

روش کار حسابگر "خطی بودن"

LINEARITY

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 مناسب نمایشگر باشد. 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.

در ارزشیابی روش‌ها، اولین ویژگی‌یی که باید بررسی شود "خطی بودن" است. این بررسی برای شناسایی حد بالای سنجش است؛ یعنی شناسایی بالاترین غلظتی که می‌توان بدون نیاز به رقیق کردن اندازه‌گیری کرد.

برای انجام این بررسی نیاز است که دست کم ۵ غلظت گوناگون از آنالیت مورد نظر را داشت. غلظت‌ها باید طوری باشد که از صفر یا نزدیک به صفر شروع شود و تا غلظت‌های بالای مهم از نظر بالینی ادامه یابد.

برای در دست داشتن غلظت‌های گوناگون می‌توان یکی از کارهای زیر را انجام داد:

- خرید ماده‌ی تجاری با غلظت‌های گوناگون؛ این مواد را شرکت‌های سازنده‌ی دستگاه‌ها و کیت‌ها تهیه و در اختیار می‌گذارند،
- رقیق کردن یک ماده‌ی تجاری با غلظت بالا (مثلاً استاندارد بیلیروبین با غلظت بالا)، یا رقیق کردن یک نمونه‌ی غلیظ که غلظت آن با روش قابل اطمینانی مشخص شده است و به دست آوردن غلظت‌های گوناگون،
- و تهیه‌ی نسبت‌های گوناگون از یک نمونه‌ی غلیظ که به روش قابل اطمینانی تعیین مقدار نشده است.

در زیر روش استفاده از حسابگر برای غلظت و نسبت به ترتیب ارائه شده است.

❖ ارزیابی خطی بودن با تهیه‌ی غلظت‌های گوناگون

الف) تهیه‌ی غلظت‌ها با استفاده از حسابگر "تهیه‌ی غلظت‌ها - نسبت‌ها":

مثال: می‌خواهیم استاندارد بیلیروبین با غلظت ۲۰.۶ با آب مقطر رقیق کنیم و ۶ غلظت گوناگون تهیه کنیم.

۱- در اولین خانه‌ی حسابگر از سمت چپ، حرف "C" را می‌نویسیم تا تعیین کنیم که بناست غلظت‌های گوناگون تهیه کنیم (C: Concentration).

۲- با وارد کردن حرف C، عنوان‌های دو خانه‌ی طرف راست نمایان می‌شود که از ما می‌خواهد غلظت محلول‌هایی را که بناست به نسبت‌های گوناگون با هم ترکیب شوند تعیین کنیم. در این مثال غلظت "بالا" برابر ۲۰.۶ است، و چون از آب مقطر برای رقیق کردن استفاده می‌کنیم غلظت "پایین" صفر است.

توجه: چنانچه گاهی برای این که زمینه‌ی نمونه به هم نخورد بخواهیم به جای آب مقطر از نمونه‌ای با غلظت کم استفاده کنیم باید غلظت آن نمونه را زیر عنوان "پایین" وارد کنیم. مثلا اگر در این مثال از سرمی با غلظت بیلیروبین ۰.۲ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر برای ساختن سطوح گوناگون استفاده کنیم، آنگاه باید زیر خانه‌ی "پایین" عدد ۰.۲ را وارد کنیم.

۳- سپس باید تعیین کنیم که چند سطح نیاز داریم. این حسابگر می‌تواند محاسبات مربوط به تهیه‌ی غلظت‌های گوناگون تا ۱۰ سطح را انجام دهد. برای مثال ما، عدد ۶ را زیر عنوان "تعداد سطح" وارد می‌کنیم.

۴- زیر عنوان "حجم مورد نیاز" تعیین می‌کنیم که به چه حجمی از محلول‌ها نیاز داریم. فرض کنیم برای این مثال ۱ میلی‌لیتر از هر سطح کافی باشد، بنا بر این عدد ۱ را وارد می‌کنیم.

در شکل زیر اطلاعات وارد شده نمایش داده شده است:

مقایسه‌ی نسبی یا غلظتی؛ R یا C؟	غلظت محلول‌ها/نمونه‌ها		تعداد سطح	حجم مورد نیاز (mL)
	پایین	بالا		
C	0	20.6	6	1

پس از وارد کردن اطلاعات بالا، حجم‌های لازم از هر محلول با دو واحد میلی‌لیتر و میکرولیتر در جدول سمت راست نمایش داده می‌شود (نمایش با دو واحد برای این است که کاربر بتواند بسته به مورد از سمپلر یا پیپت برای ریختن حجم‌ها استفاده کند). در آخرین ستون سمت راست، غلظت نهایی هر سطح نمایش داده می‌شود:

تعداد لوله	حجم‌های مورد نیاز				غلظت نمونه‌ها
	میلی‌لیتر (mL)		میکرولیتر (uL)		
	غلظت بالا	غلظت پایین	غلظت بالا	غلظت پایین	
1	0.000	1.000	0	1000	0
2	0.200	0.800	200	800	4.12
3	0.400	0.600	400	600	8.24
4	0.600	0.400	600	400	12.36
5	0.800	0.200	800	200	16.48
6	1.000	0.000	1000	0	20.6

با رفتن به صفحه‌ی "برگه‌ی کار" می‌توان نتیجه‌ی محاسبه را بر روی برگه‌ی A5 چاپ کرد و برای تهیه‌ی رقت‌ها در دسترس گذاشت.

(ب) محاسبه‌ی خطی بودن:

پس از تهیه‌ی غلظت‌های بالا باید هر کدام را دست کم ۳ بار سنجید و نتایج را در حسابگر خطی بودن وارد کرد. این حسابگر دارای ۱۰ ردیف برای ۱۰ سطح، و ۵ ستون برای ۵ بار سنجش هر سطح است. خانه‌های مربوط به ۳ بار سنجش بر روی ۵ سطح اول رنگی شده‌اند تا یادآور حداقل‌های سطح و سنجش باشد (حداقل ۵ سطح و حداقل ۳ بار سنجش).

فرض کنیم ۳ بار سنجش بر روی ۶ رقت تهیه شده در این مثال نتایج زیر به دست آمده است:

- غلظت ۰.۰۹۵: ۰.۱۳ - ۰.۱۱
- غلظت ۴.۱۵: ۴.۱۲ - ۴.۱۶ - ۴.۱۰
- غلظت ۸.۳۰: ۸.۲۴ - ۸.۴۱ - ۸.۲۸
- غلظت ۱۲.۱۰: ۱۲.۳۶ - ۱۲.۵ - ۱۲.۱۵
- غلظت ۱۶.۱۰: ۱۶.۴۸ - ۱۵.۸۹۵ - ۱۶.۱۱
- غلظت ۲۰: ۱۸.۳۵ - ۱۸.۷۷ - ۱۸.۳۸

حال باید این اعداد را در حسابگر خطی بودن وارد کنیم:

(۱) اولین کار این است که تعیین کنیم با غلظت‌ها کار می‌کنیم یا با نسبت‌ها. برای این مثال چون غلظت‌های مشخص تهیه کرده‌ایم، زیر عنوان "C/R": "؟" حرف C را وارد می‌کنیم. غلظت‌های نهایی حساب شده را به ترتیب از غلظت کم به زیاد در خانه‌های زیرین این ستون وارد می‌کنیم.

(۲) سپس باید نتایج به دست آمده را وارد کنیم.

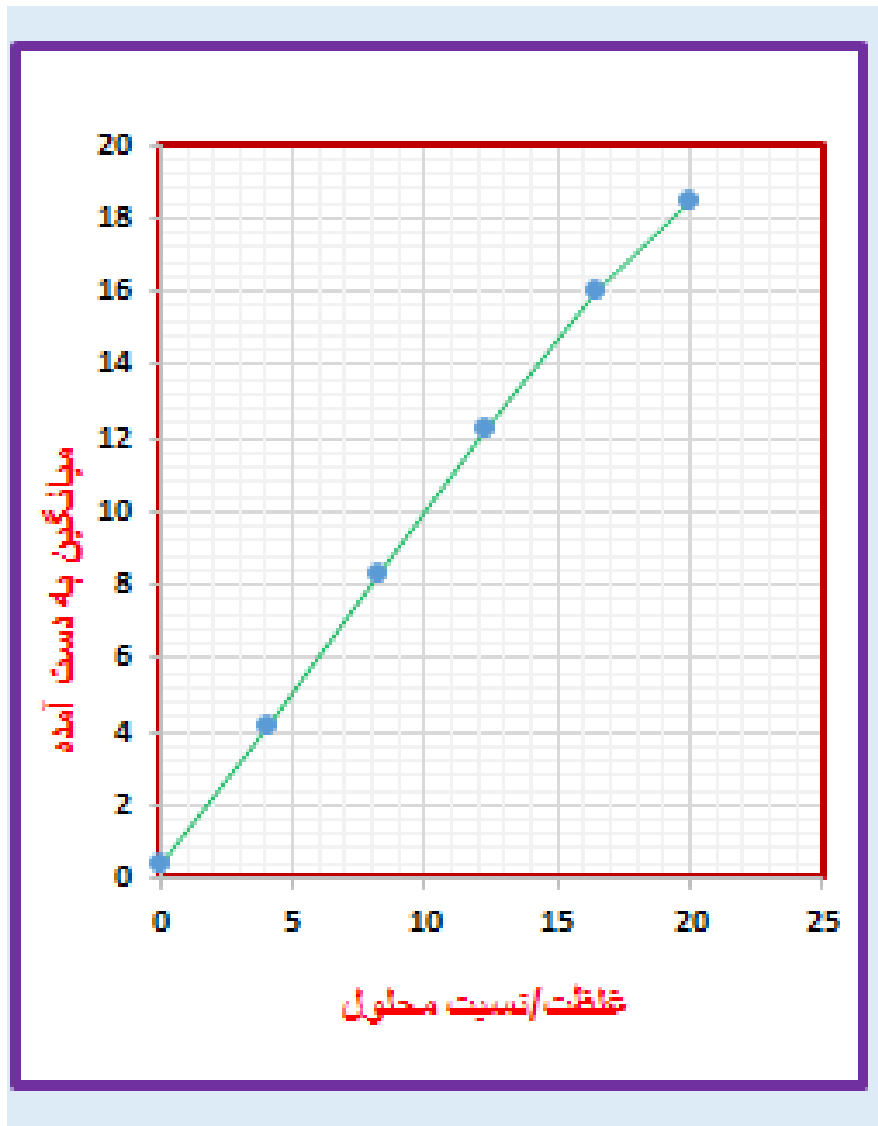
در شکل زیر جدول کامل شده نمایش داده شده است:



شماره	C/R: ?	سنجش # ۱	سنجش # ۲	سنجش # ۳	سنجش # ۴	سنجش # ۵	میانگین	اختلاف
	C							
1	0	0.11	0.13	0.95			0.3967	0.39667
2	4.12	4.1	4.16	4.15			4.1367	0.01667
3	8.24	8.28	8.41	8.3			8.33	0.09
4	12.36	12.15	12.5	12.1			12.25	-0.11
5	16.48	16.11	15.89	16.1			16.033	-0.44667
6	20	18.38	18.77	18.35			18.5	-1.5
7								
8								
9								
10								

پس از وارد کردن این داده‌ها، میانگین هر ردیف در ستون دوم از طرف راست نمایش داده می‌شود. در ستون "اختلاف"، اختلاف بین میانگین هر ردیف با غلظت نمونه محاسبه و نمایش داده می‌شود. همانطور که دیده می‌شود میانگین غلظت نمونه‌ی پنجم حدود ۰.۴۴ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر، و میانگین نمونه‌ی ششم ۱.۵ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر از غلظت مورد انتظار کمتر است.

همچنین میانگین‌های حاصل در مقابل غلظت‌های مورد انتظار بر روی نمودار نمایش داده می‌شود. همانطور که در شکل زیر دیده می‌شود با رفتن به طرف غلظت‌های ۱۶.۴۸ و ۲۰ نمودار از حالت خط راست خارج شده و به سمت پایین متمایل می‌شود:



حال باید داوری کرد که آیا این مقدار اختلاف از نظر بالینی مهم است یا نه. برای این کار باید در نظر داشته باشیم که کار ما تا جایی قابل قبول است که خطای کل ما کمتر از خطای کل مجاز باشد:

- خطای کل مجاز برای سنجش بیلیروبین در جدول CLIA برای غلظت‌های بالا برابر ۲۰٪ است.
- همانطور که می‌دانیم خطای کل ما از فرمول روبرو حساب می‌شود: $TE = B + CV$
- برای حساب کردن خطای کل، نیاز داریم که CV سنجش در این سطوح را بدانیم. فرض کنیم که CV این سنجش برابر ۳٪ باشد.
- نامیزانی (B) برای هر سطح را هم باید به درصد حساب کنیم:

$$(0.44 / 16.48) \times 100 = 2.7\%$$

$$(1.5 / 20) \times 100 = 7.5\%$$

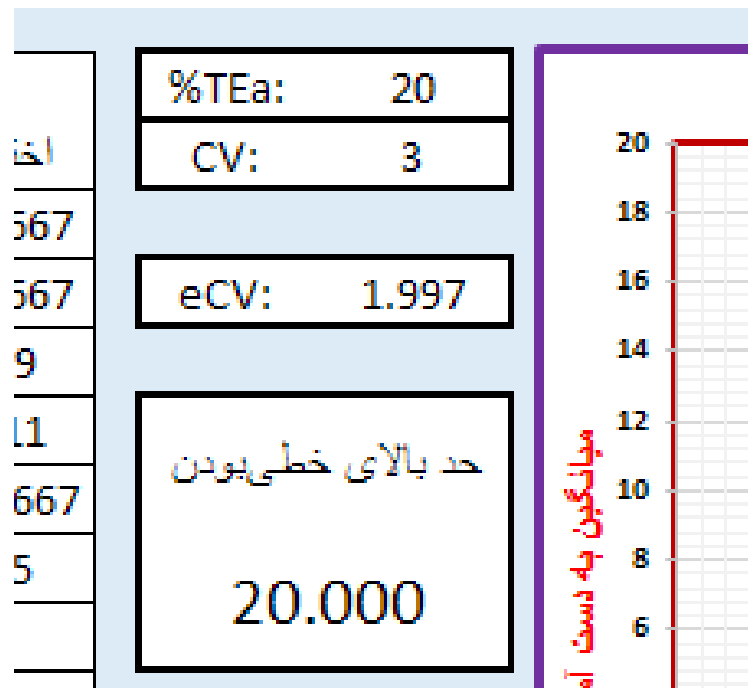
- خطای کل برای سطوح پنجم و ششم می‌شود:

$$TE_{16.48} = B + 2CV = 2.7\% + 2 \times 3\% = 8.7\%$$

$$TE_{20} = B + 2CV = 7.5\% + 2 \times 3\% = 13.5\%$$

همانطور که دیده می‌شود خطای کل در هر دو سطح از خطای کل مجاز کوچکتر است. بنا بر این، اگر چه با نزدیک شدن به غلظت ۲۰ نتایج ما کمی از مقدار مورد انتظار کمتر می‌شود اما این مقدار به اندازه‌ای نیست که بتواند از نظر بالینی مشکل‌ساز باشد.

برای این که حسابگر محاسبه‌های بالا را انجام دهد، باید مقادیر خطای کل مجاز و انحراف معیار را در خانه‌های مربوط وارد کرد:



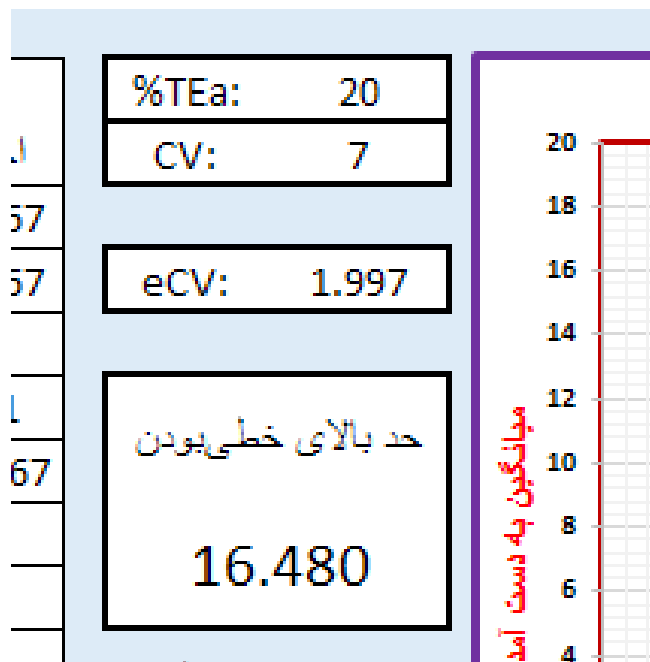
این یعنی این که تا غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر نیازی به رقیق کردن نمونه نیست.

به عنوان مثالی دیگر فرض کنیم که انحراف معیار روش ما عددی بزرگتر باشد، مثلاً ۷٪. در این صورت خطای کل ما در سطح ۲۰ به اندازه‌ای بزرگ خواهد بود که دیگر نمی‌توان به نتایج به دست آمده در آن سطح اطمینان کرد:

$$TE_{16.48} = B + 2CV = 2.7\% + 2 \times 7\% = 16.7\%$$

$$TE_{20} = B + 2CV = 7.5\% + 2 \times 7\% = \mathbf{24.5\%}$$

همانطور که دیده می‌شود اگرچه خطای کل ما در سطح ۲۰ قابل قبول نیست، اما هنوز هم خطای کل در سطح حدود ۱۶ قابل قبول است؛ این یعنی این که مرز خطی بودن حدود ۱۶ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر است و باید در صورت به دست آمدن غلظت‌های بالاتر از ۱۶ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر باید نمونه را رقیق و دوباره سنجید.



نکته:

در کتاب Basic Method Validation نوشته‌ی پروفیسور وستگارد که منبع مورد استفاده برای تهیه‌ی مجموعه حسابگرهای ارزشیابی روش‌هاست، بیان شده است که اولین کار در ارزشیابی یک روش، بررسی خطی بودن است. اشکالی که در اینجا نمایان می‌شود این است که وقتی بناست ارزیابی خطی بودن اولین کار باشد و بعد برویم سراغ ارزیابی‌های دیگر از جمله ارزیابی انحراف معیار، آنگاه برای محاسبه‌ی خطی بودن انحراف معیار را که هنوز تعیین نشده است از کجا به دست آوریم؟!

پیشنهاد من این است که برای حل این مشکل می‌توان از همین سنجش‌های انجام شده برای خطی بودن، انحراف معیار را برآورد کرد. برای این منظور در حسابگر تهیه شده حد بالای محدوده اطمینان ۹۹٪ برای انحراف معیار محاسبه و مقابل عنوان eCV (estimated CV) نمایش داده می‌شود تا در صورت دسترسی نداشتن به انحراف معیار از آن استفاده کرد.

❖ ارزیابی خطی بودن با تهیه‌ی نسبت‌های گوناگون

(ب) تهیه‌ی نسبت‌ها با استفاده از حسابگر "تهیه‌ی غلظت‌ها - نسبت‌ها":

مثال: می‌خواهیم خطی بودن یک کیت سنجش گلوکز جدید را با تهیه‌ی ۶ نسبت گوناگون از رقیق کردن یک نمونه‌ی گلوکز بالا با غلظت **حدود** ۴۲۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بررسی کنیم. در این مورد چون روش قابل اطمینانی برای سنجش نمونه‌ی غلیظ نداریم، از بررسی نسبت‌ها استفاده می‌کنیم.

۱- با نوشتن حرف "R" در اولین خانه‌ی حسابگر از سمت چپ تعیین می‌کنیم که بناست نسبت‌های گوناگون تهیه کنیم (R: Ratio).

۲- در مورد تهیهی نسبت‌هانیازی به وارد کردن غلظت در خانه‌های طرف راست نیست. حسابگر غلظت حلال را صفر در نظر گرفته و محاسبات را انجام می‌دهد (در تهیهی نسبت‌ها با استفاده از این حسابگر حتما باید از رقیق‌کننده با غلظت صفر استفاده کرد، مثلا آب مقطر).

۳- تعداد سطوح و حجم لازم را در خانه‌های مربوطه را وارد می‌کنیم.

در شکل زیر اطلاعات وارد شده نمایش داده شده است:

مقایسه‌ی نسبی یا غلظتی؛ R یا C؟	خالی باشد		تعداد سطح	حجم مورد نیاز (mL)
R			6	1

پس از وارد کردن اطلاعات بالا، حجم‌های لازم از هر محلول با دو واحد میلی‌لیتر و میکرولیتر در جدول سمت راست نمایش داده می‌شود. در آخرین ستون سمت راست، غلظت نسبی هر سطح نمایش داده می‌شود:

حجم نیاز	حجم‌های مورد نیاز				غلظت نسبی	
	شماره لوله	میلی‌لیتر (mL)		میکرولیتر (uL)		
		غلظت بالا	غلظت پایین	غلظت بالا		غلظت پایین
	1	0.000	1.000	0	1000	0
	2	0.200	0.800	200	800	0.2
	3	0.400	0.600	400	600	0.4
	4	0.600	0.400	600	400	0.6
	5	0.800	0.200	800	200	0.8
	6	1.000	0.000	1000	0	1

با رفتن به صفحه‌ی "برگه‌ی کار" می‌توان نتیجه‌ی محاسبه را بر روی برگه‌ی A5 چاپ کرد و برای تهیه‌ی رقت‌ها در دسترس گذاشت.

(ب) محاسبه‌ی خطی بودن:

پس از تهیهی نسبت‌های بالا باید هر کدام را دست کم ۳ بار سنجید و نتایج را در حسابگر خطی بودن وارد کرد. فرض کنیم ۳ بار سنجش بر روی ۶ رقت تهیه شده در این مثالنتایج زیر به دست آمده است:

- نسبت ۰:۳ - ۳ - ۲
- نسبت ۰:۲ - ۸۸ - ۹۰ - ۸۷
- نسبت ۰:۴:۱۷۸ - ۱۷۵ - ۱۷۱
- نسبت ۰:۶ - ۲۵۸ - ۲۵۵ - ۲۵۷
- نسبت ۰:۸ - ۳۴۰ - ۳۴۱ - ۳۳۸
- نسبت ۱: ۳۸۰ - ۳۷۵ - ۳۸۲

حال باید این اعداد را در حسابگر خطی بودن وارد کنیم:

۳) اولین کار این است که تعیین کنیم با نسبت‌ها کار می‌کنیم. بنا بر این، زیر عنوان "C/R: ?" حرف R را وارد کنیم. نسبت‌های نهایی حساب شده را نیز به ترتیب از نسبت کم به زیاد در خانه‌های زیر همین ستون وارد کنیم.

۴) سپس باید نتایج به دست‌آمده را وارد کنیم.

در شکل زیر جدول کامل شده نمایش داده شده است:

↓ شروع

غلظت‌های منتظره بر مبنای 175 که غلظت میانگین نمونه‌ی شماره 3 است حساب شده است.

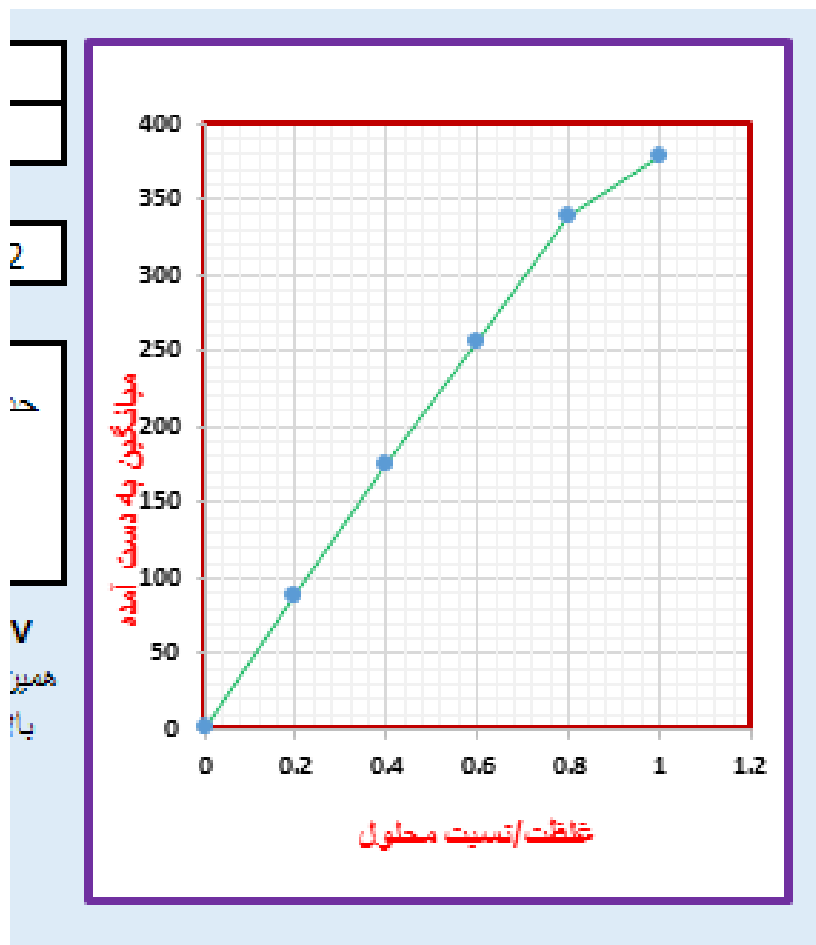
شماره	C/R: ?	سنجش # ۱	سنجش # ۲	سنجش # ۳	سنجش # ۴	سنجش # ۵	غلظت منتظره	میانگین	اختلاف
	R								
1	0	2	3	3			0	2.6667	2.66667
2	0.2	87	90	88			87.333	88.333	1
3	0.4	171	175	178			174.67	174.67	0
4	0.6	258	255	257			262	256.67	-5.33333
5	0.8	340	341	338			349.33	339.67	-9.66667
6	1	382	375	380			436.67	379	-57.6667
7									
8									
9									
10									

%
€
C
ب
ز

پس از وارد کردن این داده‌ها، در ستون "غلظت منتظره" غلظت‌هایی که برای هر نسبت انتظار می‌رود نمایش داده می‌شود. غلظت‌های منتظره با مبنا قرار دادن میانگین غلظت میانی (جایی کیفیت سنجش بهتر از بقیه‌ی جاهاست) حساب می‌شود. در این مثال، میانگین نمونه‌ی سوم که ۱۷۴.۶۷ شده است مبنا قرار گرفته است. میانگین هر ردیف در ستون دوم جدول از طرف راست نمایش داده می‌شود. در ستون "اختلاف"، اختلاف بین میانگین هر ردیف با غلظت منتظره محاسبه و نمایش داده می‌شود.

همانطور که دیده می‌شود میانگین غلظت نمونه‌ی چهارم حدود ۵.۳ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر، میانگین نمونه‌ی پنجم حدود ۹.۷ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر، و میانگین نمونه‌ی ششم حدود ۵۷.۷ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر از غلظت مورد انتظار کمتر است.

همچنین میانگین‌های حاصل در مقابل غلظت‌های نسبی بر روی نمودار نمایش داده می‌شود. همانطور که در شکل زیر دیده می‌شود با رفتن به طرف غلظت‌های بالا، نمودار از حالت خط راست خارج شده و به سمت پایین متمایل می‌شود:



حال باید داوری کرد که آیا اختلاف دیده شده در سطوح چهارم، پنجم و ششم از نظر بالینی مهم است یا نه. برای این کار همانطور که در بخش بررسی خطی بودن با غلظت‌ها بیان شد، باید خطای کل در این سطوح را حساب کرد و با خطای کل مجاز مقایسه کرد:

- خطای کل مجاز برای سنتجش گلوکز در جدول CLIA برای غلظت‌های بالا برابر ۱۰٪ است.
- فرض کنیم که CV این سنتجش برابر ۲٪ باشد.
- نامیزانی (B) برای هر سطح را هم باید به درصد حساب کنیم:

$$(5.3 / 262) \times 100 = 2.0\%$$

$$(9.7 / 349.3) \times 100 = 2.8\%$$

$$(57.7 / 436.7) \times 100 = 13.2\%$$

- خطای کل هر سطح:

$$TE_{L4} = 2.0\% + 2 \times 2\% = 8\%$$

$$TE_{L5} = 2.8\% + 2 \times 2\% = 8.8\%$$

$$TE_{L6} = 2.0\% + 2 \times 13.2\% = 28.4\%$$

همانطور که دیده می‌شود خطای کل در سطح ششم از خطای کل مجاز بزرگتر است. بنا بر این، نتایج به دست آمده بعد از سطح پنجم قابل اعتماد نیست و باید نمونه‌های دارای غلظت بالاتر از سطح پنجم، یعنی ۳۴۹.۳ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر، را رقیق کرد و دوباره سنجید. بنا بر این، با این روش حد بالای خطی بودن حدود ۳۵۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر است.

برای این که حسابگر محاسبه‌های بالا را انجام دهد، باید مقادیر خطای کل مجاز و انحراف معیار را در خانه‌های مربوط وارد کرد:

غلظت	
اختلا	%TEa: 10
	CV: 2
567	eCV: 2.252
333	حد بالای خطی بودن 349.333
667	
667	

مدیریت کیفیت و ایمنی آب

در پایان بررسی می‌توان با مراجعه به صفحه‌ی گزارش، اطلاعات لازم را تایپ و گزارش بررسی را بر روی کاغذ A4 چاپ کرد.

با احترام،

حسن بیات

۱۳۹۲/۱۰/۵