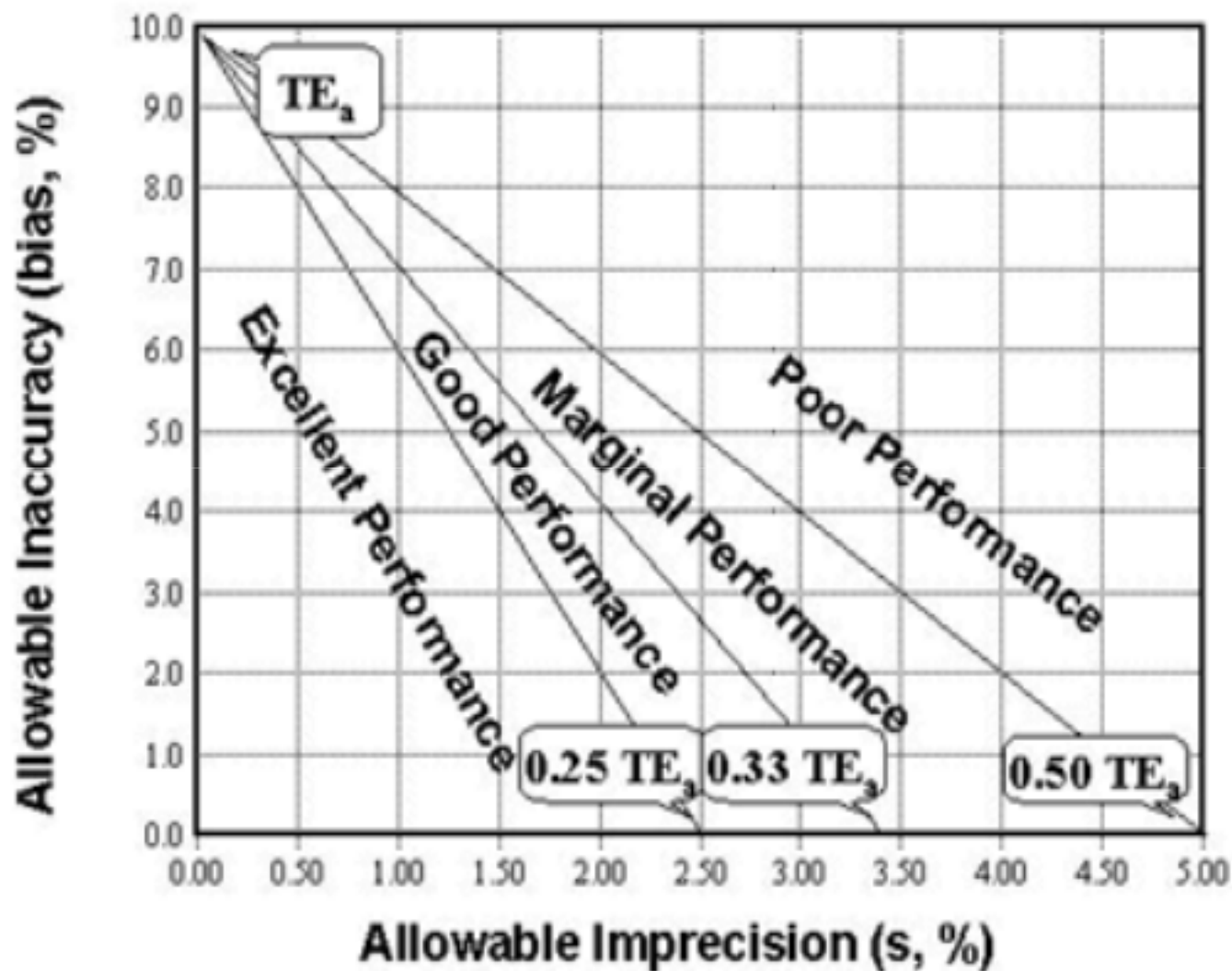
تصمیم گیری در مورد نتایج ارزیابی روش

- برای تصمیم گیری در مورد یک روش آزمایشگاهی باید مقادیر حاصله از آزمون های عدم دقت وعدم صحت را با خطای مجاز مقایسه نمود.

$$\text{bias} + 2\text{SD} < \text{TEa}$$

$$\text{bias} + 3\text{SD} < \text{TEa}$$

$$\text{bias} + 4\text{SD} < \text{TEa}$$

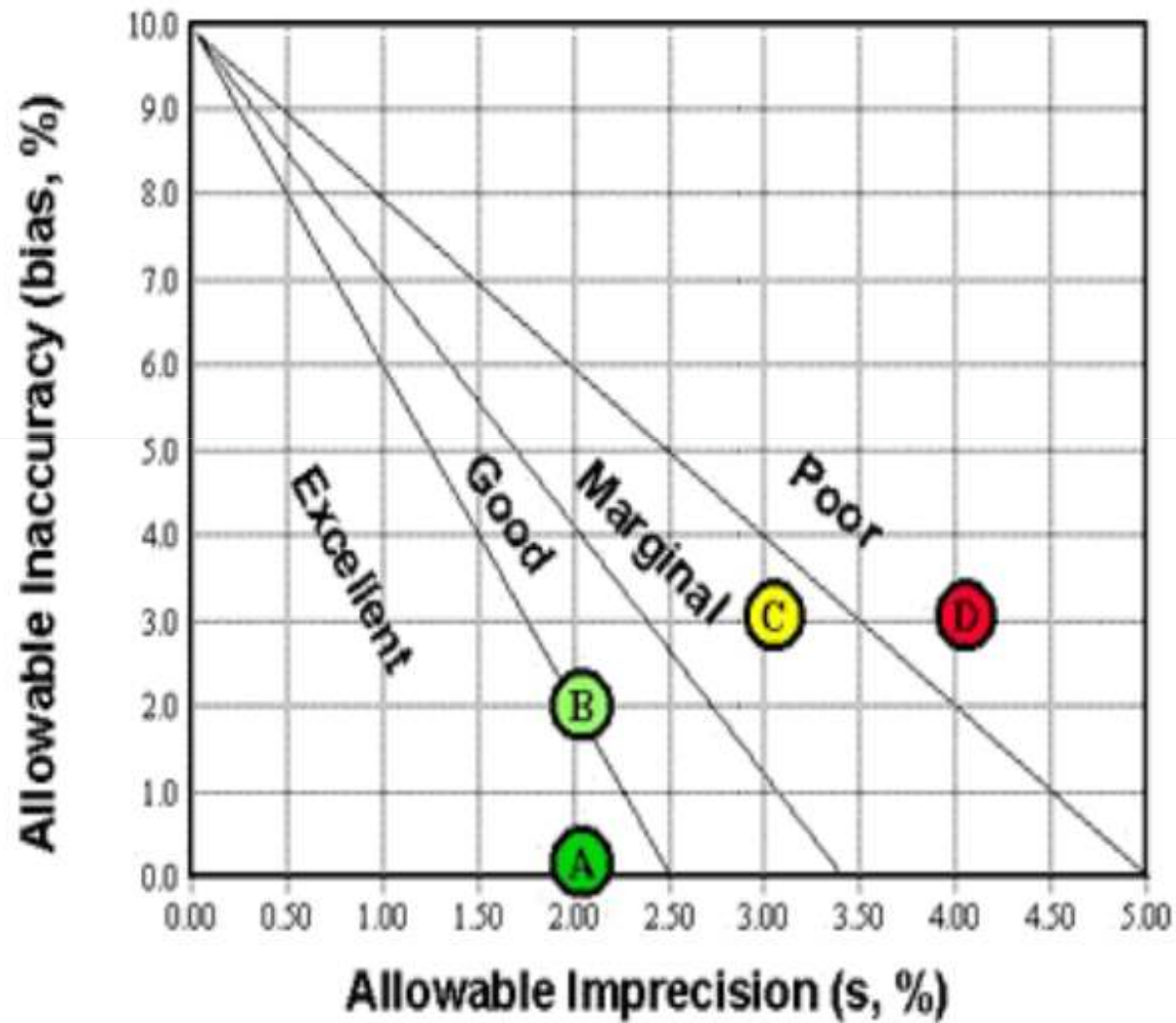




نمایش عملکرد ۴ کیت سنجش کلسترول



- A: کیت اندازه گیری کلسترول که $\% CV$ آن ۲٪ و $\% bias$ آن معادل ۰٪ است.
- B: در کیت دوم $\% CV$ برابر ۲٪ و $\% bias$ معادل ۲٪ است.
- C: کیت سوم $\% CV$ برابر ۳٪ و $\% bias$ معادل ۳٪ دارد که معیارهای NCEP می باشد.
- D: کیت سوم $\% CV$ برابر ۴٪ و $\% bias$ معادل ۳٪ دارد.





محدوده قابل گزارش

➤ دامنه قابل گزارش عبارتست از کمترین و بیشترین نتیجه ای که با این روش قابل اندازه گیری است.

❖ آزمون مورد استفاده:

✓ آزمون خطی بودن یا **Linearity**

➤ نمونه مورد استفاده:

➤ محلولهای استاندارد با غلظتهای مختلف و مشخص

➤ رقت های مشخص از یک نمونه با غلظت بالا

□ استفاده از رقیق کننده مناسب (نمونه سرم با غلظت پایین یا **D.W** و نرمال سالین)



مراحل اجرا



- ۱- اطمینان از کالیبراسیون دستگاه
- کالیبراسیون باید حداقل هر ۶ ماه یک بار مورد تایید قرار گیرد.
- ۲- اجرای آزمون خطی بودن
- ۳- رسم نمودار مقایسه ای
- ۴- بررسی معیار مقبولیت



طرز تهیه سریال رقت ها



- نمونه H
- ۳ قسمت H و ۱ قسمت L (رقت $3/4$)
- ۲ قسمت H و ۲ قسمت L (رقت $1/2$)
- ۱ قسمت H و ۳ قسمت L (رقت $1/4$)
- نمونه L

➤ تعداد تکرار اندازه گیری ها:

CLSI توصیه می کند که برای هر نمونه ۴ اندازه گیری صورت پذیرد ولی بطور کلی ۳ تکرار کافی است.



تعیین نتایج مورد انتظار

➤ اگر غلظت نمونه L با C1 و غلظت نمونه H با C5 مشخص گردد، سایر غلظت های مورد انتظار در هر رقت با در نظر گرفتن لزوم یکسان بودن واحدهای غلظت و حجم، با استفاده از فرمول زیر محاسبه می گردد.

$$\text{concentration} = \frac{C_h V_h + C_l V_l}{V_h + V_l}$$

➤ بعد از تهیه، نمونه ها را باید خوب مخلوط کرده و از تبخیر و سایر موارد موثر بر کیفیت نمونه محافظت نمود.



مثالی برای تهیه رقت ها مختلف

$$H = 300 \text{ mg/dl}$$

$$\frac{3}{4} = \frac{(300 \times 0.3 + 40 \times 0.1)}{0.3 + 0.1} = 235$$

$$\frac{1}{2} = \frac{(300 \times 0.2 + 40 \times 0.2)}{0.2 + 0.2} = 170$$

$$\frac{1}{4} = \frac{(300 \times 0.1 + 40 \times 0.3)}{0.1 + 0.3} = 105$$

$$L = 40 \text{ mg/dl}$$



مثال: آزمون خطی بودن برای آنالیت کلسترو



	Rep 1	Rep 2	Rep 3
St 0	0	5	10
St 100	95	100	105
St 200	195	200	205
St 300	290	300	310
St 400	380	390	400
St 500	470	460	480



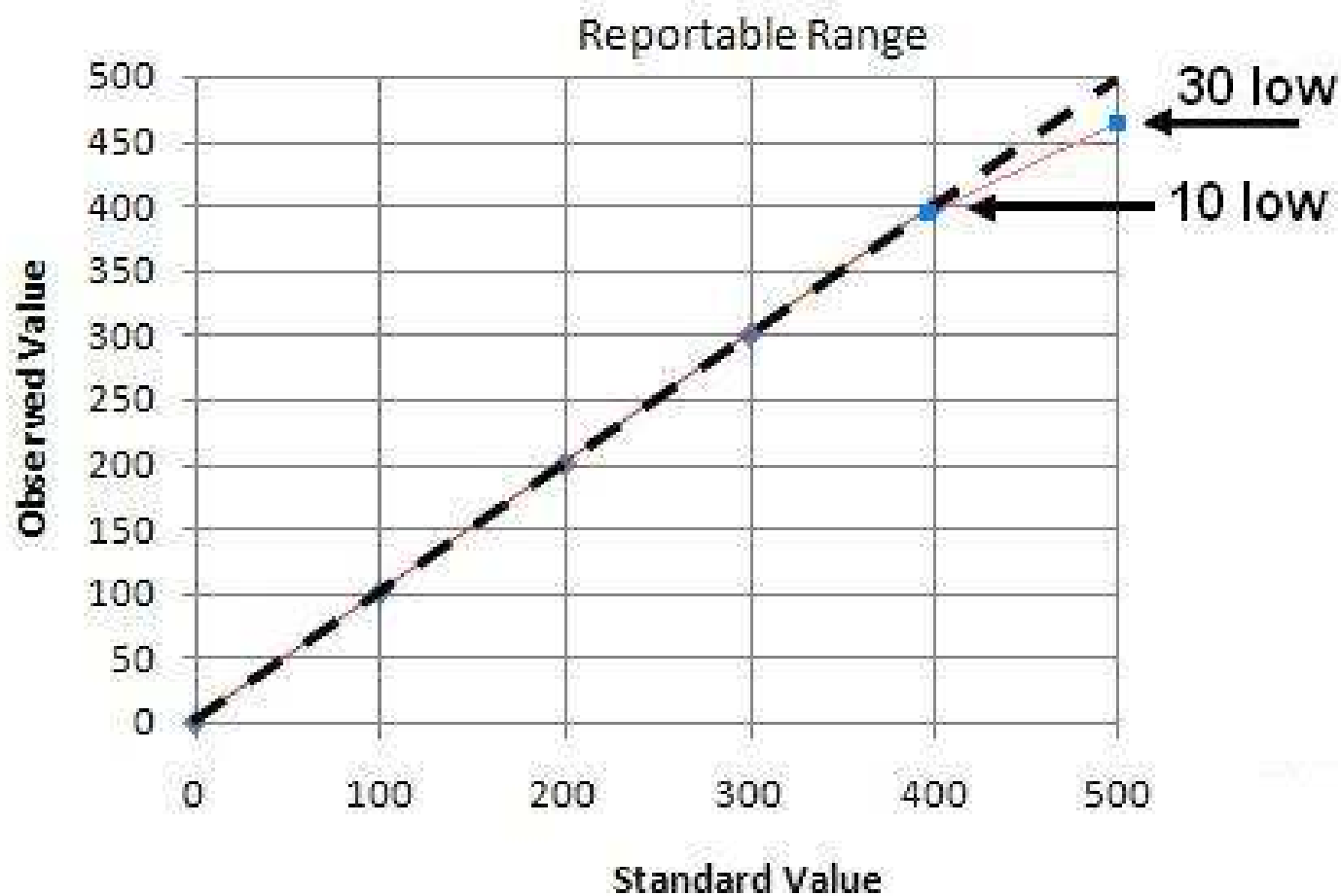
مثال: آزمون خطی بودن برای آنالیت کلسترو



	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Mean
St 0	0	5	10	5
St 100	95	100	105	100
St 200	195	200	205	200
St 300	290	300	310	300
St 400	380	390	400	390
St 500	470	460	480	470



رسم نمودار





سوال

الف (آیا محدوده گزارش دهی تا غلظت 500 mg/dl میتواند
گسترش یابد ؟

ب) تا غلظت 400 mg/dl چطور؟



پاسخ سوال الف

➤ $cv_a = 3\%$ برای کسترویل، SD در غلظت ۵۰۰ mg/dl برابر ۱۵ mg/dl خواهد شد:

$$CV = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

➤ برآورد خطای تصادفی $2SD = 30 \text{ mg/dl}$ است.

$$TE = \text{sys error} + \text{rand error} \quad \text{or} \quad TE = \text{Bias} + 2SD$$

$$TE = (500 - 470) + (2 \times 15) = 30 + 30 = 60$$

➤ خطای کلی مجاز کسترویل ۱۰٪ است که در غلظت ۵۰۰ معادل ۵۰ mg/dl می باشد.

➤ چون $50 < 60$ است پس محدوده قابل گزارش باید تا حدی محدود گردد که از خطای کلی مجاز

(در اینجا ۵۰) بیشتر نباشد.



پاسخ سوال ب

➤ $cv_a = 3\%$ برای کلسترول، SD در غلظت 400 mg/dl برابر 12 mg/dl خواهد شد.

➤ برآورد خطای تصادفی : $2SD = 24 \text{ mg/dl}$ است.

➤ $TE = \text{sys error} + \text{rand error}$ or $TE = \text{Bias} + 2SD$

➤ $TE = (400 - 390) + (2 \times 12) = 10 + 24 = 34$

➤ خطای کلی مجاز کلسترول 10٪ است که در غلظت 400 معادل 40 mg/dl می باشد.

➤ چون $50 > 34$ است پس محدوده قابل گزارش باید تا حدی محدود گردد که از خطای کلی مجاز) در

اینجا 50) بیشتر نباشد. پس منطقه مربوط به mg/dl در محدوده قابل گزارش محسوب می گردد.



بررسی محدوده مرجع



- محدوده مرجع، توصیفی از میزان آنالیت مورد نظر در یک جمعیت سالم است. این محدوده ۹۵٪ مقادیر را شامل می شود. محدوده بالایی و پایینی مرجع، مرزهای این دامنه را نمایش می دهند. نتایج خارج از این محدوده، معمولاً بعنوان "نتایج غیر طبیعی" مشخص می گردند.
- استقرار دامنه مرجع نیازمند طراحی دقیق، کنترل و مستند سازی کلیه جوانب مطالعه است (C28-A2).



صحه گذاري با ۲۰ نمونه



- در اين روش نمونه‌هاي ۲۰ فرد (جمعيت مرجع) كه داراي شرايط جغرافيايي و دموگرافيك مشابه با جمعيت مرجع روش قبل باشند، مورد اندازه گيري قرار ميگيرد .
- اگر حداكثردو نتيجه از نتايج حاصله در خارج از محدوده مرجع روش قبل قرار گيرد آزمایشگاه می تواند از آن محدوده مرجع برای روش جديد استفاده نماید .
- اگر بيش از دونتيجه خارج از محدوده مرجع قرار گيرد در اين صورت بايد ۲۰ فرد ديگر انتخاب شده و برروي آنان آزمایش انجام شود اگر مجددا بيش از ۲ نتيجه خارج از محدوده مرجع قرار گيرد، از اين محدوده مرجع نمی توان استفاده کرد و بايد برای روش اخير محدوده مرجع جديد تعيين گردد.



صحه گذاري با ۶۰ نمونه



- در اين روش بايد نتايج حاصله از اندازه گيري كميت خاص در ۶۰ فرد را با محدوده مرجع كيت قبل مقايسه نمود . سپس از طريق فرمول هاي آماري و مقايسه ميانگين ها و انحراف معيار ها، در صورتي كه تفاوت معني داري بين نتايج دو روش مشاهده شد بايد تعداد نمونه را افزايش داد و در صورتي كه تفاوت معني داري وجود نداشت مي توان از همان محدوده مرجع استفاده نمود.
- گاهي پيدا كردن ۶۰ نمونه فرد مرجع يك كار مشكل است. ليكن تعداد نمونه ها از ۴۰ عدد نبايد كمتر باشد.

با تشکر از توجه
شما

