

روش کار حسابگر "مرزهای پایین سنجش"

LOWER LIMITS OF DETECTION

توجه:

(۱) اجرای این حسابگر به ویرایش ۲۰۱۰ یا بالاتر برنامه‌ی Excel نیاز دارد.

(۲) چون این حسابگر در برنامه‌ی Excel تهیه شده است، ممکن است ابعاد صفحه‌ی باز شده همسان با صفحه‌ی نمایشگر نباشد. در این صورت لازم است پس از باز کردن برنامه با کاستن یا افزودن بر اندازه‌ی صفحه آن را طوری تنظیم کرد که دست کم تا ردیف ۲۲ دیده شود. برای این که هر بار مجبور به این کار نباشیم، می‌توان پیش از باز کردن برنامه، تیک Read-only را برداشت، صفحه را باز و اندازه‌ی آن را تنظیم و ذخیره کرد و پس از بستن صفحه دوباره Read-only را تیک زد.

آخرین کاری که در ارزشیابی روش‌ها باید انجام شود بررسی عملکرد روش سنجش در اندازه‌گیری غلظت‌های کم است. البته این بررسی برای همه‌ی آزمایش‌ها لازم نیست و فقط برای آزمایش‌هایی مهم است مقادیر اندک آن‌ها از نظر بالینی مهم است؛ بنا بر این، این بررسی برای آنالیت‌هایی مانند گلوکز، اوره یا کلسترول لازم نیست، اما برای آزمایش‌هایی مانند TSH، تروپونین، PSA یا تعیین بار ویروسی لازم است.

حد پایین سنجش نام‌های گوناگونی دارد. CLSI در دستورکار (2003) EP17 که به ارزشیابی عملکرد روش‌های سنجش در غلظت‌های پایین اختصاص دارد سه عنوان زیر را ارائه کرده است:

- مرز شاهد؛ LoB (Limit of Blank)
- مرز تشخیص؛ LoD (Limit of Detection)
- مرز اندازه‌گیری؛ LoQ (Limit of Quantification)

این حسابگر بر اساس روش کار ارائه شده در EP17، البته شرحی که در ویرایش سوم کتاب Basic Method Validation نوشته‌ی پروفیسور وستگارد چاپ سال ۲۰۰۳ آمده است، تهیه شده است و همراه با شرح کوتاهی از عناوین بالا ارائه می‌شود.

❖ مرز شاهد؛ LoB

منظور از مرز شاهد بزرگترین نتیجه‌ای است که با یک احتمال معین ممکن است از سنجش نمونه‌ی شاهد به دست آید.

برای تعیین مرز شاهد باید یک نمونه‌ی عاری از آنالیت مورد نظر را، که معمولاً کالیبراتور صفر است، دست کم ۲۰ بار در یک دور یا یک روز سنجید، میانگین و انحراف معیار نتایج را تعیین کرد و LoB را برای احتمال ۹۵٪ حساب کرد:

$$\text{LoB} = \text{Mean}_{\text{blk}} + 1.65 * \text{SD}_{\text{blk}}$$

در این فرمول Mean_{blk} و SD_{blk} به ترتیب میانگین و انحراف معیار شاهد است (blk : blank).

مثلاً چنانچه میانگین و انحراف معیار ۲۰ بار سنجش استاندارد صفر یک روش سنجش دیگوکسین به ترتیب ۱ و ۰.۶ شده باشد:

$$\text{LoB} = 1 + (1.65 \times 0.6) = 2 \text{ mg/dL}$$

این یعنی ۹۵٪ از جواب‌های حاصل از سنجش استاندارد صفر زیر ۲ قرار می‌گیرند. با این روش اگر نتیجه‌ی سنجش یک نمونه مثلاً ۱.۵ بشود نمی‌توان با اطمینان گفت که در آن نمونه دیگوکسین وجود دارد چون ممکن است چنین نتیجه‌ای از نمونه‌ی عاری از دیگوکسین هم به دست آید. بنا بر این، در صورت به دست آمدن نتیجه‌ای کمتر از ۲ باید جواب را به صورت $\text{LoB} <$ گزارش کرد.

حال بیایید این وضعیت را بررسی کنیم: اگر دیگوکسین واقعی یک نمونه مثلاً ۲.۳ باشد آیا جوابی که از سنجش آن نمونه به دست می‌آید حتماً بالاتر از ۲ خواهد بود؟

البته پاسخ بستگی دارد به میزان نوسان روش ما. در صورتی که نمونه‌ای با مقدار واقعی ۲.۳ چند بار سنجیده شود، اعداد گوناگونی به دست خواهد آمد که پیرامون میانگین ۲.۳ پراکنده هستند. یعنی گاهی عددی بالای ۲.۳ به دست می‌آید و گاهی هم عددی زیر ۲.۳ و گاهی حتی ممکن است نتیجه زیر ۲ و در محدوده‌ی نتایج به دست آمده از سنجش شاهد باشد. همانطور که می‌بینیم به دلیل نوسان سنجش، اگر مقدار واقعی نمونه‌ای ۲.۳ باشد نمی‌توان مطمئن بود که نتیجه‌اش در محدوده‌ی صفر قرار نگیرد و قابل تشخیص از صفر باشد. بنا بر این، این پرسش پیش می‌آید: مقدار واقعی دیگوکسین در نمونه از چه غلظتی باید بالاتر باشد که نتیجه‌اش در محدوده‌ی صفر نیفتد؟ پاسخ این پرسش در تعیین مرز تشخیص است.

❖ مرز تشخیص؛ LoD

منظور از مرز شاهد کمترین غلظتی است که با یک احتمال معین قابل تشخیص است یعنی نتیجه‌اش در محدوده‌ی صفر یا زیر LoB قرار نمی‌گیرد.

برای تعیین مرز تشخیص باید به یک نمونه‌ی شاهد مقدار اندکی آنالیت افزود (نمونه‌ی افزوده) و آن را در چند روز روی هم دست کم ۶۰ بار سنجید. در عمل به جای تهیه‌ی نمونه‌ی افزوده، از کوچکترین غلظت کالیبراتور استفاده می‌شود. سپس باید انحراف معیار سنجش را به دست آورد و با استفاده از آن غلظتی را حساب کرد که ۹۵٪ از نتایج حاصل از تکرار سنجش آن غلظت، بالاتر از LoB قرار می‌گیرد:

$$\text{LoD} = \text{LoB} + 1.65\text{SD}_{\text{spk}}$$

در این فرمول SD_{spk} انحراف معیار نمونه‌ی شاهدی است که به آن اندکی آنالیت افزوده شده است (spk : spiked). البته همانطور که گفتیم در عمل از اولین کالیبراتور به عنوان نمونه‌ی افزوده استفاده می‌شود.

در ادامه‌ی مثال بالا، اگر کالیبراتور ۲ ng/mL کیت را ۶۰ بار سنجیده باشیم و انحراف معیار ۰.۹ به دست آمده باشد:

$$\text{LoD} = 2 + (1.65 \times 0.9) = 2 + 1.5 = 3.5 \text{ mg/dL}$$

یعنی اگر مقدار دیگوکسین در نمونه‌ای بالاتر از ۳.۵ باشد به احتمال ۹۵٪ نتیجه‌اش بالاتر از LoB خواهد بود و از صفر تشخیص داده خواهد شد.

اما این آخر کار نیست؛ پرسش دیگری نیز مطرح است: آیا جواب‌های بالاتر از ۳.۵ با کیفیت

هستند؟

همانطور که می‌دانیم کیفیت داشتن یعنی این که دست‌کم ۹۵٪ از نتایج تولید شده حداکثر به اندازه‌ی "خطای کل مجاز" از مقدار واقعی‌شان دور باشند. یعنی خطای سنجشی کل (Total Analytical Error; TAE) کمتر از خطای کل مجاز (Allowable Total Error; ATE) باشد. پاسخ این پرسش با تعیین مرز اندازه‌گیری داده می‌شود.

❖ مرز اندازه‌گیری؛ LoQ

مرز اندازه‌گیری یعنی کمترین غلظتی که با کیفیت مورد نظر سنجیده می‌شود.

برای تعیین LoQ باید چند غلظت گوناگون در سطح پایین تهیه کرد. در ۵ دور که در بیش از ۵ روز انجام شده باشد هر نمونه را روی هم دست‌کم ۶۰ بار سنجید و ضریب تغییرات (CV) آن‌ها را تعیین کرد. سپس با دانستن عدم صحت روش در آن سطوح (که پیشتر از ارزشیابی نامیزانی به دست آمده است)، تعیین کرد که در چه غلظتی خطای سنجشی کل به اندازه‌ای کم می‌شود که با خطای کل مجاز برابر می‌شود. در واقع چون هرچه به سمت غلظت‌های پایین می‌رویم CV روش افزایش می‌یابد، می‌خواهیم تعیین کنیم که در چه غلظتی CV آنقدر کوچک شده است که افزوده شدن خطای ناشی از نوسان به خطای ناشی از نامیزانی از خطای کل مجاز فراتر نمی‌رود.

مثلا اگر برای مثال دیگوکسین، با توجه به این که در جدول CLIA خطای کل مجاز برای سنجش دیگوکسین ۲۰٪ است، باید تعیین کنیم که در چه غلظتی خطای سنجشی کل از ۲۰٪ فراتر نمی‌رود. فرض کنیم سه غلظت ۴، ۷، و ۱۰ تهیه شده است و پس از سنجش با شرح بالا CVهای ۲۵٪، ۱۲٪ و ۵٪ به ترتیب به دست آمده است. چنانچه ارزشیابی نامیزانی نشان داده باشد که عدم صحت روش ما در این سطوح ۶٪ است:

$$ATE = 20\%$$

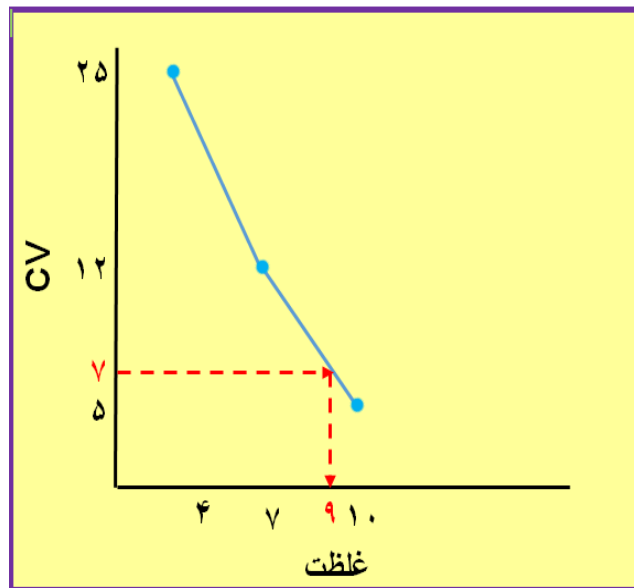
$$20 = B + 2CV$$

$$20 = 6 + 2CV$$

$$CV = (20 - 6) / 2$$

$$CV = 7\%$$

یعنی با این مشخصات، غلظتی که در آنجا CV روش ۷٪ می‌شود مرز اندازه‌گیری است و نتایج پایینتر از آن غلظت، از کیفیت مورد نظر برای کاربرد بالینی برخوردار نیستند. همانطور که می‌بینیم هیچ یک از CVهای به دست آمده در این مثال، سراسر برابر ۷٪ نیست. بنا بر این، برای پیدا کردن غلظتی که در آنجا CV برابر ۷٪ است باید نمودار CV را در مقابل غلظت رسم کنیم، از نقطه‌ی ۷ روی محور عرض‌ها خطی افقی رسم کنیم تا با نمودار برخورد کند و سپس از آن نقطه‌ی برخورد، خطی بر محور طول‌ها عمود کنیم و محل برخورد با محور طول‌ها را تعیین کنیم:



همانطور که از نمودار پیداست CV برابر ۷٪ در غلظت ۹ ng/dL به دست می‌آید. پس این روش برابر ۹ ng/dL است؛ یعنی نتایج بالاتر از ۹ با این روش خطایی کمتر از خطای کل مجاز دارند و می‌توان نتایج برابر یا بالاتر از ۹ را به صورت عددی گزارش کرد.

نکته: نتایج بین LoQ و LoD را چگونه گزارش کنیم؟

چنین نتایجی را باید به صورت "قابل تشخیص اما غیر قابل اندازه‌گیری" گزارش کرد. مثلاً در این مثال، اگر نتیجه‌ای بین ۷ تا ۹ به دست آید، مثلاً ۸.۳ ng/dL، نباید به صورت عدد گزارش شود بلکه باید به صورت Detectable; Not quantifiable گزارش شود.

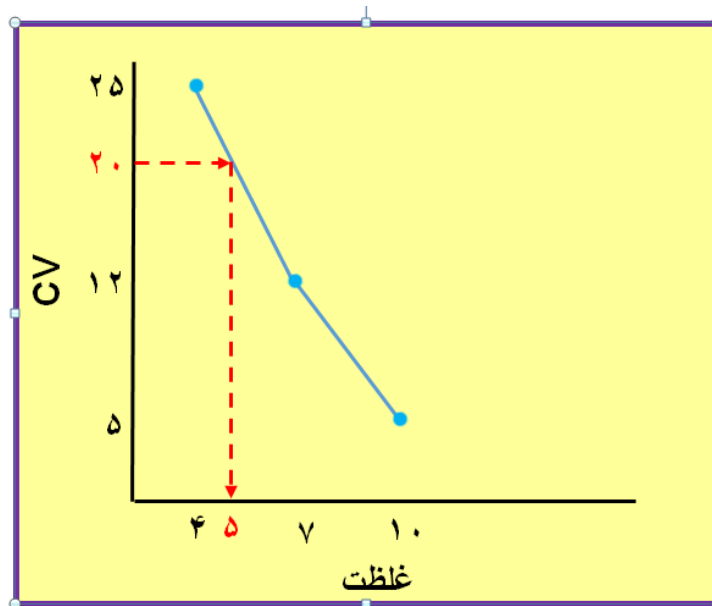
❖ حساسیت عملکردی؛ FS: Functional Sensitivity

حساسیت عملکردی یعنی غلظتی که در آن CV روش ۲۰٪ است.

البته این اصطلاح در EP17 وجود ندارد و تقریباً معادل قدیمی LoQ است با این تفاوت که برای تعیین آن، نامیزانی روش و خطای کل مجاز در نظر گرفته نمی‌شود و فقط در جستجوی جایی هستیم که در آن CV بیش از ۲۰٪ نباشد.

بی‌گمان برای این که نتایج آزمایشگاهی از کیفیت لازم برای کاربرد بالینی برخوردار باشند باید LoQ را تعیین کنیم و FS چندان کارآمد نیست. با وجود این، چون این ویژگی هنوز در برخی دستورکارها وجود دارد و در کتاب پروفیسور وستگارد نیز بیان شده است بنا بر این به حسابگر افزوده شده است.

برای تعیین FS باید همانند LoQ چند غلظت تهیه کرد و هر غلظت را باید دست‌کم ۲۰ بار سنجید و CVهای آن‌ها را محاسبه و غلظتی را که در آن CV برابر ۲۰٪ است تعیین کرد. اگر بخواهیم FS مثال بالا را حساب کنیم باید از نقطه‌ی ۲۰ روی محور عرض‌ها شروع و همانند تعیین LoQ کار کنیم:



در این مثال FS برابر ۵ ng/dL می‌شود. همانطور که دیده می‌شود FS بسیار کوچکتر از LoQ است. این نشان‌دهنده‌ی آن است که FS ویژگی چندان کارآمدی نیست.

❖ روش کار استفاده از حسابگر

این حسابگر از ۶ ستون و ۱۰۰ ردیف برای وارد کردن نتیجه‌ی سنجش غلظت‌های گوناگون تشکیل شده است؛ ستون اول برای وارد کردن نتایج سنجش شاهد است.

در مثال زیر برای ارزشیابی یک روش سنجش دیگوکسین، کالیبراتور صفر برای تعیین LoB بیست بار سنجیده شده است، کالیبراتور ۰.۳ ng/mL برای تعیین LoD، و دو غلظت ۱ و ۵ برای تعیین LoQ هرکدام ۶۰ بار سنجیده شده‌اند:

	Blank	# 1	# 2	# 3	# 4	# 5
غلظت	0	0.3	1	5		
نتیجه‌های سنجش‌ها						
1	0.15	0.4	1.1	4.9		
2	0.11	0.3	0.9	4.9		
3	0.16	0.5	0.9	4.8		
4	0.12	0.3	0.9	4.8		
5	0.16	0.2	0.8	4.8		
6	0.22	0.2	1.1	4.8		
7	0.11	0.2	1.1	4.8		
8	0.16	0.3	1.1	4.8		
9	0.19	0.3	1.1	4		
10	0.33	0.3	1.1	7		
11	0.11	0.5	0.9	4.7		
12	0.32	0.5	1.2	4.7		
13	0.03	0.5	1.2	4.7		
14	0.18	0.5	1.2	4.7		
15	0.15	0.2	1.2	4.6		

پس از وارد کردن نتایج سنجش، میانگین، SD و CV هر ستون محاسبه و در جدولی در طرف راست نمایش داده می‌شود:

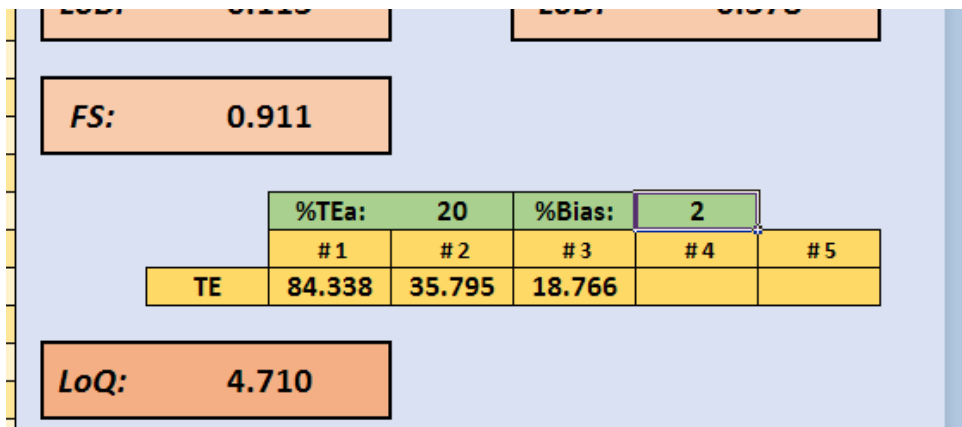
	Blank	# 1	# 2	# 3	# 4	# 5
غلظت	0	0.3	1	5		
میانگین	0.162	0.390	1.203	5.129		
SD	0.068	0.160	0.203	0.430		
CV	42.276	41.169	16.898	8.383		

بر اساس این اطلاعات، LoB، LoD، FS و محاسبه و نمایش داده می‌شود:

CV	42.276	41.169	16.898	8.383		
LoB:	0.113		LoD:			0.378
FS:	0.911					

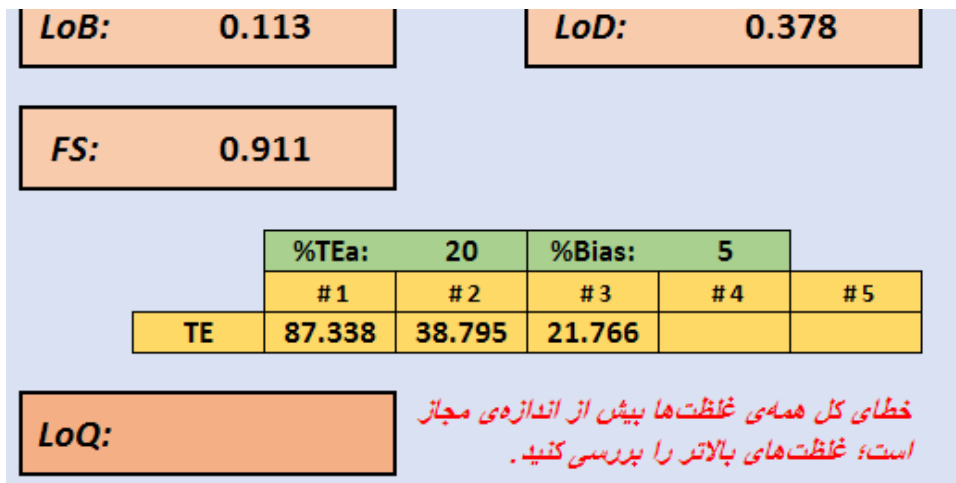
در آخرین مرحله باید خطای کل مجاز و نامیزانی را در خانه‌های مربوط وارد کنیم تا حسابگر LoQ را حساب کند. با وارد کردن این داده‌ها، خطای کل هر نمونه محاسبه می‌شود و مقابل عنوان TE نمایش داده می‌شود. سپس حسابگر جایی را که TE برابر خطای کل مجاز (TE_a) است پیدا می‌کند و به عنوان LoQ نمایش می‌دهد. این حسابگر برای پیدا کردن CV مورد نظر برای LoQ (و نیز CV برابر ۲۰٪ برای FS) از معادله‌ی خط راست بین نقطه‌ها استفاده می‌کند، و بنا بر این نسبت به رسم نمودار و پیدا کردن چشمی دقیقتر است.

در مورد این مثال، با توجه به این که خطای کل مجاز برای سنجش دیگوکسین ۲۰٪ است و با فرض این که در مراحل پیشین ارزشیابی، معلوم شده باشد که نامیزانی روش در غلظت‌های پایین برابر ۲٪ است:



LoQ حدود ۴.۷ ng/dL حساب می‌شود که همانطور که دیده می‌شود خیلی بالاتر از FS است (۴.۷ در مقابل ۰.۹).

به عنوان مثالی دیگر، اگر نامیزانی روش ۴% باشد LoQ حساب نخواهد شد زیرا خطای کل سنجش حتی برای غلظت ۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر هم از ۲۰% مجاز بیشتر خواهد شد:



در پایان بررسی می‌توان با مراجعه به صفحه‌ی گزارش، اطلاعات لازم را تایپ و گزارش بررسی را بر روی کاغذ A4 چاپ کرد. کل گزارش، در صورت وارد کردن ۱۰۰ داده در ستون‌ها، پنج صفحه می‌شود. در صورتی که داده‌ها کمتر از ۱۰۰ تا باشد چاپ همه‌ی صفحه‌ها لازم نیست و با تنظیم چاپ باید صفحات لازم را چاپ کرد. در هر حال چاپ دو صفحه‌ی اول لازم است.

با احترام،

حسن بیات

۱۳۹۲/۱۰/۷