مدیریت امور آزمایشگاه‌های معاونت درمان دانشگاه علوم‌پزشکی اردبیل

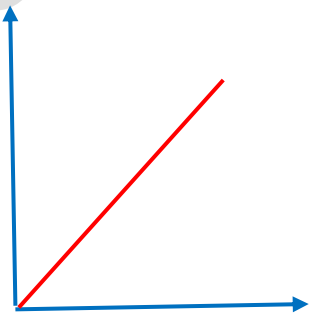
نشریه علمی آزمایشگاه - نوبت دهم (خرداد ماه 1402)

چالش های محاسبه Bias (تورش) در آزمایشگاه:

Bias یک روش اندازه گیری در آزمایشگاه نشانگر میزان خطای سیستماتیک روش مورد نظر می باشد. اگر نتایج بدست آمده از تکرار آزمایش بر روی غلظت های متفاوت آنالیت را بر روی یک نمودار که محور افقی آن نشانگر غلظت واقعی (روش مرجع) و محور عمودی آن غلظت گزارش شده با روش مورد بررسی باشد ثبت نماییم، خطی که نزدیک‌ترین فاصله را با نتایج بدست آمده در غلظت های متفاوت دارد با معادله $y=ax\pm b$ مطابق است. در این معادله x مقدار غلظت واقعی آنالیت، a شیب خط (ضریب خطای سیستماتیک نسبی)، b مقدار ثابت اختلاف از غلظت واقعی (خطای سیستماتیک ثابت) و y نتیجه گزارش شده توسط روش مورد بررسی (غیر مرجع) خواهد بود. شکل 1:

$y= ax \pm b$ If: b=0 and a=1→y= x→ Bias= 0

شکل 1



در روش مرجع ضریب a برابر با 1 و مقدار b صفر می‌باشد. به شرط کافی بودن تعداد دفعات تکرار تست و حذف عدم دقت روش (CV=0) مقدار y-x نشان دهنده میزان Bias روش اندازه گیری در غلظت مورد نظر می باشد.

نکته: معادله خط فوق که با آنالیز رگرسیون خطی بدست می آید تنها در صورتی که ضریب a بیشتر از 0.975 باشد قابل اعتماد بوده و در غیر این صورت باید با افزایش تکرار تست و دامنه غلظت مورد اندازه گیری آنالیت و یا با استفاده از سایر روش‌های رگرسیون مناسب آن را قابل اعتماد نمود. هرچه تعداد دفعات تکرار آزمایش بیشتر و نیز دامنه غلظت‌های اندازه گیری شده بیشتر باشد معادله خط بدست آمده دقیق تر خواهد بود.

همانطور که از توضیحات فوق مشخص می باشد برای محاسبه Bias باید از میانگین نتایج تکرار تست در غلظت مورد نظر استفاده کرد تا اثر عدم دقت به حداقل برسد.

نکته: عدم دقت نتیجه تست با رادیکال تعداد دفعات تکرار تست نسبت عکس دارد و می توان با افزایش دفعات تکرار تست و استفاده از میانگین میزان آن را به حداقل رساند:

عدم دقت نتیجه تست $= CV/\sqrt{N}$

برای مثال اگر بخواهیم میزان عدم دقت نتیجه تست (CV) را نصف کنیم باید از میانگین 4 دفعه تکرار تست استفاده کنیم.

اگر روش اندازه گیری بدون خطای سیستماتیک نسبی (proportional systematic error) باشد ضریب x (یعنی a) مساوی 1 خواهد بود. در این صورت میزان Bias با مقدار خطای سیستماتیک ثابت (constant systematic error) برابر است ($y=x\pm b$) در نتیجه مقدار تورش برحسب واحد اندازه گیری آنالیت در تمامی غلظت‌ها یکسان است. درعین حال دقت کنید که میزان Bias برحسب درصد در غلظت‌های مختلف کاملا متفاوت می باشد.

اگر روش اندازه گیری بدون خطای سیستماتیک ثابت باشد میزان Bias در هر غلظتی با مقدار (ax-x) برابر است. توجه کنید که در این حالت میزان Bias برحسب درصد در تمامی غلظت های آنالیت یکسان خواهد بود ولی برحسب واحد اندازه گیری ماده مورد نظر مقدار آن کاملا متفاوت می باشد.

Quality Control

به طور معمول روش های به کار گرفته شده در آزمایشگاه های طبی به درجاتی واجد هر دو نوع خطای سیستماتیک ثابت و نسبی (نسبت به روش مرجع) هستند فلذا برای محاسبه Bias واقعی نیازمند محاسبه آن در یک غلظت مشخص آنالیت و استفاده از فرمول معادله خط (بدست آمده با رگرسیون) می باشیم. به همین دلیل است که همانطور که در ادامه مطلب بیان خواهد شد محاسبه میزان واقعی و دقیق Bias تست در یک آزمایشگاه طبی بسیار سخت و تقریبا در کشور ما غیرممکن است.

سیگمامتری: معیاری برای نشان دادن احتمال گزارش نتایج اشتباه (دارای اهمیت بالینی) بیماران برای یک تست در آزمایشگاه می باشد. برای محاسبه آن پس از کسر میزان Bias از خطای کل مجاز، عدد به دست آمده را بر SD تقسیم می کنیم:

$$Sigma = (TEa - |Bias|)/SD$$

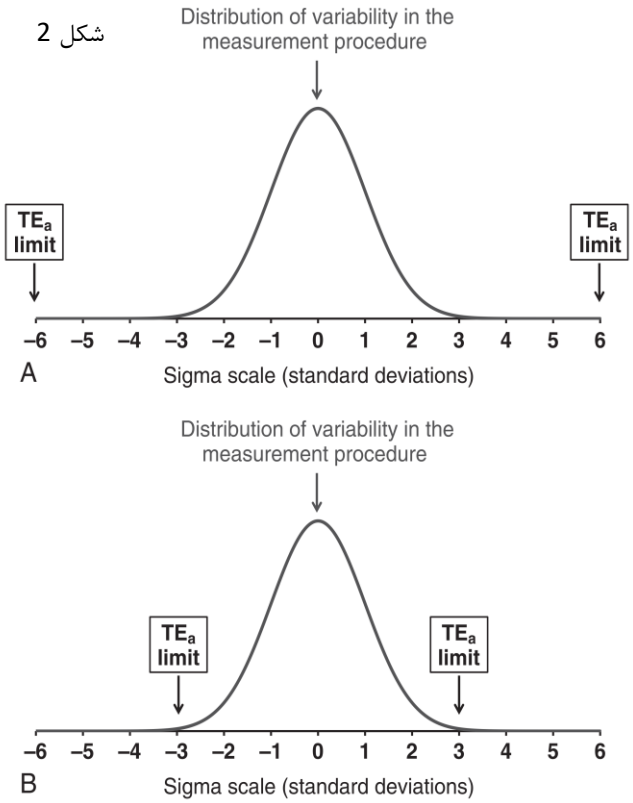
نکته: در این فرمول واحدهای مقادیر باید یکسان باشد و اگر خطای کل مجاز و تورش به صورت درصد بیان بشوند، به جای SD از CV استفاده می شود:

$$Sigma = (TEa\% - |Bias|\%)/CV$$

در حقیقت مقدار سیگمای تست بیانگر میزان حاشیه امن برای درستی نتایج گزارش شده بیماران می باشد و برابر فاصله میانگین نتایج حاصل از تکرار آزمایش در غلظت مشخصی از آنالیت با حدود حداکثر مقدار خطای مجاز تست بر حسب واحد SD است. هر چه سیگمای تست بالاتر باشد احتمال گزارش نتایج اشتباه (مهم) برای بیمار کمتر خواهد بود و بنابرین نیاز به کنترل های کمتر، قوانین رد جواب سهل گیرانه تر و به طور کلی نظارت کمتری خواهد بود.

برعکس در سیگمای پایین به دلیل احتمال بیشتر گزارش جواب نادرست (دارای اهمیت بالینی) برای بیمار، نیازمند استفاده از نمونه های کنترل بیشتر، در فواصل کمتر و قوانین رد جواب سخت گیرانه تری می باشیم. شکل 2 بیانگر ماهیت سیگمامتری و کاربرد آن در آزمایشگاه می باشد:

شکل 2



همانطور که در شکل مشخص می باشد در تستی با سیگمای کم (سیگمای 3درشکل B) با رخ دادن کوچکترین انحراف در روش اندازه‌گیری نتیجه تست بیمار اشتباه و خارج از محدوده خطای مجاز می گردد در حالی که در صورت بالا بودن سیگما (سیگمای 6 در شکل A) حتی با بروز خطا نتایج بیماران به احتمال زیاد (وابسته به بزرگی میزان خطا) در محدوده خطای مجاز و قابل قبول خواهد بود.

- ✓ در صورتی که سیگمای یک تست 1 باشد احتمال گزارش نتیجه اشتباه (دارای اهمیت بالینی) حدود 32٪ است.
- ✓ درصورتی که سیگمای یک تست 2 باشد احتمال گزارش نتیجه اشتباه حدود 5٪ است.

- ✓ در صورتی که سیگمای یک تست 3 باشد احتمال گزارش نتیجه اشتباه حدود 0.3٪ است. این به این معنی است که اگر آزمایشگاه ماهانه 3000 مورد از یک تست را انجام دهد با سیگمای 3 احتمالا نتیجه 9 بیمار را اشتباه گزارش خواهد کرد.

نکته: حداقل مقدار سیگمای تست توصیه شده در آزمایشگاه های طبی 3 می باشد.

نکته: معمولا احتمال بروز خطا به صورت DPMO یعنی احتمال وقوع در یک میلیون بیان می شود. این احتمال در سیگمای سه 2700 و در سیگمای شش 0.002 در میلیون می باشد!!

با توجه به عدم دسترسی به روش های آزمایشگاهی رفرانس، غلظت های رفرانس از آنالیت و نمونه های کنترل صحت، در عمل محاسبه میزان واقعی Bias در آزمایشگاه های طبی مقدور نمی باشد. به ناچار در کتب مرجعی همانند Tietz و Henry نیز نویسنده (W. Greg Miller) توصیه می کند که به دلیل سختی و غیرعملی بودن محاسبه مقدار واقعی Bias مقدار آن را در آزمایشگاه خود برای محاسبه سیگما (و تنها برای محاسبه سیگما) صفر در نظر بگیریم. ولی باید دقت کرد که در این صورت سیگمای محاسبه شده به طور کاذب بزرگتر از مقدار واقعی آن خواهد بود و در نتیجه احتمال گزارش نتایج اشتباه (دارای اهمیت بالینی) با به کار بردن تعداد نمونه کنترل، فواصل استفاده از کنترل و قوانین وستگارد توصیه شده بیشتر می شود.

بعضی از اساتید و همکاران استفاده از نتایج نمونه کنترل خارجی (EQAP) را برای محاسبه Bias پیشنهاد می‌کنند. اگر چه برنامه کنترل کیفی خارجی و مقایسه نتایج آزمایشگاه با آزمایشگاه‌های هم گروه (peer group) برای بررسی سازگاری عملکرد و نیز نتایج گزارش شده یک آزمایشگاه با سایر آزمایشگاه‌ها بسیار مفید است ولی به دلایل زیر Bias بدست آمده از طریق محاسبه مقدار اختلاف نتیجه یک آزمایشگاه با میانگین نتیجه سایر آزمایشگاه‌های هم گروه برای سیگمامتری قابل اعتماد و مناسب نیست:

① Bias اختلاف میانگین نتایج بدست آمده از تکرار آزمایش با مقدار واقعی است تا اثر عدم دقت روش (پراکندگی نتایج) بر نتیجه بدست آمده حذف شود. به طور معمول امکان تکرار تست (مثلا 10بار) بر روی نمونه مجهول وجود ندارد. برای مثال فرض کنید CV یک آزمایشگاه برای تست گلوکز 2٪ باشد. در این صورت با یک بار آزمایش بر روی نمونه کنترل خارجی که میزان گلوکز آن 100mg/dl باشد با فرض عدم وجود Bias در 95٪ موارد نتیجه بین 96 تا 104 میلی گرم بر دسی لیتر متغیر خواهد بود. (در این مثال مقدار عددی CV معادل SD می باشد) همانطور که پیش تر بیان شد Bias، اختلاف میانگین نتایج بدست آمده از تکرار تست با مقدار واقعی است. عدم توجه به این مهم موجب اشتباه در محاسبه میزان تورش و در نتیجه سیگمای تست خواهد شد. اگر خطای مجاز گلوکز را 8٪ در نظر بگیریم:

$$\textbf{سیگمای واقعی با تورش صفر} = \frac{8\%-0\%}{2\%} = 4$$

$$\textbf{بازه سیگمای محاسبه شده با توجه به پراکندگی نتیجه در یک بار آزمایش} = \frac{8\%-(0\% \rightarrow 4\%)}{2\%} = 4 \rightarrow 2$$

همانطور که مشاهده می شود در مثال فوق اگر از میانگین جواب تکرار تست در آزمایشگاه استفاده نشود بازه تورش می تواند از صفر تا 4 و سیگمای محاسبه شده بین 2 تا 4 متغیر باشد.

در حالی که سیگمای 2 برای یک تست در آزمایشگاه طبی غیرقابل قبول است ولی سیگمای 4 اگر چه عالی نیست ولی در محدوده مورد قبول می باشد.

② به دلیل هم رفتار نبودن نمونه های مجهول کنترل خارجی استفاده شده در کشورمان با نمونه بیمار، نتایج بدست آمده در آزمایشگاه ها علی‌رغم یکسان بودن نوع دستگاه و کیت ولی به دلیل تفاوت در سری ساخت (lot) کیت و محلول ها، برحسب میزان شیوع استفاده از یک لات بخصوص بین مراکز شرکت کننده،

Quality Control

میانگین نتایج متفاوت خواهد بود. برای مثال اگر از بین 100 آزمایشگاه شرکت کننده 90 آزمایشگاه از یک سری ساخت کیت گلوکز استفاده کنند و میانگین بدست آمده از نتایج آنها 100mg/dl باشد و میانگین نتیجه 10 آزمایشگاه دیگر که از سری ساخت دیگری استفاده کرده‌اند 105mg/dl باشد، میانگین نتایج کل آزمایشگاه ها 100.5 mg/dl خواهد بود. اگر معیار محاسبه Bias اختلاف از میانگین نتایج آزمایشگاه های هم گروه باشد 10 آزمایشگاه دوم تورشی برابر 4.5 واحد داشته (در مقایسه با نیم واحد Bias گروه اول) و سیگمای محاسبه شده در شرایط CV برابر به صورت کاذب بسیار متفاوت خواهد بود. اگر بطور فرضی CV تمامی آزمایشگاه ها را 2٪ در نظر بگیریم و خطای مجاز تست گلوکز را 8٪ (CLIA) نتایج زیر به دست خواهد آمد:

$$\text{سیگمای گروه اول (اکثریت)} = \frac{\mathbf{8\%-0.5\%}}{\mathbf{2\%}} = 3.7$$

$$\text{سیگمای گروه دوم (اقلیت)} = \frac{\mathbf{8\%-4.5\%}}{\mathbf{2\%}} = 1.7$$

③. میانگین نتایج به دست آمده از آزمایشگاه ها لزوما نشان دهنده مقدار واقعی آنالیت مورد آزمایش (مبنای محاسبه تورش در سیگما متری) نیست و در بهترین حالت تنها می تواند نشان دهنده میزان سازگاری نتایج یک آزمایشگاه با سایر آزمایشگاه های هم گروه باشد.

④. در برنامه های کنترل کیفی خارجی موجود در کشورمان تنها از یک غلظت آنالیت به عنوان نمونه مجهول استفاده می شود. نتیجه اختلاف در یک غلظت نمی تواند ملاک مناسبی برای محاسبه Bias باشد. با توجه به اینکه با به کارگیری نمونه مجهول (تنها با یک سطح از غلظت آنالیت) امکان تعیین نوع خطای سیستماتیک آزمایشگاه (ثابت یا نسبی) وجود ندارد، Bias محاسبه شده واقعی و قابل اعتماد نخواهد بود. برای مثال فرض کنید آزمایشگاهی دارای خطای سیستماتیک در اندازه گیری گلوکز باشد و قند نمونه مجهول کنترل خارجی با میانگین نتایج آزمایشگاه های هم گروه برابر 100mg/dl را 110 گزارش نماید. مشخص نیست که این مقدار خطا (10mg/dl) مربوط به خطای سیستماتیک ثابت است و یا مربوط به وجود خطای سیستماتیک نسبی و یا ترکیبی از هر دو!! در حقیقت نمی دانیم میزان خطای سیستماتیک بطور ثابت 10mg/dl است و یا 10٪ از میزان غلظت واقعی گلوکز؟ آیا آزمایشگاه قند 200mg/dl را 210 گزارش خواهد کرد و یا 220؟

اختلاف گزارش شده از مقدار واقعی (و یا میانگین گروه) در یک غلظت، هم می تواند ناشی از مقدار ثابت b باشد و هم به دلیل ضریب a. بنابرین با بررسی نتیجه یک غلظت از آنالیت مورد آزمایش حتی به فرض حذف اثر عدم دقت (از طریق تکرار آزمایش به تعداد کافی) نمی توان نوع و مقدار خطای سیستماتیک (Bias) را بدست آورد.

⑤. نتایج نمونه مجهول برنامه کنترل خارجی معمولا با فاصله زمانی زیاد به دست آزمایشگاه می رسد و این امر کاربرد استفاده از نتیجه آن را (برای محاسبه تورش) به دلیل تغییر نوع و سری ساخت کیت های مورد استفاده در آزمایشگاه ها محدود می نماید.

اگر چه محاسبه Bias واقعی برای به دست آوردن سیگمای تست بسیار مشکل و عملا در آزمایشگاه های طبی غیرممکن است و به ناچار توصیه می شود آن را صفر در نظر بگیریم ولی محاسبه آن برای استفاده در موارد دیگر امکان‌پذیر و مفید می باشد. مثلا محاسبه تورش بین یک روش یا دستگاه با روش و دستگاه دیگر (احتمالا قابل اعتمادتر) و یا میزان تورش نتایج یک دستگاه یا روش اندازه گیری از میانگین نتایج تمامی دستگاه ها و روش های به کار رفته در یک آزمایشگاه یا آزمایشگاه های یک مرکز تشخیصی درمانی برای تست مورد نظر امکان پذیر و مفید می باشد.

همانطور که پیشتر بیان شد صفر در نظر گرفتن تورش موجب افزایش کاذب سیگمای محاسبه شده می شود و از طرفی نتایج برنامه کنترل کیفی خارجی (در کشور ما) نیز برای بدست آوردن Bias مناسب نبوده و باعث خطا در برآورد سیگما می شود. پس چاره کار چیست؟

Quality Control

یک راه مفید و قابل اعتمادتر استفاده از Bias ادعا شده در بروشور اطلاعات کیت و تجهیزات مورد استفاده به شرط اعتبار کافی و مقایسه با روش مرجع اندازه گیری (Traceable) آنالیت مورد نظر و نیز تصدیق (verification) در آزمایشگاه می باشد. بدیهی است دراین حالت مقدار تورش بدست آمده تنها مربوط به کیت و روش بوده و Bias موجود در خود آزمایشگاه را شامل نمی‌شود. در نتیجه سیگمای محاسبه شده همچنان به صورت کاذب از میزان واقعی کمتر خواهد بود اگرچه مقدار آن از حالتی که تورش را صفر در نظر بگیریم بیشتر و واقعی تر می باشد. مثال زیر نحوه استفاده از Bias ادعا شده در اطلاعات مربوط به کیت را (پس از تصدیق توسط آزمایشگاه) بهتر روشن می نماید:

در اطلاعات کیت گلوکز فرضی A ادعا شده که پس از مقایسه با روش مرجع میزان تورش مشاهده شده مطابق با معادله خط زیر است:

$$y=1.02\,x + 2$$

همچنین عدم دقت ادعا شده برای تست 1 درصد است.

از طرفی میزان CV در آزمایشگاه مورد نظر برای تست گلوکز 2% می باشد. سیگمای تست گلوکز را در غلظت هایی از گلوکز که از نظر تصمیم گیری بالینی اهمیت بیشتری دارند محاسبه می کنیم. برای مثال میزان Bias کیت در غلظت 96 mg/dl که در تصمیم گیری پزشک برای تشخیص دیابت اهمیت دارد به صورت زیر محاسبه می شود:

$$y=aX\pm b$$

$$y= (1.02 \times 96) + 2 = 99.9 \text{ mg/dl}$$

$$\text{Bias} = 99.9 – 96 = 3.9 \text{ mg/dl} \rightarrow (3.9/96\times100 = 4\%)$$

بر اساس توصیه CLIA حداکثر خطای مجاز گلوکز 8٪ می باشد. از طرفی عدم دقت (CV) آزمایشگاه برای تست گلوکز 2٪ است. پس:

$$SIGMA = (\%TEa - \%|\ Bias|) /CV$$

$$SIGMA = (8\% - 4\%) / 2\% = 2$$

بنابراین سیگمای تست گلوکز در آزمایشگاه مورد نظر (در غلظت دارای اهمیت بالینی(96 mg/dl) برابر 2 می باشد. دقت کنید که اگر تورش را صفر در نظر می گرفتیم میزان سیگمای محاسبه شده 4 می شد:

$$SIGMA = (8\% - 0\%) / 2\% = 4$$

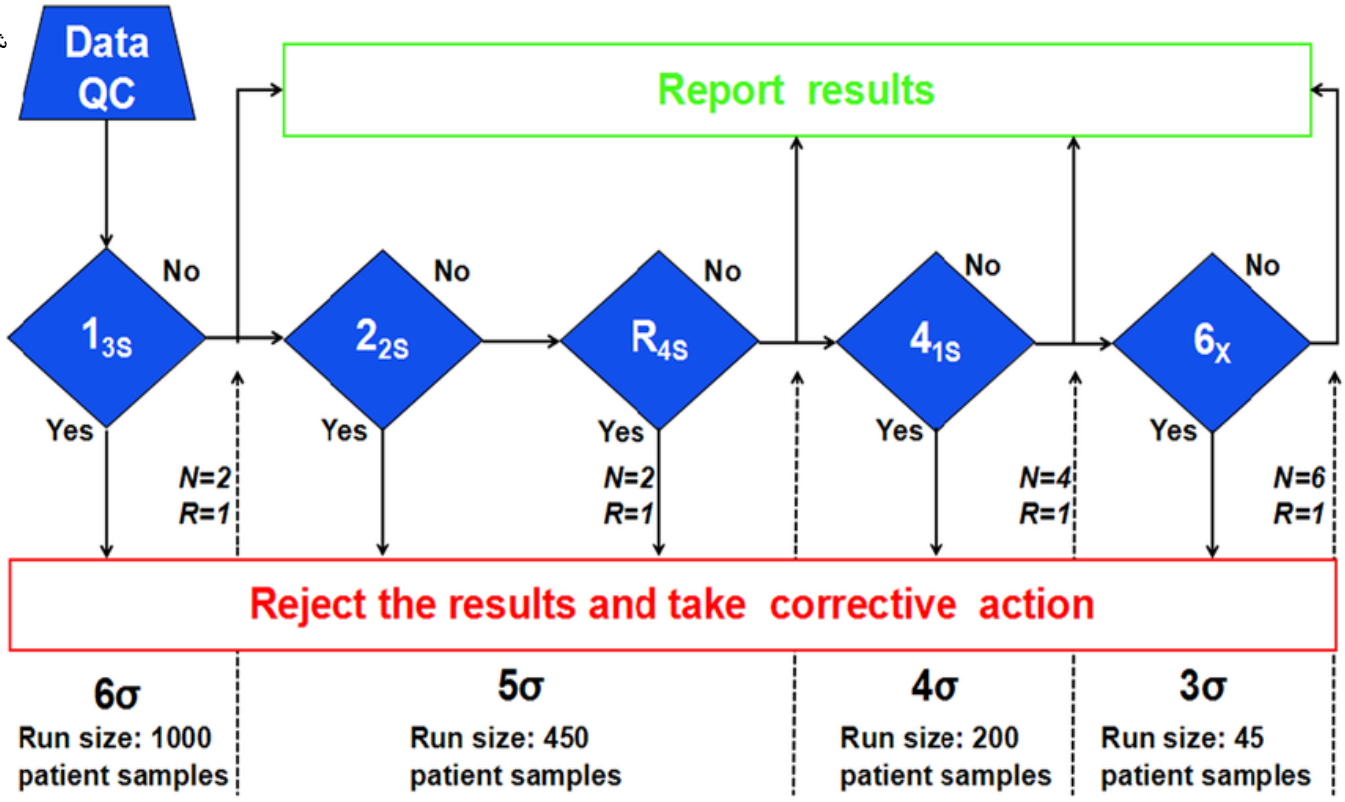
همانطور که مشخص است تفاوت دو حالت بسیار قابل توجه است. در حالی که سیگمای 2 برای یک تست در آزمایشگاه طبی غیرقابل قبول است ولی سیگمای 4 اگر چه عالی نیست ولی در محدوده مورد قبول می باشد.

برنامه ریزی برای کنترل کیفی داخلی بر اساس سیگمای تست:

همان طور که پیشتر اشاره شد هر چقدر سیگمای تست بیشتر باشد فاصله نتایج گزارش شده با مرز و حدود خطای مجاز مورد قبول بیشتر خواهد بود. در نتیجه احتمال گزارش جواب اشتباه (دارای اهمیت بالینی) برای نمونه بیمار کمتر بوده و نیازمند کنترل کمتر و قوانین رد جواب سهل گیرانه تری در برنامه کنترل کیفی تست مورد نظر در آزمایشگاه هستیم. شکل زیر تعداد نمونه کنترل مورد نیاز، فواصل به کار بردن نمونه کنترل بر حسب تعداد بیمار (Run size) و قوانین وستگارد توصیه شده را براساس مقدار سیگمای محاسبه شده تست در آزمایشگاه نشان می دهد:

Quality Control

شکل 3



برای مثال برای تستی با سیگمای 6 (world class) به کار بردن 2 نمونه کنترل برای هر 1000 (Run size) بیمار و استفاده تنها از قانون 1_{3S} کفایت می کند. در حالیکه برای تستی با سیگمای 4 نیازمند استفاده از 4 نمونه کنترل برای هر 200 بیمار و به کارگیری قوانین 1_{3S},2_{2S},R_{4S} و 4_{1S} هستیم تا از ثبات عملکرد روش و به حداقل رساندن گزارش نتایج اشتباه بیمار اطمینان حاصل شود.