مجله علمی - پژوهشی پزشک و آزمایشگاه / شماره ۵۷ و ۵۸

نوسان در تفسیر آزمایش!

حسن بیات – آبان ۱۳۹۱

توضیح: بخش یکم این نوشته در شماره‌ی ۵۷ مجله‌ی پزشک و آزمایشگاه به چاپ رسیده است و باقی‌مانده‌ی آن در شماره‌ی ۵۸ آن مجله به چاپ خواهد رسید. در اختیار گذاشتن همه‌ی نوشته برای نمایش در سایت انجمن دکترای علوم آزمایشگاهی با دریافت اجازه‌ی تلفنی از جناب آقای دکتر ابراهیم‌زاده (صاحب امتیاز و سردبیر بزرگوار مجله‌ی پزشک و آزمایشگاه) انجام شده است. حسن بیات؛ ۱۳۹۱/۱۱/۷

❖ آغاز

پزشکان نتیجه‌ی آزمایش‌ها را برای یکی از هدف‌های زیر به کار می‌برند:

- تشخیص،
- موردیابی،
- غربالگری، و
- پیگیری تغییر وضعیت بیمار

در سه مورد اول نتیجه‌ی بیمار با محدوده‌های مرجع جمعیت یا مقدارهای برشگاهی[1] مقایسه می‌شود حال آن که در مورد آخر نتیجه‌ی بیمار با نتیجه‌ی پیشین وی مقایسه می‌شود. در واقع در سه مورد نخست به دنبال تعیین وضعیت بیمار در مقایسه با وضعیت مطلوب هستند و در مورد آخر به دنبال تعیین وضعیت کنونی بیمار نسبت به وضعیت پیشین وی. به عنوان مثال‌هایی در باره‌ی کاربرد آزمایش‌ها نمونه‌های زیر را در نظر بگیرید:

۱- بیماری با نتیجه‌ی TG برابر 165 میلی‌گرم بر دسی‌لیتر به پزشک مراجعه می‌کند. بر پایه‌ی راهنمای NCEP[2] در باره‌ی آزمایش لیپیدها، نتیجه‌ی آزمایش این بیمار چگونه تفسیر می‌شود.

۲- نتیجه‌ی A1C یک بیمار دیابتی 9.7% گزارش شده است. پزشک وی دستورهای درمانی جدیدی به وی می‌دهد و پس از گذشت ۲ ماه دوباره آزمایش وی را تکرار می‌کند. نتیجه‌ی جدید وی 8.5% می‌شود. از مقایسه‌ی نتیجه‌ی جدید با نتیجه‌ی پیشین آیا می‌توان نتیجه گرفت که وضعیت بیمار بهتر شده است؟

برای این که بتوانیم با اطمینان و به صورت عینی در باره‌ی این نتیجه‌ها داوری کنیم، باید عامل‌های دیگری غیر از وضعیت بالینی فرد را که می‌توانند سبب به دست آمدن این نتیجه‌ها شوند، و نیز میزان تاثیرگذاری آن‌ها را بشناسیم.

❖ نوسان نتیجه‌های آزمایش

[1] Cut-off Values
[2] [US] National Cholesterol Education Program

اگر یک آنالیت را در یک نفر چند بار در زمان‌های گوناگون اندازه بگیریم عددهای گوناگونی به دست خواهیم آورد. این گوناگونی نتیجه‌ها به سه عامل برمی‌گردد:

۱- عامل‌های پیش از سنجش
۲- عامل‌های مربوط به سنجش
۳- نوسان زیستی اتفاقی مواد

❖ عامل‌های پیش‌سنجش

به عنوان اشاره‌ی گذرایی به عامل‌های پیش‌سنجش که سبب نوسان نتیجه‌ی آزمایش می‌شوند می‌توان از موردهای زیر یاد کرد:

- نوسان‌های فیزیولوژیایی مشخص و قابل پیش‌بینی برخی مواد در بدن: مانند نوسان شبانه‌روزی کورتیزول و هورمون رشد؛ نوسان هورمون‌های خاص در دوره‌ی پریودی؛ و نوسان فصلی برخی مواد مانند کلسترول و ویتامین د.
- مدت ناشتایی
- مصرف دارو
- ساعت خونگیری
- مدت بستن تورنیکه
- شیوه‌ی نگهداری و رساندن نمونه‌ها به آزمایشگاه
- مدت و سرعت سانتریفوژ کردن

برای کاهش نوسان ناشی از عوامل پیش سنجش در جواب‌ها باید:

- با آموزش بیمار و کارکنان درگیر در خونگیری و جابجایی نمونه‌ها،
- تهیه‌ی دستورکارهای لازم، و
- نظارت بر اجرای درست آموزش‌ها و دستورات

تاثیر این عامل‌ها را چنان کاست که بتوان از تاثیر آن‌ها چشم‌پوشی کرد.

❖ عامل‌های مربوط به سنجش

عامل‌های مربوط به سنجش که بر جواب‌ها تاثیر دارند عبارتند از:

- نوسان ذاتی روش (تکرار پذیری)، و
- تغییر در اندازه‌ی نامیزانی[3] روش‌های سنجش

[3] Bias

البته در دراز مدت، تغییر در مقدار نامیزانی یک روش سنجش (مثلا به دنبال تغییر شماره گروه[4] مواد مصرفی) تاثیر خود را به صورت بزرگتر شدن تکرارپذیری بلندمدت به نمایش می‌گذارد.

تاثیر تکرارپذیری

اگر یک نمونه‌ی معین را با یک دستگاه چند بار بسنجیم نتیجه‌های به دست آمده با یکدیگر تفاوت خواهند داشت. اگر روند به دست آمدن نتیجه‌ها در طول زمان را بررسی کنیم خواهیم دید که رخداد آن‌ها از قاعده‌ی خاصی پیروی نمی‌کند و به اصطلاح تصادفی هستند. همچنین اگر نمودار توزیع فراوانی این نتیجه‌ها را رسم کنیم، خواهیم دید دارای توزیع گاسی[5] هستند.

اگرچه روشن است که هرچه نوسان دستگاه کمتر باشد جواب‌های به دست آمده به هم نزدیکتر خواهند بود و می‌توان به یک نتیجه‌ی تک اعتماد بیشتری کرد، و بر عکس هر چه نوسان دستگاهی بیشتر باشد جواب‌های گوناگونتری به دست خواهد آمد و بنا بر این نمی‌توان به یک نتیجه‌ی تک چندان مطمئن بود؛ اما برای این که بتوان به صورت عینی و عددی در باره‌ی تاثیر نوسان سنجش در تفسیر آزمایش داوری کرد باید از محاسبه‌های ساده‌ی آماری کمک گرفت.

گام اول تعیین عددی مقدار نوسان است. این همان چیزی است که آزمایشگاه‌ها برای سنجش‌های گوناگون با عنوان"تکرارپذیری" بررسی و به صورت انحراف معیار[6] (SD) و ضریب تغییرات[7] (CV) حساب می‌کنند. ما در اینجا نوسان مربوط به سنجش را با عنوان "ضریب تغییرات سنجشی[8]" و با نشانه‌ی CV_A به کار می‌گیریم.

گام بعدی محاسبه‌ی تاثیر CV_A بر اعتمادپذیری نتیجه‌ی آزمایش است. چنین محاسبه‌ای با بهره‌گیری از فرمول پراکندگی ممکن است:

$$D = Z * CV$$

در این فرمولD ضریب پراکندگی نتیجه، Z انحراف معیار استاندارد برای احتمال مورد نظر، و CV ضریب تغییرات است که در این مورد همان CV_A است. روند معمول در آمار این است که با احتمال ۹۵% (احتمال چشمگیر) یا ۹۹% (احتمال خیلی چشمگیر) در باره‌ی یک رویداد داوری کنیم. همانطور که می‌دانیم Z دوطرفه‌ی معادل این احتمال‌ها به ترتیب ۱.۹۶ و ۲.۵۸ است. اکنون مثال‌های آمده در آغاز نوشته را بررسی می‌کنیم.

در مورد مثال TG برابر ۱۷۵ با فرض $CV_A = 5\%$ برای احتمال ۹۵%:

$$D = 1.96 * 0.05 = 0.098$$

چنانچه این عدد را در نتیجه‌ی آزمایش ضرب کنیم، پراکندگی نتیجه با واحد آزمایش به دست می‌آید:

$$175 * 0.098 = 17$$

[4] Lot Number
[5] Gaussian Distribution
[6] Standard Deviation
[7] Coefficient of Variation
[8] Analytical Coefficient of Variation

با افزودن و کاستن این رقم از نتیجه‌ی ۱۷۵، گستره‌ی ۱۵۷ تا ۱۹۲ به دست می‌آید. به این ترتیب در باره‌ی نتیجه‌ی بیمار از دیدگاه آماری می‌توان چنین داوری کرد که به "احتمال ۹۵% نتیجه‌ی واقعی جایی در گستره‌ی ۱۵۷ تا ۱۹۲ است". توجه به این نکته لازم است که هر یک از اعداد این گستره برای این که نتیجه‌ی واقعی بیمار باشند دارای احتمال برابر با دیگر اعداد هستند. از نظر بالینی با توجه به این که بر اساس راهنمای NCEP هر دو سوی گستره‌ی ۱۵۷ تا ۱۹۲ در محدوده‌ی افزایش متوسط است بنا بر این می‌توان چنین نتیجه گرفت که **تا این جا** به احتمال ۹۵% این بیمار دارای هیپرتریگلیسریدمی متوسط است.

اگر بخواهیم با احتمال ۹۹% در باره‌ی نتیجه صبت کنیم باید برای Z عدد ۲.۵۸ را در معادله‌ی بالا بگذاریم. در این صورت گستره‌ی ۱۵۲ تا ۱۹۷ به دست می‌آید. باز هم به احتمال ۹۹% این بیمار در دسته‌بندی هیپرتریگلیسریدمی متوسط جای دارد (البته باز هم **تا این جای کار!**).

در مورد بیمار دوم، چنانچه CV_A روش سنجش A1C برابر ۱۰% باشد، گستره‌های زیر برای احتمال ۹۵% به دست می‌آید:

- برای نتیجه‌ی یکم (۹.۷%): ۷.۸ تا ۱۱.۶
- برای جواب دوم (۸.۵%): ۶.۸ تا ۱۰.۲

چنانچه دیده می‌شود گستره‌های این دو نتیجه با یکدیگر همپوشانی زیادی دارند و بنا بر این نمی‌توان با احتمال ۹۵% نتیجه گرفت که کاهش جواب A1C بیمار به دلیل بهبود وضعیت بالینی اوست. چنین اختلاف نتیجه‌ای بدون این که تغییری در وضعیت بالینی بیمار روی داده باشد می‌تواند به دلیل نوسان سنجش باشد. به بیان دیگر، برای به دست آمدن عدد کوچکتر در نمونه‌ی دوم علاوه بر بهبود بیمار، دلیل دیگری هم مطرح است و آن نوسان دستگاه است.

به عنوان مثال دیگری از نقش نوسان دستگاهی در تفسیر آزمایش، در نظر بگیرید فردی بدون تشخیص قبلی دیابت به پزشک مراجعه کرده است. شکایت‌ها و نشانه‌های وی پزشک را به احتمال دیابت مشکوک می‌کند و برای کمک درتشخیص، آزمایش قند ناشتا درخواست می‌کند. بیمار به آزمایشگاهی که تکرارپذیری روش سنجش گلوکز آن در محدوده‌ی ۱۰۰ تا ۲۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر برابر ۸% است مراجعه می‌کند و۳ روز بعد با نتیجه‌ی FPG برابر ۱۱۵ پیش پزشک برمی‌گردد. اگر پزشک نتیجه‌ی این بیمار را بدون در نظر گرفتن نوسان سنجشی بر اساس معیار ADA[9] یعنی:

Normal: <100

IFG: 100-125

Diabetes: =>126

تفسیر کند این فرد در محدوده‌ی گلوکز ناشتای مختل قرار می‌گیرد. اما اگر گستره‌ی احتمال ۹۵% را برای بیمار حساب کنیم به این نتیجه می‌رسیم که جواب واقعی او جایی بین ۹۷ تا ۱۳۳ قرار می‌گیرد. یعنی بر اساس چنین نتیجه‌ای ممکن است این فرد غیردیابتی، پیش‌دیابتی، یا حتا دیابتی باشد! سرراست یعنی این که پس از هزینه کردن، زحمت رفت و آمد و خونگیری و بقیه‌ی بگیر ببندها، پزشک همچنان سر خانه‌ی اول مانده است و آزمایشگاه هیچ

[9] American Diabetes Association

کمکی به تشخیص یا رد دیابت در این بیمار نکرده است. با چنین دقتی در سنجش می‌توان تنها در باره دو دسته از جواب‌ها با احتمال 95% داوری قطعی کرد:

- جواب‌هایی که زیر ۸۶ هستند؛ چون گستره‌ی آن‌ها در هر حال در محدوده‌ی غیر دیابتی قرار می‌گیرد، و
- جواب‌هایی که بالای ۱۵۰ هستند؛ چون گستره‌ی آن‌ها در هر حال در محدوده‌ی دیابتی قرار می‌گیرد،

اما نکته‌ی قابل توجه این است که چنانچه گلوکز فردی پایینتر از ۸۶ باشد به احتمال زیاد نیازی به انجام آزمایش نخواهد داشت؛ و از سوی دیگر چنانچه گلوکز ناشتای کسی بالای ۱۵۰ باشد و تازه آزمایشگاه بتواند در تشخیص او کمک کند تقریبا "نوشداروی دیر شده" است و مدت‌هاست که بیمار مبتلا به دیابت بوده و احتمالا از پی‌آمدهای ناگوار آن در امان نمانده است. راهکار درست برای این که آزمایشگاه بتواند به پزشک برای تشخیص در مورد این بیمار کمک کند آن است که روشی را برای سنجش به کار بگیرد که از نوسان کمتری برخوردار باشد. چنانچه آزمایش این بیمار با روشی با تکرارپذیری ۲% انجام شود و همین نتیجه‌ی ۱۱۵ به دست آید، آنگاه می‌توان قضاوت کرد که جواب واقعی نمونه‌ی وی جایی در بازه‌ی ۱۱۰ تا ۱۲۰ قرار دارد و به احتمال ۹۵% بر اساس این نمونه وی در دسته‌ی پیش دیابتی است.

از بررسی این مثال‌ها به این نتیجه می‌رسیم که با وارد کردن نوسان سنجشی در تفسیر آزمایش، نتیجه‌ی آزمایش بیمار از یک عدد قطعی با اطمینان ۱۰۰% به یک **گستره با احتمال معین** تبدیل می‌شود.

اما دانستن نوسان سنجشی و کاستن از آن پایان داستان نیست، زیرا "نوسان زیستی" که در ادامه به آن می‌پردازیم عامل دیگری است که سبب بازتر شدن گستره‌ای می‌شود که نتیجه‌ی واقعی بیمار با احتمال مشخص در آن قرار می‌گیرد.

❖ نوسان زیستی

غلظت آنالیت‌های گوناگون را در زمان‌های گوناگون، به رغم شرایط پایدار بالینی و در حالی که هیچگونه تغییری در وضعیت بالینی افراد روی نمی‌دهد، همیشه یک مقدار ثابت نیست. به عنوان نمونه در جدول ۱ غلظت کراتینین و در جدول ۲ غلظت آهن سرم در ۴ فرد به ظاهر سالم در ۶ روز پی در پی نمایش داده شده است.

جدول ۱ – غلظت کراتینین سرم (mg/dL) در ۴ نفر فرد به ظاهر سالم در ۶ روز پی در پی

روز	فرد یکم	فرد دوم	فرد سوم	فرد چهارم
1	0.95	1.38	1.08	1.60
2	0.90	1.42	1.03	1.54
3	0.91	1.33	1.05	1.57
4	0.93	1.40	1.01	1.53
5	0.89	1.44	1.08	1.62
6	0.94	1.42	1.01	1.60
میانگین	0.92	1.40	1.04	1.58

گستره	0.89-0.95	1.33-1.44	1.01-1.08	1.53-1.62

جدول ۲– غلظت آهن سرم (mg/dL) در ۴ نفر فرد به ظاهر سالم در ۶ روز پی در پی

روز	فرد یکم	فرد دوم	فرد سوم	فرد چهارم
1	45	106	62	56
2	101	50	90	140
3	78	129	129	84
4	123	95	106	112
5	56	112	151	78
6	90	151	118	101
میانگین	84	106	112	95
گستره	45-123	50-151	62-151	56-140

با بررسی این نتیجه‌ها دیده می‌شود که:

- غلظت هر یک از این دو آنالیت درسرم یک فرد معین در روزهای گوناگون یکسان نیست و به نظر می‌رسد که دارای نوسان تصادفی پیرامون یک مقدار میانگین است، و
- میانگین افراد گوناگون با یکدیگر تفاوت دارد.

بررسی‌های انجام شده بر روی آنالیت‌های گوناگون نشان داده است که غلظت همه‌ی آنالیت‌ها درتمام مایع‌های زیستی بدن از چنین نوسان تصادفی‌یی پیرامون یک "نقطه‌ی تنظیم" برخوردار هستند. از آنجایی که این نوسان نتیجه‌ی وضعیت فیزیولوژیایی است "نوسان زیستی[10]" نام گرفته است. نوسان زیستی به دو بخش تقسیم می‌شود:

- "نوسان زیستی درون‌فردی[11]"؛ به این معنا که غلظت یک آنالیت معین در زمان‌های گوناگون در بدن یک نفر پیرامون یک "نقطه‌ی تنظیم" نوسان اتفاقی دارد. این نوسان با نشانه‌ی CV_I نمایش داده می‌شود (البته با نام "نوسان فیزولوژیک درون موضوعی[12]" نیز نامیده شده و با نشانه‌ی CV_W نیزنمایش داده می‌شود).
- "نوسان زیستی بین‌افرادی[13]"؛ به این معنا که نقطه‌های تنظیم یک آنالیت در افراد گوناگون یکسان نیست و دارای پراکندگی اتفاقی پیرامون میانگین گروه هستند. این نوسان با نشانه‌ی CV_G نمایش داده می‌شود.

➢ نقش نوسان زیستی در تفسیر آزمایش‌ها

[10] Biological Variation
[11] Intra-individual Biological Variation
[12] Within-subject Physiological Variation
[13] Inter-individual Biological Variation

همانطور که در بررسی تاثیر نوسان سنجشی بر تفسیر آزمایش‌ها دیدیم وجود نوسان دستگاهی سبب می‌شود که به جای یک عدد مشخص قطعی با یک محدوده‌ی احتمالی روبرو باشیم. حال با وارد شدن نوسان زیستی به میدان تفسیر، آنچه که گل بود به سبزه هم آراسته می‌شود!

در مورد نوسان سنجشی در مثال TG سخن از این بود که با احتمال مثلا ۹۵% مقدار واقعی TG یک نمونه در چه گستره‌ای قرار می‌گیرد، حال آنکه با به کار بستن نوسان زیستی درون‌فردی پرسش به این شکل در می‌آید که "با احتمال مثلا ۹۵% نقطه‌ی تنظیم TG در یک شخص در چه گستره‌ای قرار دارد؟". مانند مورد نوسان سنجشی برای این که بتوان به شکل عینی و عددی به چنین پرسشی پاسخ داد باید از میزان عددی نوسان زیستی آگاه شد. نوسان زیستی آنالیت‌های گوناگون به وسیله‌ی پژوهشگران بسیاری بررسی و تعیین شده است و دکتر Carmen Ricosو همکارانش از سال‌ها پیش به بررسی پژوهش‌های منتشر شده در باره‌ی نوسان زیستی پرداخته و منبع اطلاعاتی غنی‌یی فراهم کرده‌اند. آخرین بازبینی کار ایشان (نسخه‌ی ۲۰۱۲) که چند ماه پیش منتشر شده است در آدرس http://www.westgard.com/biodatabase1.htm در دسترس است. یکی از ویژگی‌های بسیار سودمند نوسان زیستی آن است که هیچگونه وابستگی‌یی به نژاد، سن، جغرافیا و روش سنجش ندارند و بنا بر این می‌توان از عددهای تعیین شده به راحتی برای هر نژاد و منطقه‌ای بهره برد.

برای بررسی نقش نوسان زیستی در تفسیر نتیجه‌های آزمایشگاهی مثال‌های زیر را بررسی می‌کنیم.

۱- بیماری با نتیجه‌ی TG برابر 165 میلی‌گرم بر دسی‌لیتر:

در بررسی تاثیر CV_A برابر ۵% دیدیم که به احتمال ۹۵% غلظت واقعی TG در این نمونه بین ۱۵۷ تا ۱۹۹ است. برای بررسی تاثیر CV_I نیز باید از همان رابطه‌ی $D = Z * CV$ استفاده کنیم با این تفاوت که باید CV کل را که حاصل CV_I و CV_A است را از رابطه‌ی زیر حساب کنیم:

$$CV_{total} = (CV_I^2 + CV_A^2)^{1/2}$$

بنا بر این فرمول پراکندگی به شکل زیر می‌شود:

$$D = Z * (CV_I^2 + CV_A^2)^{1/2}$$

و برای این مثال با توجه به CV_I برابر 20.9% برای TG:

$$D = 1.96 * (20.9^2 + 5^2)^{1/2}$$

$$D = 0.42$$

از ضرب ۰.۴۲ در ۱۶۵ عدد ۶۹ به دست می‌آید که از افزودن و کاستن آن به ۱۶۵ گستره‌ی ۹۶ تا ۲۳۴ به دست می‌آید. به این ترتیب باید گفت که "نقطه‌ی تنظیم" غلظت TG در خون این بیمار جایی در گستره‌ی ۹۶ تا ۲۳۴ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر قرار دارد. اگرچه در بخش پیشین که گستره‌ها را تنها با در نظر گرفتن نوسان سنجشی حساب می‌کردیم نتیجه گرفتیم که هنوز می‌شد این فرد را در دسته‌ی هایپرتریگلیسریدمی متوسط دانست، ولی حالا با در نظر گرفتن نوسان زیستی درون‌فردی دیگر نمی‌توان به آن قطعیت نتیجه گرفت؛ زیرا مقدار واقعی TG در بدن این شخص به احتمال ۹۵% جایی است از ۱۰۲ تا ۲۴۸؛ یعنی یا کاملا طبیعی است ($TG < 150$) یا تریگلیسریدمی متوسط دارد ($150 \le TG < 200$) یا تریگلیسریدمی بالا دارد ($200 \le TG < 250$)!

۲- تغییر نتیجه‌ی TG یک بیمار از ۳۲۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر به ۲۶۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر در فاصله‌ی ۳ ماه:

اگر آزمایش‌های این بیمار در همان آزمایشگاه مثال ۱ انجام شده باشد آنگاه جواب‌های به دست‌آمده با احتمال ۹۵% دارای گستره‌های زیر خواهند بود:

- برای نتیجه‌ی یکم: ۲۸۹ تا ۳۵۱
- برای جواب دوم: ۲۳۴ تا ۲۸۵

همانطور که دیده می‌شود این دو نتیجه با هم همپوشانی ندارند و بنا بر این می‌توان ۹۵% مطمئن بود که اختلاف بین این دو نمونه واقعی است و به دلیل نوسان سنجش نیست. اما برای این که بتوان در باره‌ی اختلاف نقطه‌ی تنظیم TG در بدن بیمار در دو زمان مختلف داوری کرد باید نوسان زیستی درون‌فردی را نیز در نظر گرفت. با وارد کردن CV_I برابر 20.9% در محاسبه، گستره‌های بالا چنین می‌شوند:

- نتیجه‌ی یکم: ۱۸۵ تا ۴۵۴
- نتیجه‌ی دوم: ۱۵۰ تا ۳۶۹

حالا با چنین همپوشانی زیادی نمی‌توان نتیجه گرفت که به احتمال ۹۵% وضعیت بیمار بهبود یافته است. *اگرچه ممکن است که واقعا بهبود یافته باشد اما احتمال دیگری نیز مطرح است* و آن این است که ممکن است نقطه‌ی تنظیم TG بیمار هیچ تغییری نیافته باشد و اختلاف دیده شده فقط ناشی از نوسان زیستی درون‌فردی باشد.

راه دیگر مقایسه‌ی جواب‌های پی در پی

برای مقایسه‌ی دو جواب مختلف به جای حساب کردن پراکندگی هر یک از آن‌ها، می‌توان پراکندگی ناشی از دو نتیجه را یکجا حساب کرد. در این حالت چون می‌خواهیم پراکندگی پیرامون دو نتیجه را مقایسه کنیم باید CV^2های کل سنجش اول و دوم را به هم بیفزاییم تا CV^2 کل را برای محاسبه پراکندگی به دست آوریم:

$$CV = [(CV_I^2 + CV_A^2)_1 + (CV_I^2 + CV_A^2)_2]^{1/2}$$

$$= [2(CV_I^2 + CV_A^2)]^{1/2}$$

$$= 1.41\ (CV_I^2 + CV_A^2)^{1/2}$$

و بنا بر این با گذاشتن CV^2 کل در فرمول پراکندگی رابطه‌ی زیر به دست می‌آید:

$$C = Z * 1.41\ (CV_I^2 + CV_A^2)^{1/2}$$

که در آن C بیانگر تفاوت بین دو نتیجه است که از نوسان‌های زیستی و سنجشی انتظار می‌رود. اگر درصد اختلاف دو نتیجه بیش از C شود آنگاه می‌توان گفت که با احتمال معین اختلاف دو نتیجه به دلیل بهتر (یا بدتر) شدن وضعیت بالینی بیمار است. در مورد مقایسه‌ی دو نتیجه‌ی TG پراکندگی برابر است با:

$$C = 1.96 * 1.41\ (20.9^2 + 5^2)^{1/2} = 0.59 = 59\%$$

و اختلاف دو نتیجه با هم برابر است با:

$$320 - 260 = 60$$

$$[(320 - 260) / 320] * 100 = 19\%$$

چون اختلاف دو نتیجه (۱۹%) از میزان پراکندگی‌یی که با احتمال ۹۵% از مجموع نوسان زیستی درون‌فردی و نوسان سنجشی انتظار می‌رود (۵۹%) کوچکتر است بنا بر این نمی‌توان با اطمینان۹۵% گفت که حتما وضعیت بیمار بهتر شده است؛ شاید بهتر شده باشد یا شاید هیچ تغییری نکرده باشد و این اختلاف نتیجه به دلیل نوسان ذاتی دستگاه و بدن باشد.

➢ محاسبه‌ی احتمال تغییر

در مثال‌های بالا به این پرداختیم که "آیا با در نظر گرفتن یک احتمال معین (مثلا ۹۵%) می‌توان گفت که دو نتیجه با هم متفاوت هستند یانه؟". حال می‌خواهیم تعیین کنیم که "به رغم نوسان زیستی درون‌فردی و سنجشی، چقدر احتمال دارد تفاوت دیده شده بین دو نتیجه واقعی باشد؟". برای این کار فرمول پراکندگی دو نتیجه را برای حساب کردن Z بازآرایی می‌کنیم:

$$Z = C / 1.41 (CV_I^2 + CV_A^2)^{1/2}$$

پس از حساب کردن Z با مراجعه به جدول توزیع گاسی احتمال معادل Z به دست آمده را حساب می‌کنیم. در مورد مثال مقایسه‌ی نتیجه‌های TG:

$$Z = 19 / 1.41 (20.9^2 + 5^2)^{1/2} = 0.63$$

احتمال دوطرفه‌ی معادل چنین Zیی برابر ۴۷% است؛ یعنی در حضور چنین نوسان زیستی درون‌فردی بالایی (20.9%) و نوسان سنجشی برابر ۵% تنها ۴۷% می‌توان مطمئن بود که تغییر نتیجه‌ی TG از ۳۲۰ به ۲۶۰ به دلیل کاهش واقعی تریگلیسرید بیمار باشد و واقعا نقطه‌ی تنظیم تریگلیسرید وی جابجا شده باشد.

➢ احتمال کاهش/افزایش

نکته‌ای که در باره‌ی مقایسه‌ی نتیجه‌ها باید به آن اشاره کرد این است که در مقایسه‌ی نتیجه‌ها معمولا پرسش در باره‌ی "افزایش یا کاهش" است و نه در باره‌ی "تغییر". مثلا در مورد این مثال می‌پرسیم "آیا واقعا تریگلیسرید بیمار کاهش یافته است؟". این همان جایی است که باید نسبت به معنی آماری واژه‌ها دقت داشته باشیم. در بالا که سخن از "تغییر" بود مقدار Z دوطرفه‌ی احتمال‌ها را به کار بردیم. اما وقتی سخن از کاهش/افزایش است باید مقدار Z یکطرفه را به کار برد. مقدار Z یکطرفه برای احتمال‌های ۹۵% و ۹۹% به ترتیب 1.65 و 2.33 است. در مورد مثال بالا احتمال یکطرفه‌ی Z مساوی 0.63 برابر ۷۳% است. یعنی این با تغییر نتیجه‌ی TG از ۳۲۰ به ۲۶۰ احتمال این که واقعا TG بیمار کاهش یافته باشد برابر ۷۳% است.

➢ مفهوم "مقدار تغییر مرجع"

دیدیم که هر چه نوسان زیستی درون‌فردی یا سنجشی بیشتر باشد با اطمینان کمتری می‌توان اختلاف بین دو نتیجه را به حساب تغییر وضعیت بیمار گذاشت. همین تاثیر نوسان در تفسیر اختلاف نتیجه‌ی آزمایش‌ها صاحبنظران را به طرح این پرسش راهنمون شده است که "در حضور نوسان‌های زیستی و سنجشی، اختلاف دو نتیجه چقدر باید باشد که بتوان آن را به حساب تغییر وضعیت بالینی بیمار (بهبودیافتن یا بدتر شدن) گذاشت؟"؛ در واقع چه مقداری از اختلاف بین دو نتیجه باید "مرجع" داوری در باره‌ی مهم بودن اختلاف قرار بگیرد؟ این همان چیزی است که "مقدار تغییر مرجع[۱۴]" (RCV) نام گرفته است. اگر در فرمول:

$$C = Z * 1.41 (CV_I^2 + CV_A^2)^{1/2}$$

به جای Z به ترتیب ۱.۹۶ و ۲.۵۸ بگذاریم به ترتیب $RCV_{95\%}$ و $RCV_{99\%}$ به دست می‌آید. مثلا برای کلسترول با نوسان زیستی درون‌فردی درون فردی ۵.۴% و تکرارپذیری ۱۰%:

$$RCV_{95\%} = 1.96 * 1.41 (5.4^2 + 10^2)^{1/2} = 31.4\%$$

این یعنی این که با چنین دقت سنجشی‌یی باید اختلاف بین دو نتیجه بیش از ۳۱% باشد تا بتوان آن را واقعی دانست. روشن است که هر چه RCV کوچکتر باشد، می‌توان به تفاوت‌های کوچکتر بین دو نتیجه به عنوان تغییر واقعی نگاه کرد. برای مثال چنانچه روش سنجش بهتری را به کار بگیریم که تکرارپذیری آن ۱% باشد آنگاه $RCV_{95\%}$ کوچکتری خواهیم داشت:

$$RCV_{95\%} = 1.96 * 1.41 (6^2 + 1^2)^{1/2} = 15.2\%$$

چنانچه بخواهیم باز هم RCV کوچکتری داشته باشیم، باید از CV_I هم بکاهیم. روشن است که این بیرون از توان ما است اما می‌توان می‌توان با تکرار نمونه‌گیری از تاثیر CV_I کاست. چنانچه نتیجه‌ای میانگین n بار تکرار باشد آنگاه CV را باید به "رادیکال n" تقسیم کرد. بنا بر این چنانچه پیش از شروع درمان و سپس چند ماه پس از شروع درمان در هر مرحله در یک فاصله‌ی چند روزه ۲ بار از بیمار خون بگیریم و میانگین‌های دو بار خونگیری را با هم مقایسه کنیم آنگاه:

$$RCV_{95\%} = 1.96 * 1.41 [(5.4/\sqrt{2})^2 + 1^2]^{1/2} = 11\%$$

مثلا چنانچه نتیجه‌های کلسترول بیماری در دو نمونه‌گیری به فاصله‌ی ۱۰ روز برابر ۳۰۰ و ۳۲۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر (میانگین ۳۱۰) شده باشد و ۴ ماه بعد به دنبال تغییر رژیم غذایی و افزایش فعالیت بدنی نتیجه‌های کلسترول وی در دو نمونه‌گیری به فاصله‌ی ۱۰ روز برابر ۲۶۵ و ۲۴۰ (میانگین ۲۵۲) شده باشد:

$$[(310 – 252) / 310] * 100 = 19\%$$

چون تغییر دیده شده بزرگتر از RCV است پس تغییری با اهمیت است و می‌توان ۹۵% مطمئن بود که این شیوه‌ی درمانی کارگر افتاده است و هیپرکلسترولمی بیمار رو به بهبودی است. اما چنانچه همین اختلاف، حاصل تنها یک بار نمونه‌گیری در هر مرحله بود و با روشی با CV_A برابر ۱۰% به دست آمده بود ($RCV_{95\%} = 32\%$) آنگاه نمی‌شد آن را با اهمیت دانست.

[14] Reference Change Value

➢ نوسان زیستی و محدوده‌های مرجع (محدوده‌های طبیعی)

همانطور که در آغاز این نوشته آمد در سه مورد تشخیص، موردیابی و غربالگری نتیجه‌ی آزمایش افراد با محدوده‌های مرجع یا برشگاه‌ها مقایسه می‌شود. روش معمول تعیین محدوده‌های مرجع آن است که گستره‌ای را پیدا کنیم که ۹۵% از نتیجه‌های افراد به ظاهر طبیعی در آن قرار گیرد. کاستی بزرگ محدوده‌های مرجع جمعیت-بنیان آن است که همیشه مراجعه به آن‌ها نمی‌تواند در تشخیص زودرس بیماری‌ها سودمند باشد. برای بررسی دلیل این کاستی نگاهی می‌اندازیم به جدول ۳. در این جدول میانگین‌ها و گستره‌های تغییر کراتینین و آهن در سرم که در جدول‌های ۱ و ۲ آورده شده بود برای مقایسه کنار هم گذاشته شده‌اند.

جدول ۳ – مقایسه‌ی میانگین‌ها و گستره‌های علظت کراتینین و آهن در سرم ۴ فرد به ظاهر طبیعی در ۶ روز

		فرد یکم	فرد دوم	فرد سوم	فرد چهارم	فرد یکم
کراتینین	میانگین	0.92	1.40	1.04	1.58	
RR = 0.72-1.42	گستره	0.89-0.95	1.33-1.44	1.01-1.08	1.53-1.62	
آهن	میانگین	84	106	112	95	
RR = 28-179	گستره	45-123	50-151	62-151	56-140	

RR: Reference Range

با نگاه به این جدول دیده می‌شود که:

- نوسان روز به روز کراتینین یک فرد معین خیلی زیاد نیست یعنی نوسان درون فردی کوچک است،
- کراتینین یک نفر در روزهای گوناگون در سراسر محدوده‌ی مرجع (حدود ۰.۷۲ تا ۱.۴۲ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) جابجا نمی‌شود بلکه تنها در بخش کوچکی از آن پس و پیش می‌شود، و
- میانگین‌های کراتینین افراد گوناگون با هم تفاوت زیادی دارد یعنی نوسان بین‌افرادی زیاد است.

اما در مورد آهن بر خلاف کراتینین:

- نوسان روز به روز آهن یک فرد معین خیلی زیاد است یعنی نوسان درون فردی بزرگ است،
- آهن یک فرد در روزهای گوناگون تقریبا در تمام گستره‌ی محدوده‌ی مرجع (حدود ۲۸ تا ۱۷۹ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) پس و پیش می‌شود، و
- میانگین‌های افراد گوناگون تقریبا به هم نزدیک است یعنی نوسان زیستی بین‌افرادی کم است.

بر پایه‌ی بودن چنین تفاوت‌هایی در نوسان‌های زیستی درون‌فردی و بین‌افرادی میان آنالیت‌های گوناگون، Eugene Harris فردیت آنالیت‌ها را مطرح کرد و "نسبت نوسان کل درون‌فردی به نوسان زیستی بین‌افرادی" را "شاخص فردیت[۱۵]" (II) نامید. شاخص فردیت از رابطه‌ی زیر حساب می‌شود:

[15] Individuality Index

$$II = (CV_I^2 + CV_A^2)^{1/2} / CV_G$$

چنانچه CV_A کوچکتر از CV_I باشد (که البته از نظر کیفیت سنجش باید چنین باشد)، آنگاه می‌توان از CV_A چشم‌پوشی کرد و رابطه‌ی بالا را به شکل زیر نوشت:

$$II = CV_I / CV_G$$

در جدول ۴ شاخص فردیت تعدادی از آنالیت‌های رایج با فرض کوچک بودن CV_A نشان داده شده است.

جدول ۴ – شاخص فردیت تعدادی از آنالیت‌های معمول

آنالیت	CV_I	CV_G	II
ALP	6	24.8	0.24
ALT	18	42	0.43
AST	11.9	17.9	0.66
Bilirubin, total	23.8	39	0.61
Ca, Ionized	1.7	1.9	0.89
Ca, Total	1.9	2.8	0.68
Cholesterol	5.4	15.2	0.36
Cratinine	6	14.7	0.41
CRP	42.2	76.3	0.55
DHEA-S	5.6	25.9	0.22
Ferritin	14.2	15	0.95
Glucose, plasme	4.5	5.8	0.78
Glucose, serum	6.1	6.1	1.00
Hb A1C	1.9	5.7	0.33
HDL	7.1	19.7	0.36
Iron	26.5	23.8	1.11
LDL	8.3	25.7	0.32
MCH	1.6	5.2	0.31
MCHC	1.7	2.8	0.61
MCV	1.3	4.8	0.27
Mg	5.6	11.3	0.50
Oxallate, Concentration, 24h	44	18	2.44
Oxallate, output, 24h	42.5	19.9	2.14
Phosphate	8.5	9.4	0.90
Platelet, count	9.1	21.9	0.42
Potassium	13.6	13.4	1.01
RBC, count	3.2	6.1	0.52
Sodium	0.7	1	0.70

T4	4.9	10.9	0.45
TG	20.9	37.2	0.56
Troponin I	9.7	57	0.17
TSH	19.3	24.6	0.78
Urea	12.3	18.3	0.67
Zink, plasma	11	14	0.79
Zink, serum	9.3	9.4	0.99

در آزمایشگاه بالینی فردیت آنالیت‌ها رایج است و پی‌آمد بزرگی در کاربرد محدوده‌های مرجع، کاربرد آزمون‌های آزمایشگاهی و تفسیر نتیجه‌ی آزمایش‌ها دارد.

به عنوان نمونه در مورد کراتینین، افراد گوناگون محدوده‌های مرجع شخصی خودشان را دارند که بسیار کوچکتر از محدوده‌ی مرجع جامعه است و بنا بر این در وضعیت پایدار کراتینین یک نفر تنها در بخش کوچکی از محدوده‌ی طبیعی جامعه نوسان می‌کند. اما در مورد آهن گستره‌های شخصی افراد وسیع است و باید انتظار داشت که در سنجش‌های گوناگون از یک فرد، بدون آن که هیچ تغییری در وضعیت بالینی وی رخ داده باشد، نتیجه‌های بسیار گوناگونی برای آهن به دست آورد.

اگر یک نفر بیمار شود و نتیجه‌های آزمایش وی غیرمعمول شود، یعنی "نقطه‌ی تنظیم" وی جابجا شود، چه روی می‌دهد؟ در مورد کراتینین ممکن است کراتینین یک نفر بسیار بیرون از محدوده‌ی شخصی وی باشد اما همچنان درون محدوده‌ی مرجع قراردادی باشد. چنین نتیجه‌ای اگرچه از نظر بالینی برای این فرد بسیار غیرمعمول و با اهمیت است اما چون با محدوده‌ی مرجع جامعه مقایسه می‌شود به اشتباه طبیعی در نظر گرفته خواهد شد. بر عکس در مورد آهن چنانچه نقطه‌ی تنظیم اندکی جابجا شود شانس این که نتیجه‌ی آزمایش بیمار بیرون از محدوده‌ی مرجع قرار بگیرد و به عنوان غیرطبیعی تفسیر شود بیش از مورد کراتینین است.

آنچه که سبب چنین تفاوتی در کارآیی محدوده‌های مرجع کراتینین و آهن شده است همانا تفاوت فردیت آن‌ها است. کراتینین با شاخص فردیت برابر ۰.۴۱ دارای فردیت بالایی است حال آن که آهن با شاخص فردیت ۱.۱۱ دارای فردیت پایینی است. در مورد کراتینین به‌کارگیری محدوده‌ی مرجع جمعیت-بنیان برای تشخیص نتیجه‌های غیرمعمول برای بسیاری از افراد کارآیی ندارد و این کاستی بزرگ آزمایش کراتینین در تشخیص زودرس بیماری‌های کلیوی در افراد بسیاری است. این افراد بسیار کسانی هستند که که نقطه‌های تنظیم و محدوده‌های شخصی آن‌ها پیرامون مرز پایینی محدوده‌ی مرجع تا نزدیکی‌های مرز بالایی محدوده‌ی مرجع قرار دارد. تنها کسانی شانس تشخیص زودرس را دارند که نقطه‌ی تنظیم کراتینین ایشان پیرامون مرز بالایی محدوده‌ی مرجع است و بنا بر این در صورت بروز بیماری نتیجه‌ی ایشان بیرون از محدوده‌ی مرجع جمعیت خواهد بود. بر عکس در مورد آهن محدوده‌ی مرجع جمعیت-بنیان برای تشخیص بیماری بسیاری از افراد سودمند است زیرا با اندکی تغییر در وضعیت بالینی فرد شانس این که نتیجه‌ی وی بیرون از محدوده‌ی مرجع قرار بگیرد وجود دارد.

هریس در پژوهش‌های بسیار ارزشمند خود پیامد فردیت بر کاربرد آزمایش‌ها را با گسترگی بررسی کرده و نشان داده است که هنگامی که II کوچک است، به ویژه هنگامی که کوچکتر از ۰.۶ است، پراکندگی نتیجه‌های آزمایش در یک فرد معین تنها بخش کوچکی از محدوده‌ی مرجع را در بر می‌گیرد و در این حالت محدوده‌های جمعیت-بنیان

کاربرد چندانی نخواهند داشت، به ویژه برای نشان دادن این که تغییری در بدن فرد رخ داده است. در مورد آنالیت‌های دارای فردیت بالا مقایسه‌ی نتیجه‌ی فرد نتیجه‌ی پیشین وی و استفاده از RCV بسیار سودمند است.

برعکس هرگاه II بزرگ باشد، به ویژه بزرگتر از ۱.۱۴ باشد، نتیجه‌های یک فرد معین بخش بزرگی از محدوده‌ی مرجع را دربرمی‌گیرد. بنا بر این، محدوده‌های مرجع قرارداری در بسیاری از وضعیت‌های بالینی سودمند خواهند بود.

از چشم‌انداز نوسان زیستی یک آزمایش کامل آن است که CV_I و CV_G کوچکی داشته باشد. در چنین صورتی، کوچک بودن CV_I سبب خواهد شد که با یک بار آزمایش کردن بتوانیم برآورد نزدیکی از نقطه‌ی تنظیم بدن فرد داشته باشیم. همچنین CV_I این سودمندی را دارد که چنین آزمایشی نسبت به تغییر وضعیت فرد بسیار حساس خواهد بود و اندک تغییری در نتیجه‌های بیمار را می‌توان به حساب تغییر بالینی گذاشت و نه نوسان زیستی درون‌فردی؛ و بنا بر این ابزاری کارآ برای پیگیری وضعیت بیمار خواهد بود. از سوی دیگر کوچک بودن CV_G به این معناست که نقطه‌ی تنظیم افراد گوناگون به هم نزدیک است و نیازی به دسته‌بندی محدوده‌ی مرجع بر اساس جنس یا سن نخواهد بود و همچنین سبب خواهد شد که II بزرگتر از ۱.۴ بشود و بنا بر این استفاده از محدوده‌های جمعیت کاربرد داشته باشد. اما واقعیت این است که تنها انگشت‌شماری از آنالیت‌ها II بزرگتر از ۱.۱۴ دارند و بسیاری از آنالیت‌ها II کمتر از ۰.۶ دارند. این همان چیزی است که پژوهشگران را به سوی مطرح کردن RCVها و کاربرد آن‌ها راهنمون شده است. به عنوان مثال راهنمای NKF[16] در مورد کراتینین بیان می‌کند که اختلاف بیش از ۱۵% بین دو نتیجه‌ی پی‌درپی نشان‌دهنده‌ی تغییر بالینی با اهمیت است؛ این یعنی مثلا کراتینین ۰.۹ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر در فردی که نتیجه‌ی مدتی پیش وی ۰.۷ بوده است بیانگر تغییر قابل ملاحظه در وضعیت سلامتی کلیه‌های وی است. البته همچنان که پیشتر نشان داده شده برای این که اختلاف نتیجه‌ها قابل اطمینان باشند باید CV_A کوچک باشد؛ در مورد کراتینین باید کمتر از ۳% و مطلوب آن است که کمتر از ۱.۵% باشد. مثال دیگر تعریف MI در "سومین تعریف جهانی سکته‌ی قلبی-سند توافقی کارشناسی؛ ۲۰۱۲[17]" حاصل کار جمعی صاحبنظران اروپا-امریکا است. بنا به تعریف این سند "[چنانچه نتیجه‌ی آزمایش اولیه‌ی تروپونین I کمتر از ۹۹مین صدک جمعیت مرجع باشد] برای تشخیص MI در فردی با شک بالینی، باید تفاوت بین دو آزمایش تروپونین I به فاصله‌ی چند ساعت بیش از ۲۰% باشد؛ به شرط آن که آزمایش با روشی با تکرارپذیری کمتر از ۱۰% انجام شده باشد" (این تعریف اولین بار در بیانیه‌ی سال ۲۰۰۸ ارائه شد و در ویرایش سال ۲۰۱۲ نیز همچنان پابرجا است).

➢ نوسان زیستی و تکرار نمونه‌گیری برای تایید جواب غیرطبیعی

می‌دانیم که محدوده‌های جمعیت-بنیان ۹۵% از گستره‌ی جمعیت مرجع را در بر می‌گیرند. بنا بر این، ممکن است که نتیجه‌ی ۵% افراد سالم گاهی کمی بیرون از این محدوده قرار بگیرد. در مورد آنالیت‌های دارای II کوچک، مانند کراتینین، تنها افراد سالمی که نقطه‌ی تنظیم ایشان پیرامون یکی از مرزهای بالایی یا پایینی است این احتمال را دارند که گاهی نتیجه‌ی بیرون از محدوده داشته باشند. اما در مورد آنالیت‌های دارای II بزرگ همه‌ی افراد این احتمال را دارند که گاهی نتیجه‌ی بیرون از محدوده داشته باشند. به هر حال جدا از کوچکی یا بزرگی II، در صورت تکرار آزمایش عموما نتیجه‌ی تکراری درون محدوده قرار می‌گیرد زیرا بیشتر نتیجه‌های افراد درون محدوده هستند و افراد "به سوی میانگین خود برمی‌گردند".

[16] [US] National Kidney Foundation
[17] Third universal definition of myocardial infarction - Expert Consensus Document; 2012

حال در نظر بگیرید که بیماری رخ دهد. برای آنالیتی مانند کراتینین با II کوچک، نقطه‌ی تنظیم همه‌ی بیماران به طرف بالا جابجا می‌شود. اما به دلیل کوچک بودن گستره‌ی شخصی افراد، همچنان نقطه‌ی تنظیم و گستره‌ی جواب بسیاری از افراد درون محدوده‌ی مرجع باقی خواهد ماند و تنها نقطه‌ی میانگین و گستره‌ی اندکی از بیماران به بیرون از محدوده جابجا خواهد شد (کسانی که نقطه‌ی تنظیم ایشان به مرز بالایی نزدیک بود) و بنا بر این کراتینین ایشان بیرون از محدوده خواهد بود. چنانچه آزمایش این شمار اندک تکرار شود چون گستره‌ی نوسان نتیجه‌ی ایشان به دلیل بیماری کاملا به بیرون از محدوده رانده شده است باز هم نتیجه‌ی ایشان غیرطبیعی خواهد بود. این یعنی اگرچه شمار کمی از بیماران از شانس شناسایی شدن برخوردارند اما این شانس برای این گروه شانس بالایی است. وقتی که آنالیتی فردیت بالایی دارد (II کوچک است) با پیشرفت بیماری و جابجا شدن هرچه بیشتر نقطه‌ی تنظیم فرد به سوی یکی از مرزها و سپس گذر از آن، شانس تشخیص بیماری افزایش می‌یابد.

در مورد آنالیت‌هایی که فردیت کمی دارند و II آن‌ها بزرگ است، مانند آهن، با بروز بیماری و جابجه شدن نقطه‌ی تنظیم به سوی یکی از مرزها، چون میانگین‌های همه‌ی افراد تقریبا نزدیک هم است (حدود میانه‌ی محدوده‌ی مرجع) به دنبال بیماری نیز تقریبا همه به یک اندازه جابجا می‌شوند. اما چون گستره‌ی نوسان فردی زیاد است به رغم جابجا شدن نقطه تنظیم، اگرچه نتیجه‌های یک بیمار به دفعات بیشتر از یکی از مرزها بیرون خواهد بود اما همچنان شمار بسیاری از نتیجه‌های وی درون مرزها خواهد بود. در این مورد، برخلاف مورد آنالیت‌های دارای فردیت بالا، همه‌ی بیماران از شانس یکسانی برای تشخیص برخوردارند اما این شانس اندک است زیرا همچنان شمار زیادی از نتیجه‌ها درون محدوده خواهد بود. از سوی دیگر چنانچه یک نتیجه‌ی غیر طبیعی را برای "تایید کردن" تکرار کنیم، به احتمال زیاد نتیجه‌ی تکراری درون محدوده خواهد بود که دلیل آن CV_I بزرگ آنالیت است. تنها هنگامی که نتیجه‌ی بیمار بسیار غیرطبیعی باشد احتمال دارد که نتیجه‌ی تکراری بازهم بیرون از محدوده باشد. در نتیجه، تکرار آزمایش برای این آنالیت‌ها با انتظار "تایید" نتیجه‌ی پیشین ممکن است که ما را به اشتباه بیندازد.

بنا بر این، در هر حال تکرار آزمایش‌ها خیلی سودمند نخواهد بود زیرا چنانچه آنالیتی دارای فردیت بالایی باشد جدای از این که نتیجه‌ی پیشین فردی که واقعا بیمار است طبیعی بوده است یا غیر طبیعی، باز هم نتیجه‌ای شبیه نتیجه‌ی پیشین به دست خواهد آمد. در مورد آنالیت‌های دارای فردیت پایین نیز شانس طبیعی بودن نتیجه‌ی تکراری بسیار بالا است و به اصطلاح نتیجه‌ی پیشین تایید نخواهد شد و چه بسا که سبب گمراهی در تشخیص شود. اگر بخواهیم تشبیه کنیم، در مورد آنالیت دارای فردیت بالا امکان گیر انداختن یک نتیجه‌ی غیرطبیعی و تشخیص بیماری مانند زمانی است که یکی از گروه مهاجمان هنگام فرار نتواند به درون محدوده‌ی امن و پوشیده باز گردد و پشت درهای بسته از گروه جابماند. هرگاه که نگهبان (بخوانیم آزمایشگاه!) از بالای برج به محوطه نگاه کند این شخص را خواهد دید. چنانچه نگهبان شک کند و خود وی یا نگهبان دیگری دوباره محوطه را نگاه کند آن شخص دوباره دیده خواهد شد زیرا اگرچه جابجا می‌شود اما چون امکان بازگشت به محدوده‌ی پوشیده را ندارد همواره در معرض دید است. اما مثال آنالیت‌های دارای CV_G گسترده و II بزرگ به آن می‌ماند که کسانی که به دنبالشان هستیم امکان رفت و آمد بین منطقه‌ی بدون پوشش و منطقه‌ی پوشیده شده را داشته باشند. در چنین موردی اگر بیماری شانس بیاورد و برحسب اتفاق نتیجه‌ی آزمایش وی بیرون از منطقه‌ی پوشش (محدوده‌ی طبیعی) قرار بگیرد و دیده شود، درخواست نگاه کردن دوباره (تکرار آزمایش) تنها دادن شانس فرار و بازگشت جواب به محدوده‌ی پوشش است! راه درست این است که اگر احتمال پیشینی وجود بیماری بالا است و جواب آزمایشی با فردیت بالا به طور واضحی از مرز طبیعی بیرون است به آن اعتماد کنیم؛ و بر عکس در مورد آزمایش با فردیت پایین اگر به رغم احتمال پیشینی بالا جواب آزمایش درون محدوده‌ی طبیعی است به آن اطمینان نکنیم و آزمایش را تکرار کنیم تا هم شانس به دست آوردن جواب بیرون از محدوده را افزایش دهیم و هم با میانگین گرفتن از نتیجه‌های تکراری برآورد دقیقتری از نقطه‌ی تنظیم بیمار داشته باشیم.

❖ کاربردهای دیگر نوسان زیستی

➢ تعداد نمونه

برای این که بتوانیم برآورد درستتری از نقطه‌ی تنظیم یک آنالیت در بدن داشته باشیم گاه لازم است که بیش از یک بار نمونه‌گیری کنیم تا همانطور که پیشتر گفته شد از تاثیر نوسان زیستی درون‌فردی بکاهیم. برای حساب کردن این که چه تعداد نمونه لازم است از فرمول "انحراف معیار میانگین" استفاده می‌کنیم:

$$n = [Z * (CV_A^2 + CV_I^2)^{1/2} / D]^2$$

در این رابطه D درصد موردنظر برای نزدیکی یک نتیجه به مقدار واقعی بدن است. فرض کنیم که برای این که نتیجه‌ی کلسترول از نظر بالینی قابل کاربرد باشد باید نتیجه‌ای که گزارش می‌شود با احتمال ۹۵% حداکثر ۱۰% بیشتر یا کمتر از نقطه‌ی تنظیم بدن فرد باشد؛ یعنی D برابر ۱۰% باشد. چنانچه تکرارپذیری روش ۳% باشد و با نوسان زیستی درون‌فردی برابر ۵.۴% برای کلسترول:

$$n = [1.96 * (3^2 + 5.4^2)^{1/2} / 10]^2 = 1.5 \approx 2$$

یعنی برای این که چنین اطمینانی به نتیجه داشته باشیم با چنین روشی باید بیمار دو بار به فاصله‌ی یک تا دو هفته نمونه بدهد و از نتیجه‌های وی میانگین گرفته شود و بر پایه‌ی آن میانگین در باره‌ی وضعیت بیمار داوری شود. فرضی که در این مثال از آن سخن راندیم یک فرض نیست و "باید" است. در واقع بر پایه‌ی پژوهش‌های فراوان، NCEP به این نتیجه رسیده است که برای این که نتیجه‌ی سنجش کلسترول کاربردی باشد باید از چنین اطمینانی برخوردار باشد و بر پایه‌ی چنین الزامی است که در متن‌های علمی دو بار نمونه‌گیری برای کلسترول به فاصله‌ی یک تا دو هفته توصیه شده است، و باز بر پایه‌ی چنین الزامی است که NCEP تکرارپذیری مجاز سنجش کلسترول را دست بالا ۳% تعیین کرده است. روشن است که اگر تکرارپذیری روش سنجش بیش از حد مجاز ۳% باشد آنگاه باید نمونه‌ها بیشتری گرفت؛ مثلا چنانچه CV_A به ترتیب ۷% و ۱۰% باشد آنگاه تعداد دفعه‌های نمونه‌گیری باید به ترتیب به ۳ و ۵ بار افزایش یابد تا همچنان بتوانیم از راهنمای NCEP برای داوری و تصمیم‌گیری بالینی در باره‌ی بیماران استفاده کنیم.

در اینجا بیرون از بحث اشاره می‌شود که نکته‌ی بسیار مهمی که باید همواره رعایت شود این است که اگر بناست از راهنماها و دستورکارهای علمی استفاده شود باید آن راهنماها و دستورکارها حتما مشخص کنند که آزمایشگاه‌ها باید با چه کیفیتی از نظر "تکرارپذیری" و "نامیزانی" کار کنند، و آزمایشگاه‌ها نیز حتما باید پایبند به آن الزامات کیفیت باشند تا پزشکان بتوانند نتیجه‌های به دست آمده را بر اساس آن راهنماها و دستورکارها تفسیر کنند؛ در غیر اینصورت تفسیر نتیجه‌ی آزمایش‌هایی که با کیفیتی غیر از آنچه مورد نظر است انجام شده‌اند، و اقدام بالینی بر پایه‌ی چنین آزمایش‌هایی نتیجه‌ای جز گمراهی در پی نخواهد داشت. خوشبختانه در بسیاری از راهنماها الزامات کیفیت آزمایش‌ها مشخص شده است مانند راهنمای NCEP در باره‌ی لیپیدها، بیانیه‌ی کارشناسی اروپا-امریکا در باره‌ی سنجش تروپونین، راهنمای ATA[18] در باره‌ی سنجش آنالیت‌های تیروئیدی، و راهنمای NABC[19] در باره‌ی

[18] American Thyroid Association
[19] [US] National Academy of Clinical Biochemistry

آزمایش‌های مربوط به دیابت است. آنچه باقی می‌ماند لزوم همکاری و هماهنگی بین آزمایشگاه و پزشکان است تا نتیجه‌های فراهم شده از چنان کیفیتی برخوردار باشند که قابلیت داوری بر پایه‌ی راهنماهای معتبر را داشته باشند.

➢ انتخاب آزمایش

به طور کلی باید گفت که آزمایش‌هایی که II بزرگی دارند به کار تشخیص، موردیابی و غربالگری می‌آیند و آزمایش‌هایی که II کوچکی دارند به کار پیگیری وضعیت بیمار می‌آیند. مثلا آزمایش سیستاتین C با شاخص فردیت ۱.۶۴ برای بیماریابی سودمند است اما برای پیگیری وضعیت بیمار مناسب نیست. برعکس آزمایش کراتینین با شاخص فردیت ۰.۴۴ اگرچه چندان به کار بیماریابی نمی‌آید ولی برای پیگیری وضعیت بیمار بسیار بهتر از آزمایش سیستاتین C است.

➢ گزارش نتیجه‌ها

گاهی در مورد آزمایش‌هایی مثل کراتنین ادرار ۲۴ساعته پرسش این است که گزارش نتیجه به صورت غلظت بهتر است یا به صورت برونده در ۲۴ ساعت. برای پاسخ به چنین پرسشی می‌توان از اطلاعات نوسان زیستی سود برد. برای یافتن پاسخ می‌توان به جدول ۵ مراجعه کرد.

جدول ۵ – شاخص فردیت تعدادی آزمایش‌های کراتینین ادرار ۲۴ ساعته

آنالیت	CV_I	CV_G	II
Creatinine, concentration, 24h	24	24.5	0.98
Creatinine, output, 24h	11	23	0.48

با بررسی این جدول دیده می‌شود که گزارش نتیجه به صورت برونده، واحد در ۲۴ ساعت، به دلیل CV_I کوچکتر بر گزارش به صورت غلظت برتری دارد.

➢ گزینش بهترین نمونه برای سنجش

اندازه‌گیری غلظت‌های پایین آلبومین ادرار (میکروآلبومین) آزمایشی سودمند در شناسایی زودرس آسیب‌های کلیوی به ویژه در افراد دیابتی است. با وجود این می‌توان آن را در نمونه‌ی ادرار اتفاقی، ادرار صبحگاهی یا ادرار ۲۴ ساعته سنجید. برای گزینش نمونه‌ی بهتر باز هم می‌توان از اطلاعات نوسان زیستی که در جدول ۶ نمایش داده شده است بهره برد.

جدول ۶ – شاخص فردیت آزمایش‌های آلبومین ادرار			
آنالیت	CV_I	CV_G	II
Albumin, concentration, 24h	61	53	1.15
Albumin, concentration, first morning	36	55	0.65
Albumin, concentration, Random	86	41	1.41
Albumin, output, 24h	70	55	1.27
Albumin, output, night urine	29.5	58	0.51
Albumin/creatinine	30.5	32.5	0.94

از بررسی جدول ۶ دیده می‌شود که تعیین نسبت آلبومین به کراتینین گزینه‌ی بهتری است. به عنوان مثال‌های دیگر با مراجعه به جدول ۴ می‌توان دید که پلاسما برای سنجش گلوکز بهتر از سرم است زیرا CV_I آن کوچکتر است در حالیکه برای سنجش روی وضعیت برعکس است و سرم نمونه‌ی بهتری است.

➢ کارآ بودن آزمایش‌ها

گاهی سنجش برخی مواد به عنوان آزمایش‌های جدید مطرح می‌شوند که اگرچه امیدبخش به نظر می‌آیند اما به دلیل نوسان درون‌فردی یا بین‌افرادی بالا نمی‌توانند کاربردی باشند. نمونه‌ی چنین آزمایش‌هایی پیشنهاد سنجش hs-CRP به عنوان شاخصی برای تعیین تهدید بیماری‌های قلبی-عروقی است. بر پایه‌ی بیانیه‌ی مشترک AHA[20] و CDC در سال ۲۰۰۳ "چنانچه hs-CRP یک نفر دو بار در یک فاصله‌ی زمانی چند روزه با روشی با دقت ۱۰% سنجیده و میانگین گرفته شود"، می‌توان "مانند کلسترول" عددی را به دست آورد که با اطمینان ۹۵% دست بالا ۱۰% از مقدار واقعی بدن فرد دور باشد و سپس وی را در یکی از گروه‌های کم‌خطر، میان‌خطر یا پرخطر دسته‌بندی کرد.

اگرچه چنین آزمایشی جذاب به نظر می‌آید به ویژه آن که برای انجام آن روش بسیار دقیقی نیز نیاز نیست (CV_A مجاز برابر ۱۰%)، اما واقعیت این است که بر خلاف بینانیه‌ی AHA-CDC به دلیل CV_I بالا نتیجه‌ی کار هرگز "مانند کلسترول" نیست. پروفسور Callum G. Fraser از صاحب‌نامان پژوهش در باره‌ی نوسان زیستی در نوشته‌ای با نام "آیا بیانیه‌های علمی حقیقت علمی هستند؟" به بررسی کارآیی این آزمایش پرداخته است. چنانچه به روشی که فریزر به کار بسته است تعداد نمونه‌ها را برای CV_A برابر ۱۰% و CV_I برابر ۴۲.۲% حساب کنیم:

[20] American Heart Association

$$n = [1.96 * (10^2 + 42.2^2)^{1/2} / 10]^2 = 72!$$

عدد ۷۲ به دست خواهد آمد. یعنی اگر بخواهیم "مانند کلسترول" عددی به دست بیاوریم که با اطمینان ۹۵% دست بالا ۱۰% دور از نقطه‌ی تنظیم CRP در بدن فرد باشد باید ۷۲ بار از وی در روزهای گوناگون خون بگیریم و آزمایش کنیم و سپس از آن‌ها میانگین بگیریم؛ و نه ۲ بار. حتا اگر آزمایشگاه بتواند روشی را به کار بگیرد که بیدقتی آن صفر باشد باز هم مشکل چندان برطرف نخواهد شد:

$$n = [1.96 * (0^2 + 42.2^2)^{1/2} / 10]^2 = 68$$

زیرا نوسان زیستی درون‌فردی CRP چنان زیاد است که حتا با CV_A برابر صفر هم باز مشکل باقی خواهد ماند.

❖ سخن پایانی

از آنچه آمد می‌توان نتیجه گرفت که در نظر گرفتن نوسان، از هر نوعی که باشد: پیش‌سنجشی، سنجشی یا زیستی، به فهرست تشخیص افتراقی پزشکان هنگام تفسیر نتیجه‌ی آزمایش‌ها می‌افزاید. با این حساب، پزشک باید علاوه بر در نظر داشتن بیماری و وضعیت‌های بالینی گوناگون به عنوان علت به دست آمدن یک نتیجه یا تغییر در نتیجه‌ی یک آزمایش، احتمال‌های زیر را نیز در نظر بگیرد:

- نکند ناشی از رعایت نکردن شرایط پیش از سنجش باشد (نوسان پیش‌سنجشی)،
- نکند ناشی از نوسان زیاد روش سنجش باشد،
- نکند ناشی از نامیزانی زیاد روش سنجش باشد،
- نکند ناشی از تغییر در مقدار نامیزانی روش سنجش در فاصله‌ی دو سنجش باشد، و
- نکند ناشی از نوسان زیستی بالا (درون‌فردی و بین‌افرادی) باشد.

آنچه که می‌تواند از بندهای این فهرست یا از تاثیر آن‌ها بکاهد آن است که با همکاری و هماهنگی میان پزشک، بیمار و آزمایشگاه:

- شرایط پیش‌سنجشی برای آزمایش‌های گوناگون که در متن‌های علمی تعیین شده است بی کم و کاست رعایت شود تا نوسان پیش‌سنجشی ناچیز شود،
- آزمایشگاه الزامات کیفیت (دقت و نامیزانی) ویژه‌ی سنجش هر آنالیت را بشناسد و دقیقا رعایت کند؛ طوری که تاثیر نوسان سنجشی و نامیزانی تا اندازه‌ای که در سرنوشت بیمار تاثیرگذار نباشد کاهش یابد و تفسیر آزمایش‌ها با مراجعه به راهنماهای مراجع علمی صاحبنظر ممکن گردد، و
- با مراجعه به اطلاعاتی که به آسانی در باره‌ی کیفیت روش سنجش (تکرار پذیری و نامیزانی) و نیز نوسان زیستی درون‌فردی و بین‌افرادی آنالیت‌ها در دسترس است و با انجام محاسبه‌های ساده‌ای چون تعیین پراکندگی، RCV، و احتمال واقعی بودن تغییرها، تفسیر پربارتری از نتیجه‌های آزمایش به دست آورد.

در هر حال باید به یاد داشته باشیم که آنچه که آزمایشگاه‌ها گزارش می‌کنند "یک گستره است که با یک احتمال معین ممکن است مقدار واقعی بدن فرد در آن گستره باشد"؛ و نه یک عدد قطعی مطلق.

گزارش عددی که ۱۰۰% برابر مقدار واقعی یک آنالیت در بدن یک فرد باشد، **ادعایی** است که باید آزمایشگاهیان، و **انتظاری** است که باید پزشکان بی‌گمان از آن پرهیز کنند.

منبع‌ها:

1- Biological Variation: From principles to practice; Callum G. Fraser; AACC press; 2008

2- Imprecision and Physiological Variation; David G. Grenached; CLN; 2004

3- Are scientific statements the scientific truth?; Callum G. Fraser; Westgard Website

4- Biological Variation and desirable specifications for QC-2012; Carmen Ricos; Westgard Website (دیده شده در آبان ۱۳۹۱)

5- Third universal definition of myocardial infarction; ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Universal Definition of Myocardial Infarction; 2012