صحه گذاری ابزار تشخیص پزشکی Validation وابزار محاسباتی :

طبق تعریف FDA، صحه گذاری ایجاد شواهدی مکتوب با درجه بالای اطمینان می باشد مبنی بر آنکه ازهر فرآیند مشخص، بطور پیوسته محصولی بدست می آید که ویژگیها و کیفیت ازپیش تعیین شده را داراست .

یازده اصول اساسی برای پروتکل صحه گذاری یا Validation ، صلاحیت اجرایی و عملی Performance Qualification (PQ) آزمون های آزمایشگاهی وجود دارد که شامل :

۱- Specificity : قابلیت یک روش کار و محلول ها برای تعیین یا اندازه گیری یک آنالیت خاص مورد آزمایش

Is the ability of a procedure (and reagents) to detect a single analyte being tested.

۲- Linearity یا خطی بودن
۳- Accuracy یا صحت

صحت یک نوع اندازه گیری (عملکرد) است. قابلیت بدست آوردن ارزش حقیقی یک آزمون

Accuracy is a measure of performance. It is a ability to obtain the true value of a test.

۴- Precision یا تکرارپذیری :

یک نوع اندازه گیری عملکرد است. قابلیت بدست آوردن نتایج مشابه در زمان های مختلف

Precision is a measure of performance. It is the ability to obtain the same results time after time.

۵- Robustness
۶- Range یا دامنه
۷- Limit of Detection (LOD)
۸- Limit of quantitation
۹- Ruggedness
۱۰-Selectivity
۱۱- Suitability

اصول ، مقررات والزامات تضمین کیفیت ،آزمایشگاه را ملزم میسازد که عملکرد روش آزمایشگاهی و یا ابزار و دستگاه مورد استفاده را قبل از گزارش نتایج بیماران مورد تائید قرار داده باشد. این امر مسئولیت هر آزمایشگاه است که در مورد تائید و صحه گذاری یک متد یا استفاده از یک دستگاه جدید آزمایشگاهی اقدام کند.

کالج پاتولوژیست های امریکا (CAP) ملزم می کند که آزمایشگاه های تشخیص پزشکی عملکرد تست ها را صحه گذاری نمایند.

CAP require that laboratories validate the performance of tests.

ارزیابی عملکرد آزمون ها شامل :

۱- Precision
۲- Accuracy
۳- Linear range
۴- Detection limit
۵- Interference
۶- Reference Interval
۷- Reportable range

می باشد. (رفرانس شماره ۵،۶)

به منظور صحه گذاری (Validation) یک متد یا دستگاه جدید آزمایشگاهی مراحل زیر در نرم افزار پیشنهادی انجام می گردد.

تائید صحت دستگاه Verification of Analytic Accuracy

توافق بین نتیجه آزمون و نتیجه درست به روش مقایسه یا Comparison صورت میگیرد.

Agreement between test result and true result done by comparison results between new method or instrument and “reference” method.

بر طبق اسناد (CLSI EP9-A2 , EP15-A2) سفارش می شود ۴۰ نمونه بیمار در سه سطح پایین، طبیعی و بالا به تعداد مساوی و به شکل Duplicate در دامنه اندازه گیری دستگاه (Analytical Range or Within Testing Range) اندازه گیری شود. نمونه ها بایستی فاقد تداخل گرهای آزمون شامل Icteric , Lipemic , Hemolysis باشد و به شکل Duplicate بر روی هر دو متد یا دستگاه (دستگاه اندازه گیری جدید و دستگاه یا متد رفرانس) اندازه گیری شده و میانگین آنها محاسبه شود. سپس نتایج بر روی نرم افزار برده شده و از طریق آنالیز رگراسیون خطی و محاسبه r^2 که به تفسیر در زیر آمده است به دقت دستگاه و متد اندازه گیری پی ببرید.

تائید تکرارپذیری یا Verification of Precision

Precision دلالت دارد بر تکرارپذیری ، به این معنی که با آنالیز مکرر به تعین تغیرات بپردازیم. برای تائید Precision می توانیم نمونه های غیرطبیعی Abnormal Samples و یا سرم کنترل را در ۳ سطح Low , Normal , Hight در ۲۰ مرتبه به دو طریق :

۱. Inter assay Analysis یا Within run انجام داد. نمونه ها ۲۰ بار در یک run کاری و در یک روز انجام میگیرد.
۲. Inter assay Analysis یا Between run انجام داد. نمونه ها ۲۰ بار در ۲۰ روز مختلف و در run کاری مجزا انجام میگیرد.

عدم تکرارپذیری imprecision از نظر کمی اندازه گیری میگردد. یا محاسبه میانگین، انحراف معیار (SD) و ضریب انحراف (CV) از نتایج بدست آمده، نتایج را در نرم افزار وارد کرده و یا حد قابل قبول مقایسه کنید.

Analytical Sensitivity

قابلیت یک روش یا متد آنالتیک برای ارزیابی و اندازه گیری تغیرات جزئی غلظت یک آنالیت (رفرانس [13])

این اغلب به صورت شیب منحنی کالیبراسیون بیان می گردد. هر چه از این شیب تیزتر باشد، آزمون بیشتر حساس است و در واقع حساسیت آنالتیک بستگی به تکرارپذیری روش یا متد آزمایشگاهی دارد.

یک نمونه دارای ارزش پائین Low Sample یا سرم کنترل Low را ۲۰ بار پشت سر هم در یک run کاری انجام دهید؛ نتایج را بر روی نرم افزار برده و Analytical Sensitivity را اندازه گیری کرده و با حد مجاز و یا Analytical Sensitivity کارخانه سازنده کیت یا دستگاه مقایسه کنید.

پروتکل خطی بودن یا Linearity Protocol

ارزیابی خطی بودن (دامنه اندازه گیری آنالتیک) : بنابر قوانین و مقررات کالج پاتولوژیست های امریکا (CAP) ، خطی بودن یا همان Linearity هر متدلوژی آنالتیک حداقل دوبار در سال در فواصل هر ۶ ماه یکبار بایستی چک و کنترل شود.

اگر یک آرمون از ۴ استاندارد یا بیشتر برای کالیبراسیون استفاده می کند و کالیبراسیون حداقل در فاصله هر ۶ ماه یکبار صورت میگیرد. می توان فرض داشت که از قوانین پیروی می کند.

اگر هر یک از دو شرایط بالا ممکن نبود، نمونه های بیمار برای نشان دادن خطی بودن آزمون مورد استفاده قرار می گیرد.

آزمون خطی بودن Linearity بایستی دقیقا به همان روشی انجام شود که نمونه بیمار اندازه گیری می شود.

نتایج ارزیابی خطی بودن Linearity بر روی نرم افزار برده شود و پرینت آن گرفته شود و به امضاء رئیس دپارتمان و سوپروایزر برسد و نسخه هارد کپی ذخیره گردد.

اگر خطی بودن Linearity از حد بیان شده توسط کارخانه سازنده کیت و دستگاه فراتر رفت، بایستی حد کارخانه سازنده منظور گردد. هدف از کنترل منظم خطی بودن برای تحصل اطمینان از اینکه ادعای کارخانه سازنده برای یک آزمایشگاه خاص معتبر است و خطی بودن ثابت می ماند. با تغیر lot محلول خطی بودن بیان شده توسط کارخانه تولیدی نباید تجاوز کند.

فاکتورهایی که هنگام انجام Linearity باید در نظر گرفت :

- نمونه های بیمار بایستی به هنگام ارزیابی Linearity مورد استفاده قرار گیرد. به خاطر اینکه منعکس کننده توانایی عملکرد حقیقی آزمون خاص باشد.

- اگر نمونه های بیمار در دسترس نیست، مواد کنترل یا کالیبراتور را می توان استفاده کرد، توجه داشته باشید این آخریت راه حل چاره است و در وحله اول سرم بیمار بایستی انتخاب شود.

- اثرات Matrix Effect ممکن است در عملکرد آزمون تغیراتی به وجود آورد. مطلوب است که خطی بودن Linearity منعکس کننده عملکرد واقعی آنالیز (اندازه گیری) آنالیت خاص در مایعات بدن باشد.

- Linearity بایستی دقیقا به روشی انجام گیرد که نمونه بیمار اندازه گیری می شود. بدلیل از بین بردن bias اگرچه هر نمونه Linearity برای ارزیابی به شکل جفت مورد آزمایش قرار می گیرد.

- نتایج ارزیابی Linearity را بر روی r نرم افزار برده و جواب را پرینت بگیرید، بایستی به امضاء مسئول بخش و یک نسخه هارد کپی در کامپیوتر حفظ می گردد.

انجام ارزیابی و مطالعه Linearity :

برای آنالیت یا آزمایش مورد نظر، یک نمونه در حد غلظت پایین و یک نمونه در حد غلظت بالا را انتخاب کنید. هر یک از این نمونه ها بایستی در غلظت تقریبا نزدیک به حد خطی بودن کارخانه تولیدی در حد امکان باشد. در عین حال غلظت نمونه ها بایستی در حد Analytical Range قرار گیرد تا دستگاه بتواند مستقیما و بدون انجام دقت اضافی، ارزش آنالیت را به ما بدهد.

قبل از انجام هر دو نمونه را کاملا مخلوط کنید.

پنج لوله را به ترتیب از ۱ تا ۵ شماره گذاری کنید.

لوله را بر طبق جدول زیر آماده نمائید.

	Parts of low per sample	Parts of high per sample
Linearity 1	Neat	0
Linearity 2	3	1
Linearity 3	2	2
Linearity 4	1	3
Linearity 5	0	Neat

به عنوان مثال چنانچه حجم کل ۲۰۰ میلی لیتر برای انجام آزمایش کافی باشد، نمونه ها به شکل زیر تهیه و مخلوط می گردد و پس از بدست آوردن نتایج به روی نرم افزار منحنی و محاسبات آن معلوم می گردد.

Linearity No.	Sample low (ml)	Sample high (ml)
1	200	0
2	150	50
3	100	100
4	50	150
5	0	200

Specificity یا Selectivity ؛ ویژگی یا اختصاصیت:

این پارامتر مربوط می شود به سایر مواردی که در شناسایی و اندازه گیری عددی مناسب یک آنالیت تاثیر می گذارد.

در تعریف : اندازه گیری توانایی یک متد برای شناسایی، تعین مقدار عددی آنالیت در حضور سایر مواد اعم از مواد داخلی یا خارجی. در ماتریکس نمونه تحت شرایط بیان شده متد آزمایش.

با توجه به مطلب بالا، در آزمایشگاه تشخیص پزشکی معمولا سه فاکتور همولیز، لیپمیک، ایکتریک با صرف نظر از تداخل دارویی مدنظر می باشد، در صورتی که محلول ها و یا دستگاه مورد اندازه گیری به تائید FDA و سایر منابع معتبر رسیده باشد، آزمایشگاه با استناد به ارقام و مدارک داخل بروشور محلول ها یا دستگاه می تواند اکتفا کند و نیاز نیست که به انجام Validation بپردازد؛ ولی در صورت عدم تائید منابع معتبر لازم است که از لحاظ مواد مداخله گر در فرایند اندازه گیری، ارزیابی و بررسی صورت گیرد.

طرزکار با نرم افزار :

ابتدا اطلاعات راجع به تست، تاریخ، دستگاه، فرد انجام دهنده آزمایش و متد آزمون را وارد کنید.

در ستون Spec. No. تعداد ۴۰ نمونه از آنالیت مورد صحه گذاری در سه سطح پایین، نرمال و بالا به تعداد مساوی انتخاب و شماره آزمایشگاه آنها را وارد کنید.

در ستون دوم نتایج نمونه ها با دستگاه رفرانس را وارد نمائید.

در ستون سوم نتایج نمونه ها با دستگاهی که Validate می شود را وارد کنید. در صفحه دوم منحنی رگراسیون را مشاهده می نمائید.

تفسیر منحنی رگراسیون (Linear Regression) :

این منحنی ارتباط بین دو دسته از نتایج را به صورت خطی روی محورهای (XY) نشان می دهد.نتایج رفرانس بر روی محور X و نتایج به دست آمده حاصل از دستگاه مورد ارزیابی روی محور Y مشخص و خط بین آنها رسم می شود. کلیه نتایج بر روی محورهای (YوX) دارای واحد یکسان می باشد. در صورت ارتباط مثبت بین X و Y خط با محور X زاویه ۴۵ درجه تشکیل می دهد. رسم منحنی بر اساس معادله Y=mx+b صورت می گیرد که در آن m ضریب زاویه (Slope)؛ X متغیر؛ Y تابع و b محل تقاطع خط با محور Y "Intercept" می باشد. اگر خط از مرکز تقاطع X و Y بگذرد (یعنی b=0) باشد معادله به صورت Y=mx نوشته می شود. همچنین اگر m یا ضریب زاویه مساوی ۱ باشد معادله به صورت Y=X در می آید.

در آزمایشگاه های پزشکی از رگراسیون خطی برای مقایسه دو روش و یا دو سیستم اندازه گیری استفاده می شود. به عنوان مثال اگر معادله رگراسیون پس از محاسبه به شکل Y=X+0.4415 باشد معلوم می شود که اختلاف بین X و Y همیشه 0.4415 خواهد بود. به عبارت دیگر مقدار Y به اندازه 0.4415 از X بیشتر است که این مقدار را "bias" نامیده میشود و مفهوم این bias با bias آزمون تست T فرق دارد. به بیان دیگر Bias در "t-test" با Bias در "LR" تفاوت دارد. مقدار "Bias" در "t-test" با تفاوت دو معدل (x - y) برابر می باشد و نشانه مجموعه میزان خطاهای ثابت و نسبی بین دو سیستم اندازه گیری یا دو روش اندازه گیری می باشد؛ در حالیکه با معادله y=mx+b مقدار b میزان خطای ثابت و مقدار m نماینده میزان خطاهای نسبی (Proportional) بین دو سیستم را به طور جداگانه مشخص می سازد. عموما خطاهای Proportional در ارتباط با تنظیمات و کالیبراسیون دستگاه ها می باشد. در حالی که در تست T این اطلاعات به شکل مجزا حاصل نمی شود.

محاسبه Correlation Coefficient (r) :

مقدار r از فرمول زیر محاسبه می گردد

$$R = \frac{n\Sigma xy - (\Sigma x)(\Sigma y)}{\sqrt{[(n\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2][(n\Sigma x^2) - (\Sigma y)^2]}}$$

n = تعداد اندازه گیری ها

Σx = مجموع داده ها یا نتایج دستگاه رفرانس (ستون اول)

Σ y = مجموع داده ها یا نتایج دستگاه رفرانس (ستون دوم)

محاسبه r در شرایطی که تفاوت بین نتایج بدست آمده خیلی نزدیک به هم نباشد نتیجه لازم را ارائه نمی دهد و میزان قابل قبول r بر اساس CLSI EP9-A (r > 0.975) بوده و هر چه میزان r^2 به یک نزدیک باشد $r^2 \geq 0.950$ نشانگر آن است که رابطه بین دو سیستم اندازه گیری و دو دستگاه کامل می باشد.

در مقایسه بین میانگین های حاصله از دو دستگاه اندازه گیری برای یک ماده مورد نظر از تست t استفاده می شود و برای این کار میانگین های حاصل از دو دستگاه با یکدیگر مقایسه می شوند که به آن Paired-sample-t-test می گویند. مقدار t به این روش از فرمول زیر محاسبه می شود:

$$t = \frac{|\bar{x} - \bar{y}|\sqrt{n}}{sdxy}$$

$\bar{x}$ = میانگین اندازه گیری شده با دستگاه رفرانس

$\bar{y}$ = میانگین اندازه گیری شده با دستگاه ارزیابی شونده

n = تعداد کل اندازه گیری

sdxy = انحراف معیار کل

x − y = bias اختلاف بین میانگین ها

$$t = bias \frac{\sqrt{n}}{sd}$$

sd = انحراف معیار کل

x = انحراف معیار داده های دستگاه رفرانس

y = انحراف معیار داده های دستگاه ارزیابی شونده

sdx + sdy = sdxy

مقدار t وجود خطای سیستماتیک را مشخص می کند نه مقدار آن را. علاوه بر این t به تعداد آزمایش های انجام شده و مقدار sd بستگی دارد. در این نرم افزار محاسبه t بر اساس Two-sided interval تنظیم گشته و تغیرات نتایج را در دو طرف خط میانگین بررسی می کند. لذا زمانی که تعداد آزمون ها کم باشد باید آزمایشات با دقت کافی صورت پذیرد تا خطای سیستماتیک کمتر شود. CLSI حداقل تعداد n یا نمونه ها را در کل محدوده اندازه گیری، برابر ۴۰ در نظر می گیرد.

ارزیابی خطی بودن (اندازه گیری آنالیتیک)

Linearity Protocol

EVALUATION OF LINEARITY (ANALYTICAL MEASURINGRANGE)

In compliance with C.A.P. regulations , the linearity of each analytical methodology is checked a minimum of two times per year at six-month intervals .

- If an assay uses 4 or more standards for calibration and the calibration is carried out at least at 6-month interval, this is deemed to be compliant with the regulation. .
- If either of the two above is not possible, patient samples may be used to demonstrate the linearity of an assay. Refer to performing a linearity study to perform a linearity study using patient samples.
- Linearity must be performed in exactly the same way as patient sample analysis to remove bias. However , each sample of the linearity evaluation must be analyzed in duplicate.
- The results of the linearity evaluation are plotted on the linearity evaluation spreadsheet which must be signed by the Section Head before being instituted. The results are store as a hard copy.
- If the experimental linearity is shown to exceed the limits stated by the manufacturer, the manufacturers limit is adapted. The purpose of the regular checking of linearity is to ensure that the manufactures claim of linearity for a particular test is valid and that the linearity remains valid with reagent lot number changes . Stated manufacturer's linearity s must not be exceeded.

FACTORS TO CONSIDER WHEN PERFORMING LINEARITIES

- Patient samples should be used when evaluating linearity so that the results reflect the true performance capabilities of the particular assay (with reference to the evaluation of Analyte levels in the normal specimen matrix e.g. serum, whole blood, urine or plasma.)
- If patient samples are unavailable, control or calibrator material can be used but only as a last resort. Matrix effects may cause a change in performance of the assay. It is desirable that the linearity reflects the true performance of the analysis of the given Analyte in human fluids.
- Linearity must be performed in exactly the same way as patient sample analysis in order to remove bias. However, each sample of the linearity evaluation must be analyzed in duplicate.
- The results of the linearity evaluation are plotted on the Linearity Evaluation Spreadsheet , which must be signed by the Section Head before being instituted. The results are stored as a hard copy in the Supervisor's office under the relevant Analyte and instrumentation . A copy is also filed in the Linearity Section of the spreadsheet for each relevant test in the Laboratory database.

- If the experimental linearity is shown to exceed the limits stated by the manufacturer, the manufacturer's limit is adopted. The purpose of the regular checking of linearity is to ensure that the manufacturer's claim of linearity for a particular test is valid and that the linearity remains valid with reagent lot number changes. Stated manufacturer's linarites must not be exceeded.

PERFORMING A LINEARITYSTUDY

- Select a patient sample with a low concentration and a patient sample with a high concentration for the Analyte to be tested. Each of these samples should have a concentration approximately at the limit of the manufacturers stated linearity, where possible.

- Mix both samples well. Label five tubes as sample 1, 2, 3, 4 &5.
- Pipette one part of sample 1 (the low-level sample) into tubes 2 and 4 and one part of sample 5 (the high level sample) into tubes 2 and 4.
- Pipette two parts of sample 1 into tubes 2 and 3.Pipette 2 parts of sample 5 into tubes 3 and4.

- Mix all samples well and analyze in duplicate.

	Parts of low per sample	Parts of high per sample
Linearity 1	Neat	0
Linearity 2	3	1
Linearity 3	2	2
Linearity 4	1	3
Linearity 5	0	Neat

Current Linearity can be found in the laboratory test index.

STATEMENT OF DILUTION PROTOCOL

When assayed results exceed the linear range (i.e. exceed the analytical measuring range or AMR), a dilution is required.
Most assays on the instruments do not require a manual dilution, as the instrument will rerun the assay that exceeds the linear limit range using a reduced volume. The correct result is computed by the instrument and transmitted to the LIS via the interface. If the result still exceeds the linearity of the assay provided using the reduced volume, the result is reported as greater than the dilution range. The instrument can provide further dilution for these assays by manual programming. If a clinician desires a quantitation of other assays greater than the current Clinical Reportable Range (CRR), a further dilution can be performed at the discretion of the Section Head. However, a maximum permissible dilution as stated by the manufacturer (i.e. an increase in the dilution factor does not result in a loss of sensitivity to a significant degree) must be used (see package insert).

For manual dilution follow this instruction bellow :

1. Using a 12 X 75 aliquot tube, indicate the specimen accession # and dilution factor to be used on the tube with a permanent marker (e.g. 05-195-01234 X5 dil).

2. Look up the Assay in the current package insert for specific diluent required (saline, water, sample diluent). Using a calibrated Eppendorf pipette, pipette the appropriate dilution liquid into an aliquot tube. Add the appropriate amount of diluent and specimen. Mix thoroughly.
   · Place mixture into a sample cup for analysis. Be sure to indicate the dilution factor on the instrument next to the accession number that you programmed. Multiply final result by factor and report the result.
3. Examples of Dilutions are as follows:

Dilution Factor	Specimen (UL)	Diluent (UL)
X2	100	100
X5	100	400
X10	100	900
X40	20	780

ALL dilutions that are performed must follow the following criteria:

- All dilutions must have the accession number written on the sample cup or tube (where possible) together with the dilution factor(e.g.0401800521x5).
- This information must be taken directly from the primary or aliquot tube used to make the dilution.
- Multiply the result by the dilution factor before verifying.

Reference:

1- Gilbert, R.K. Accuracy of clinical laboratories studied by comparison with definitive methods. American Journal of Clinical Pathology. 70:450-470, 1978

2- Ross, J.W: Evolution of evaluation criteria in the College of American Pathologist Surveys. Arch.Pathol Lab.Med, 112: 334-339, 1988

3- National Committee for Clinical Laboratory Standards: Evaluation of the linearity of Quantitative Analytical Methods. Proposed Guideline. Document EP6-P Villanova. PA, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1986

4- National Committee for Clinical Laboratory Standards: Precision performance of Clinical Chemistry Devices. 2nd ed. Tentative Guideline Document EP5-T2 Villanova, PA. National Committee for Clinical laboratory standards 1992

5- Rhoads. D.G. Implementation of NCCLS and alternative method evaluation protocols, Clin.Chem. 37: 1528-1536, 1991

6- Akbar. Malekpour, Shokoh. Yousefi: Balanced Quality Management in Clinical Laboratories

2007