صحه‌گذاری در بیوشیمی بالینی

Validation In Clinical Biochemistery

تهیه و تنظیم: دکتر مهرداد ونکی / مشاور و مدرس سیستم مدیریت کیفیت

مقدمه و تعاریف پایه:

درستی یا بایاس اندازه‌گیری Method Bias:

نزدیکی توافق بین میانگین مقادیر بدست آمده از نتایج چند سری اندازه‌گیری با مقدار واقعی آن کمیت می‌باشد.

تصدیق صحت اندازه‌گیری Bias Verification:

فرآیند و مراحلی که که جهت تأئید و تصدیق درستی تست‌های آزمایشگاه انجام می‌شود که شامل کاربرد کنترل صحت یا کالیبراتورها و تجهیزات و مواد مصرفی معتبر و کالیبر می‌باشد.

صحه‌گذاری Validation:

بخش مهمی از تضمین کیفیت می‌باشد که دستورالعمل‌های اجرائی و مراحل انجام تست را ارزیابی نموده و در نهایت اطمینان از کیفیت و اثربخشی و قابلیت اطمینان از تست را نشان می‌دهد.

کالیبراسیون Calibration:

فرآیند تنظیم تجهیزات و ابزار و تست‌ها جهت ایجاد نزدیکی و تطابق بین نتایج اندازه‌گیری شده و مقادیر واقعی را کالیبراسیون گویند.

تصدیق کالیبراسیون Calibration Verification:

تصدیق کالیبراسیون تجهیزات و روش‌ها با نمونه بیماران و نمونه‌های کنترل صحت و کالیبراتورها صورت می‌پذیرد تا قابلیت اطمینان در نتایج خروجی حاصل گردد.

کنترل عملکرد Function checks:

فعالیت‌ها و اقداماتی که اپراتور در راستای ارائه یک عملکرد قابل قبول بر روی ابزار و تجهیزات انجام می‌دهد نظیر کنترل عملکرد لامپ تجهیزات یا سیستم الکتریکی تجهیزات طی یک روش اجرائی معین.

مواد تداخل دهنده Interfering substances:

مواد و معرف‌ها و مواد شیمیائی که در روند آزمایش تولید تداخل نموده و منجر به افزایش یا کاهش کاذب آنالیت‌های مورد سنجش می‌گردد (مثال تداخل بیلی‌روبین و هموگلوبین و تری‌گلیسرید و اسید اسکوربیک در واکنش‌های فتومتری یا رنگ‌سنجی که بسیار شایع بوده و میزان اثر تداخلی بر حسب درصد تداخل در واکنش اصلی در بروشور کیت های بیوشیمی ارائه و اطلاع رسانی می‌گردد)

خطی بودن Linearity:

خطی بودن در یک روش اندازه‌گیری تست به معنای محدوده خطی غلظت‌های مختلف یک آنالیت مورد اندازه‌گیری می‌باشد.

کنترل Control:

کنترل ماده‌ای است که حاوی مقادیر معینی از آنالیت‌های آزمایشگاهی بوده که جهت تائید صحت و دقت آزمایشات کاربرد دارد.

قابلیت ردیابی Tracebility:

قابلیت ارتباط دادن یک استاندارد یا نتیجه یک اندازه‌گیری با مراجع ملی یا بین‌المللی ازطریق زنجیره پیوسته‌ای از مقایسه‌ها که همگی عدم قطعیت معینی دارند.

عدم قطعیت اندازه‌گیری Uncertainity:

پارامتری وابسته به نتیجه یک اندازه‌گیری که میزان پراکندگی مقادیر را بطور منطقی در ارتباط با "اندازه" مشخص می‌کند.

کالیبراتور calibrator:

1. موادی که جهت تنظیم کالیبر یک دستگاه آزمایشگاهی / یک کیت / یک تست به کار می‌رود.
2. کالیبراتور ها دارای غلظت‌های معین از مواد اندازه‌گیری شده به روش رفرانس می‌باشند.
3. کالیبراتورها گاهی استاندارد نامیده می‌شوند؛ اگرچه در واقع یک استاندارد واقعی نمی‌باشند.

کالیبراتورها از نوع کنترل نمی‌باشند و تحت هیچ عنوان کنترل‌ها نبایستی به عنوان کالیبراتور مورد استفاده قرار گیرند.

کنترل چیست؟

کنترل ماده‌ای است که حاوی مقادیر معینی از آنالیت‌های آزمایشگاهی بوده و به دو شکل تجاری و دست‌ساز وجود دارد. کنترل الزاماً بایستی همراه با نمونه‌های بیماران در هر ردیف کاری استفاده گردد. کنترل‌ها جهت ایجاد قابلیت اطمینان (دقت و صحت) تست‌های آزمایشگاه بکار می‌روند لذا در فواصل زمانی معین یا فواصل تعداد تست معین در طول ردیف کاری آزمایشات مورد استفاده قرار می‌گیرند.

کنترل بهتر است پس از تکمیل پروسه کالیبراسیون تجهیزات و تأئید کالیبر مورد استفاده قرار گیرد.

سرم کنترل صحت چیست؟

در سرم کنترل‌های صحت تعداد تکرارها بسیار زیاد بوده و میزان خطای نسبی در تعیین مقدار به حداقل مقدار Relative error و Absolute error ممکن رسیده است.

هرچه میزان دخالت این عوامل خطای نسبی در اندازه‌گیری‌های پایه کمتر باشد داده ارائه شده در سرم کنترل به واقعیت نزدیکتر خواهد بود و می‌توان بیشتر به آن سرم کنترل اعتماد کرد و سعی بر آن کرد که داده دستگاه هرچه بیشتر و بیشتر با آن همسو و نزدیک شود. به این گروه سرم کنترل‌ها سرم کنترل صحت گویند که به جای کنترل دقت نیز می‌توان به کار برد ولی بالعکس آن امکان پذیر نیست؛ یعنی سرم کنترل دقت را نمی‌توان به جای سرم کنترل صحت بکار برد.

تعریف صحه‌گذاری

صحه‌گذاری بخش مهمی از تضمین کیفیت می‌باشد که دستورالعمل‌های اجرائی و مراحل انجام تست را ارزیابی نموده و در نهایت اطمینان از کیفیت و اثربخشی و قابلیت اطمینان به تست را نشان می‌دهد.

صحه‌گذاری ابزاری مناسب برای کنترل تغییرات در سیستم آزمایشگاه می‌باشد؛ به این شکل که در زمان ارائه یک روش یا دستگاه جدید یا نرم‌افزار جدید عملکرد صحیح آن را تأئید کرده و اطمینان حاصل می‌نماید.

فرآیند صحه‌گذاری Process Of Validation

روش‌ها و تجهیزات و نرم‌افزارها در آزمایشگاه پزشکی قبل از استفاده بایستی از فرآیند صحه‌گذاری عبور نموده و اعتباردهی گردند. در ضمن موارد فوق بایستی در مقاطع زمانی معینی در حین کار مورد ارزیابی مجدد صحه‌گذاری قرار گیرند. هدف از صحه‌گذاری اولیه و مجدد (در حین کار) بایستی برای کاربران واضح و شفاف باشد به این معنی که به چه جهت صحه‌گذاری بایستی انجام گردد و هدف از آن چیست.

در سیستم‌های پیچیده ساده‌ترین روش جهت اعتباردهی شروع فرآیند صحه‌گذاری از کوچکترین اجزاء سیستم می‌باشد و به‌تدریج با کنار هم قرار دادن این اجزاء کل سیستم صحه‌گذاری خواهد شد. مسئولیت صحه‌گذاری در درجه اول با مسئول هر بخش فنی می‌باشد.

معیارهای صحه‌گذاری روش‌های آزمایشگاهی Validation Method Criteria

1- محدوده و رنج کمی موردنیاز از روش چه میزان است.

2- محدوده غلظت مورد انتظار در تست چه میزان است.

3- دقت و صحت مورد انتظار از روش چه میزان است.

4- چه نوع تجهیزاتی برای روش موردنیاز است و آیا وابسته به تجهیز خاصی است یا در انواع تجهیزات مشابه قابل کاربرد می‌باشد.

5- روش موردنظر در یک آزمایشگاه ویژه کاربرد دارد یا در کلیه مراکز آزمایشگاهی قابلیت اجرائی دارد.

6- چه مهارت‌های ضروری برای کار با روش موردنظر جهت کارکنان آزمایشگاه قابل پیش‌بینی می‌باشد.

مراحل اجرائی فرآیند صحه‌گذاری Defines Eight Steps For Validation

1- ارزیابی صحتAccuracy

2- ارزیابی دقت Precision

3- ارزیابی ویژگی روشSpecificity

4- ارزیابی محدوده سنجش روش Limit of detection

5- ارزیابی محدوده کمی روش Limit of quantitation

6- ارزیابی خطی بودن روش Linearity and range

7- ارزیابی ناهمواری تستRuggedness

8- ارزیابی استواری و قدرت تستRobustness

اجرائی نمودن مراحل صحه‌گذاری Steps in Method Validation

پذیرش قابل قبول پارامترهای صحه‌گذاری و معیارهای عملکردی نیازمند مشارکت و تلاش گروهی کلیه دپارتمان‌های آزمایشگاه می‌باشد که شامل:

1- توسعه کنترل کیفی و روش‌های آنالیتیکال

2- در طرح اصلی یا دستورالعمل اجرائی صحه‌گذاری به طور واضح بایستی نقش و مسئولیت‌های هر دپارتمان مشخص گردد و نحوه درگیر شدن آن دپارتمان در صحه‌گذاری روش‌های مربوطه مشخص گردد.

3- ویژگی‌های عملکردی یک روش صحه‌گذاری بایستی بر اساس روش مورد درخواست تنظیم گردد، لذا همواره ضرورتی ندارد که همه پارامترهای صحه‌گذاری برای یک روش مورد استفاده و ارزیابی قرار گیرد. به عنوان مثال در یک روش کیفی آزمایش سنجش خطی بودن یا محدوده کمی تست ضرورتی ندارد. پارامترهای اولیه صحه‌گذاری بهتر است بر اساس تجربه آنالیست و بهترین قضاوت تعیین گردد و پارامترهای نهائی بر اساس توافق آزمایشگاه با بیوشیمیست باتجربه در زمینه صحه‌گذاری روش‌ها صورت پذیرد.

Validation parameters for specific tasks

	Major compounds quantitative	Major compounds and traces quantitative	Major compounds qualitative	Traces qualitative
limit of detection	no	no	yes	no
limit of quantitation	no	yes	no	yes
linearity	yes	yes	no	yes
range	yes	yes	no	no
precision	yes	yes	no	yes
accuracy	yes	yes	no	yes
specificity	yes	yes	yes	yes
ruggedness	yes	yes	no	may be

چگونگی ارزیابی صحت اندازه‌گیری How Accuracy Determined

روش غیرمستقیم اندازه‌گیری صحت:

1- روش اندازه‌گیری درصد بهبود تست: با استفاده از مقادیر معین و دقیق آنالیت که به یک پایه اضافه گردیده و سطح غلظت آن مورد اندازه‌گیری قرار می‌گیرد.

2- اندازه‌گیری ویژگی تست (تعیین واکنش‌های متقاطع یا مثبت کاذب تست)

3- اندازه‌گیری اثر تداخل دهنده‌ها در تست

4- اندازه‌گیری خطی بودن تست

روش مستقیم اندازه‌گیری صحت:

مقایسه میانگین نتایج اندازه‌گیری شده با نتیجه مقادیر کنترل صحت معتبر (که با روش رفرانس و معتبر اندازه‌گیری شده است)

ارزیابی صحت روش Accuracy Assessment

اندازه‌گیری شاخص آماری صحت با روش‌های زیر انجام می‌گردد:

1- مقایسه نتایج متد موجود با نتایج رفرانس (با این پیش‌فرض که عدم قطعیت روش رفرانس در محدوده قابل قبولی باشد)

2- اندازه‌گیری مکرر نمونه کنترل صحت با مقادیر تعیین شده و دقیق و مقایسه نتایج حاصل با مقادیر ثبت شده در بروشور کنترل صحت

3- در صورت عدم دسترسی به کنترل صحت دقیق می‌توان مقادیر بسیار دقیق از یک آنالیت را یک پایه ثابت اضافه نمود و کنترل صحت تهیه نمود (با ابزار دقیق و صحیح وزنی و حجمی)

ارزیابی صحت روش Accuracy Assessment

توصیه مؤسسات استاندارد بین‌المللی این است که حداقل 9 اندازه‌گیری بر روی سه سطح غلظت یک کنترل صحت با مقادیر معین صورت گیرد (سه بار تکرار بر روی هر سطح غلظت)

ارزیابی دقت روش Precision Test

دو روش اصلی ارزیابی دقت شامل:

1- اندازه‌گیری و تعیین شاخص عدم دقت (ضریب تغییرات)

اندازه‌گیری و تعیین شاخص عدم دقت (ضریب تغییرات) روش جدید و مقایسه آن با ضریب تغییرات مورد ادعا توسط شرکت تولید کننده کیت

سه غلظت از یک نمونه (سه رقت) هر کدام 10 تا 20 بار در یک ردیف کاری یا ردیف‌های کاری متفاوت مورد اندازه‌گیری با روش جدید قرار گرفته و با محاسبه میانگین و انحراف معیار نهایتاً ضریب تغییرات روش جدید

استخراج می‌گردد که بایستی کمتر از ضریب تغییرات مورد ادعای تولید کننده کیت باشد. دلیل الزام به بررسی دقت در سه سطح غلظت این است که گاه تکرارپذیری یک روش در محدوده نرمال کیت مناسب است ولی در محدوده بالا یا پائین نامناسب است که با این روش قابل کنترل و بررسی می‌گردد.

ازاین روش ساده و مفید جهت ارزیابی دقت و تکرارپذیری تجهیزات در بدو خرید یا در حین کار می‌توان استفاده نمود (بعد از جنرال سرویس یا در زمان بروز نوسان در نتایج تست بیماران یا سرم کنترل‌ها)

2- آزمون آماری F:

زمانی که شاخص ضریب تغییرات روش جدید معادل یا بالاتر از عدد مورد ادعای تولید کننده کیت باشد آزمون آماری F مورد استفاده قرار می‌گیرد.

واریانس (مجذور انحراف معیار) روش جدید و روش مرجع (مورد ادعای تولید کننده)F در آزمون مورد مقایسه قرار می‌گیرد.

F آزمون = واریانس بزرگ / واریانس کوچک

Variance = (SD)2

دقت یک روش به معنای نزدیکی و توافق نتایج اندازه‌گیری شده در یک نمونه منفرد می‌باشد (در یک یا چند ردیف کاری)

دقت به چهار شکل کلی زیر قابل بررسی است:

تعریف کلی دقت Percision:

توافق یا نزدیکی نتایج اندازه‌گیری شده بر روی یک نمونه یا تست را گویند.

تکرارپذیری تست Repeatability:

تکرارپذیری تست به معنای توافق نتایج اندازه‌گیری شده در یک آزمایشگاه با یک تجهیز خاص و اپراتور مشخص و ثابت می‌باشد که در یک مدت زمان کوتاه بررسی می‌گردد.

جهت بررسی و محاسبه تکرارپذیری یک تست یک نمونه با دو غلظت متفاوت با 5 الی 10 اندازه‌گیری پیاپی (جهت هر یک از غلظت‌ها) موردنیاز است تا محدوده انحراف معیار و ضریب تغییرات در تست تکرارپذیری اندازه‌گیری شود.

دقت بینابینی یا حد واسط Intermediate Precision:

توافق نتایج اندازه‌گیری شده بر روی یک نمونه در یک آزمایشگاه ولی با تجهیزات / کیت / روش / ابزار و اپراتور متفاوت

تولیدپذیری یا دقت بین آزمایشگاهی Reproducibility:

توافق نتایج اندازه‌گیری شده بر روی یک نمونه در بین دو آزمایشگاه (ولی با تجهیزات / کیت / روش / ابزار و اپراتور متفاوت)

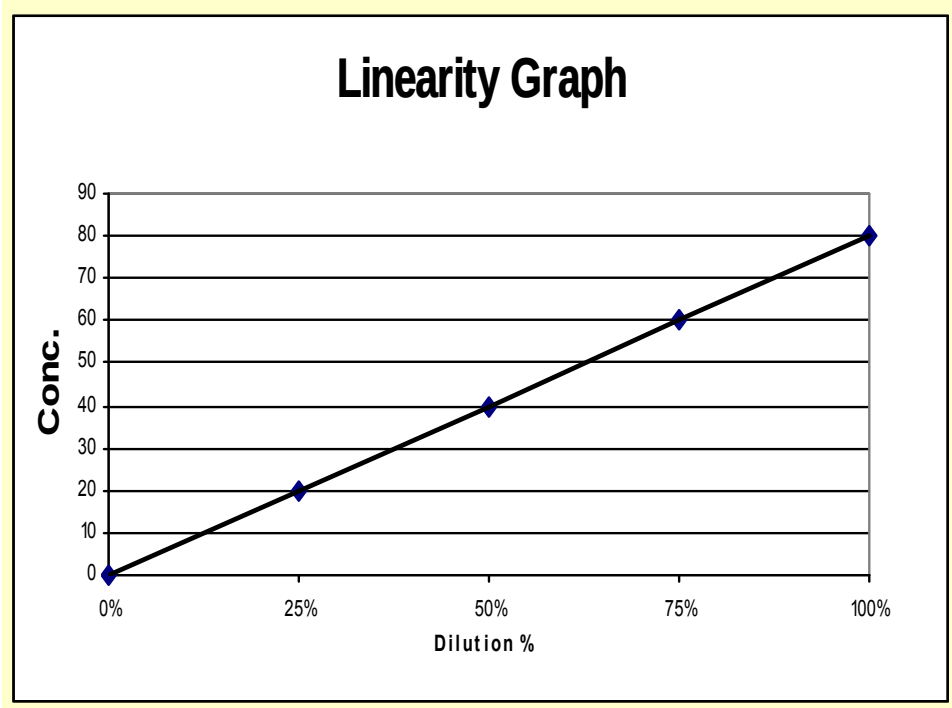
خطی بودن تست Linearity:

خطی بودن به ارتباط بین مقادیر اندازه‌گیری شده و مقادیر واقعی (قابل انتظار) در محدوده اندازه‌گیری آزمایش اطلاق می‌گردد. خطی بودن یک تست به‌راحتی با تهیه یک رقت سریالی از نمونه با غلظت دقیق و معین می‌تواند مورد بررسی قرار گیرد (خصوصاً در تست‌های ایمونو اسی).

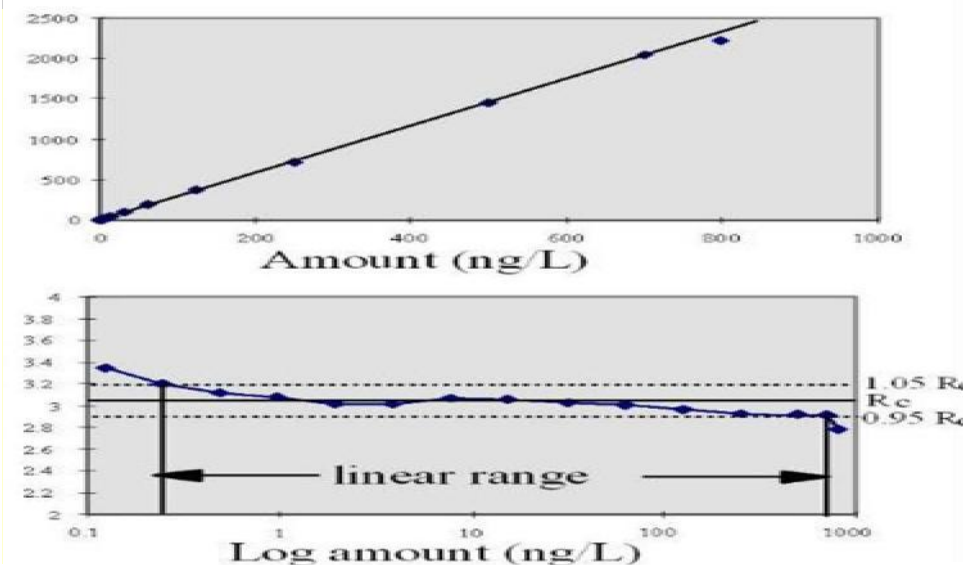
روش‌های گوناگونی برای ارزیابی خطی بودن روش آزمایشات وجود دارد از جمله:

1- روش ساده و منطقی روش مقایسه بین نتایج اندازه‌گیری شده و مورد انتظار در منحنی خطی بودن روش می‌باشد.

2-روش آماری F: بر اساس اندازه‌گیری مکرر بر روی هر غلظت معین از یک نمونه می‌باشد:



Linearity Curve



ویژگی / انتخابی بودن روش Selectivity/Specificity

تعریف ویژگی روش: میزان پاسخ‌دهی یک روش به یک آنالیت منفرد را ویژگی روش گویند.

تعریف روش انتخابی: قدرت تمایز روش برای جداسازی یک یا چند آنالیت از سایر آنالیت‌ها را گویند که اگر این پاسخ از سایر پاسخ‌ها تمایز داده شود روش انتخابی نامیده می‌شود. از آنجائی که روش‌هائی که اختصاصاً به یک آنالیت پاسخ‌دهی داشته باشند بسیار محدود می‌باشند، اصطلاح روش انتخابی یا روش منتخب کاربردی‌تر است.

Basic statiscal Procedure of Q.A

- **Clinical reliability**
  - TEST

		POS	NEG	TOT
Referenc	POS	TP	FN	TP+FN
	NEG	FP	TN	TN+FP
	TOT	TP+FP	FN+TN	TOTAL

- Sensivity%= (TP/TP+FN) *100 detect FN
- Specifity%= (TN/TN+FP) *100 detect FP
- Agreement= (TN+TP)/TOTAL *100

Example

236 sample(62 EX pos + 174 EX neg)

- Test

		pos	neg	tot
referance	pos	58	4	62
	neg	5	169	174
	tot	63	173	236

- sensivity % =58/62= 93.5%
- specifity % =169/174= 97.1%
- Agreement% =169+58/236= 96.2%

ارزیابی تداخل دهنده‌های تست Interference Assay

تداخل دهنده‌ها مهم‌ترین عامل بروز نتایج مثبت کاذب و کاهش ویژگی روش و تست می‌باشند که الزاماً بایستی موارد شایع آنها در کارخانه‌های تولیدکننده کیت مورد ارزیابی دقیق قرار گرفته و مصرف‌کننده را توسط بروشور در جریان تداخلات شایع کیت بگذارند.

مهم‌ترین تداخل دهنده‌ها:

1- قند (معمولاً بالای 300 برای بیلی‌روبین به روش مالوی / بدون تأثیر تداخل دهنده برای فسفر به روش مولیبدات)

2- تری‌گلیسرید (نشانه لیپمیک) (معمولاً بالای 1000 یا 2000 در روش مولیبدات برای فسفر سرم و بالای 400 برای بیلی‌روبین)

3- اسید اسکوربیک (معمولاً بالای 30 میلی‌گرم در دسی‌لیتر و بالای 20 میلی‌گرم برای بیلی‌روبین)

4- هموگلوبین سرم یا پلاسما (نشانه همولیز) بالای 70 میلی‌گرم در دسی‌لیتر (0.7 گرم در لیتر) در تست بیلی‌روبین بایاس منفی حاصل می‌کند لذا سرم موردنیاز جهت بیلی‌روبین بایستی الزاماً فاقد همولیز متوسط یا شدید باشد.

Reference:

1. Cohort doc/WHO
2. http://www.westgard.com/clia.htm
3. Text book of clinical chemistry Tietz 2006
4. clinical diagnosis (henry 2007)
5. CLSI (2007)
6. Infobase NCCLS 2000 (18-A2)