





آزمایشگاه مرکز بهداشت
شهرستان تبریز

کالبراسیون و دامنه اندازه گیری

دکتر اصغر قاسمی

PhD بیوشیمی بالینی

مسئول آزمایشگاه مرکز بهداشت شهرستان تبریز

کالیبراسیون

- کالیبراسیون: فرایند ارتباط سیگنال حاصل از اندازه‌گیری با غلظت آنالیت
- کالیبراتور (استاندارد): تبدیل سیگنال حاصل از اندازه‌گیری به غلظت آنالیت
- منحنی کالیبراسون: بر اساس سیگنال تولیدی و میزان آنالیت موجود در نمونه‌های کالیبراتور رسم میشود.

۱. کالیبراسون دو نقطه‌ای

۲. کالیبراسون چند نقطه‌ای

انواع کالیبراسیون

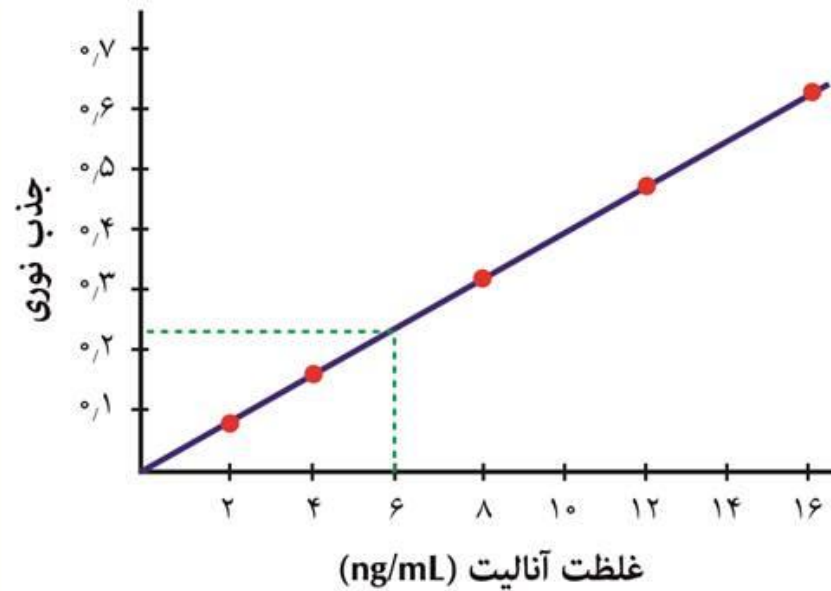
• کالیبراسیون دونقطه‌ای (Two-point calibration)

- ✓ از دو غلظت متفاوت کالیبراتور استفاده میشود (یکی از نقاط ممکن است صفر باشد)
- ✓ منحنی کالیبراسیون از نوع خطی است.
- ✓ معمولاً در اتوآنالیزورها استفاده می‌شود.
- ✓ چالش اصلی رابطه خطی در بالای نقطه تنظیم دوم (آزمایش خطیت)

• کالیبراسیون چند نقطه‌ای (Multi-point calibration)

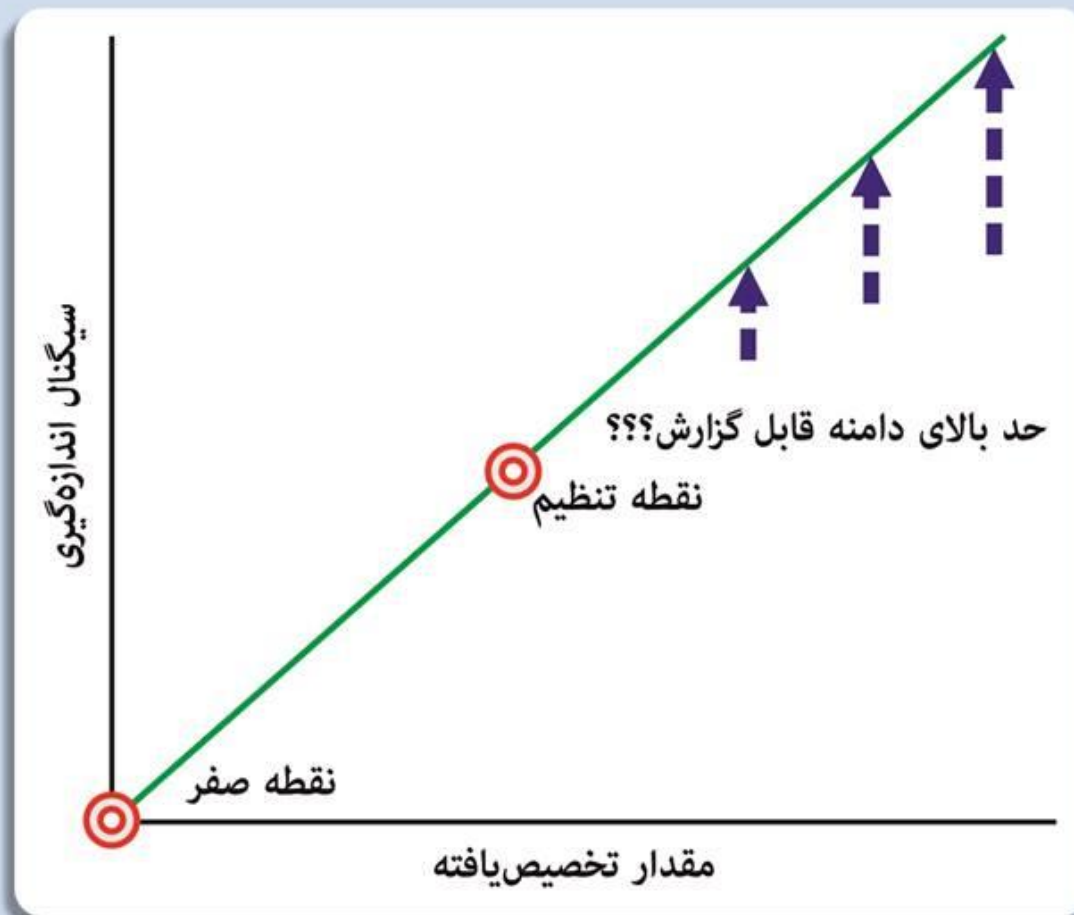
- ✓ از غلظت‌های بیشتر کالیبرانور استفاده می‌شود (۵ و بیشتر)
- ✓ معمولاً در روش‌های ایمونواسی استفاده می‌شود
- ✓ منحنی کالیبراسیون از نوع سهمی است.

منحنی استاندارد یا کالیبراسیون

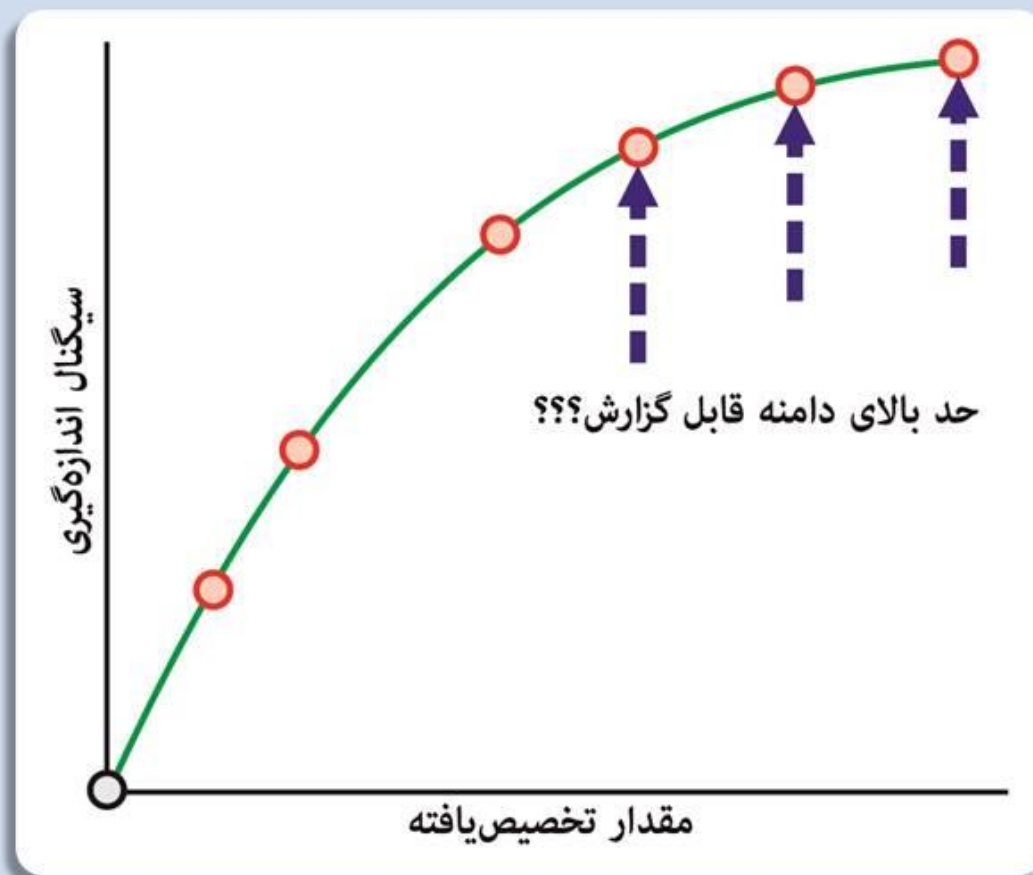


غلظت کالیبراتور (ng/mL)	میزان سیگنال (جذب نوری)
۲	۰/۰۸
۴	۰/۱۶
۸	۰/۳۲
۱۲	۰/۴۸
۱۶	۰/۶۴

کالیبراسیون دو-نقطه‌ای



کالیبراسیون چند-نقطه‌ای



تصدیق کالیبراسیون

کالیبراسیون: ارتباط بین سیگنال و میزان آنالیت را تعیین می کند.

تصدیق کالیبراسیون (Calibration verification): تایید می کند که تنظیمات جاری کالیبراسیون معتبر هستند یا نیستند.

معیار تصدیق کالیبراسون: نصف مقدار %TEa

زمان انجام تصدیق کالیبراسیون

- طبق مقررات CLIA هر شش ماه یکبار
- طبق دستورالعمل سازنده در فواصل زمانی کوتاهتر
- طبق تجربیاتی که احتمال یک تغییر تدریجی را مطرح می کنند در فواصل زمانی کوتاهتر
- وجود نتایج غیر قابل قبول کنترل کیفیت که با رهنماهای دیگر قابل حل نیستند.
- بعد از تغییر شماره ساخت معرف ها (در صورت عدم تایید صحت کالیبراسیون با نمونه های بیماران)
- بعد از تعمیر سیستم اندازه گیری و قبل از استفاده مجدد برای نتایج بیماران

مواد مورد استفاده برای کالیبراسیون تصدیق کالیبراسیون

- برای کالیبراسیون: مواد کالیبراتور که توسط شرکت تولیدکننده روش فراهم شده است.
- کالیبراتور یک روش قابل استفاده برای روش دیگر نیست.
- برای تصدیق کالیبراسیون:
- نمونه کالیبراتور
- مواد تصدیق کالیبراسیون
- نمونه مربوط به برنامه‌های مهرت آزمایشی
- نمونه بیماران دارای مقادیر شناخته شده
- نمونه‌های کنترل تجارتي

دامنه قابل اندازه‌گیری

تعریف: کمترین و بیشترین مقدار آنالیتی که به شکل قابل اعتماد اندازه‌گیری و گزارش شود.
آزمون خطی بودن (Linearity)
رابطه بین مقادیر اندازه‌گیری شده و مورد انتظار در دامنه اندازه‌گیری آزمایش

قابلیت‌های آشکار سازی

نام برآورد	تفسیر
حد بلانک (LoB)	حد بالای خوانش بلانک نمونه بلانک
حد آشکار سازی (LoD)	حد پایین گزارش (نه لزوماً تعیین مقدار) وجود آنالیت در نمونه
حد تعیین مقدار (LoQ)	کمتری میزان آنالیت که آن را می‌توان به درستی اندازه‌گیری کرد





آزمایشگاه مرکز بهداشت
شهرستان تبریز

کنترل کیفیت بر اساس نتایج سرم کنترل

کنترل کیفیت داخلی (IQC)

❖ بخشی از ارزیابی کیفیت

❖ برای ارزیابی فاز آنالیتیکال انجام آزمایش

❖ برای اطمینان از پایداری فرایند بعد از کالیبراسیون روش

کنترل کیفیت داخلی (IQC)

ضروریات

- ۱- دستگاه‌های سالم و کالیبره کیت‌های مناسب
- ۲- پرسنل آموزش دیده و صلاحیت دار
- ۳- تدوین روش‌های عملکرد استاندارد (SOP)
- ۴- اجرای دقیق و گام به گام SOPها

SOPها باید شامل:

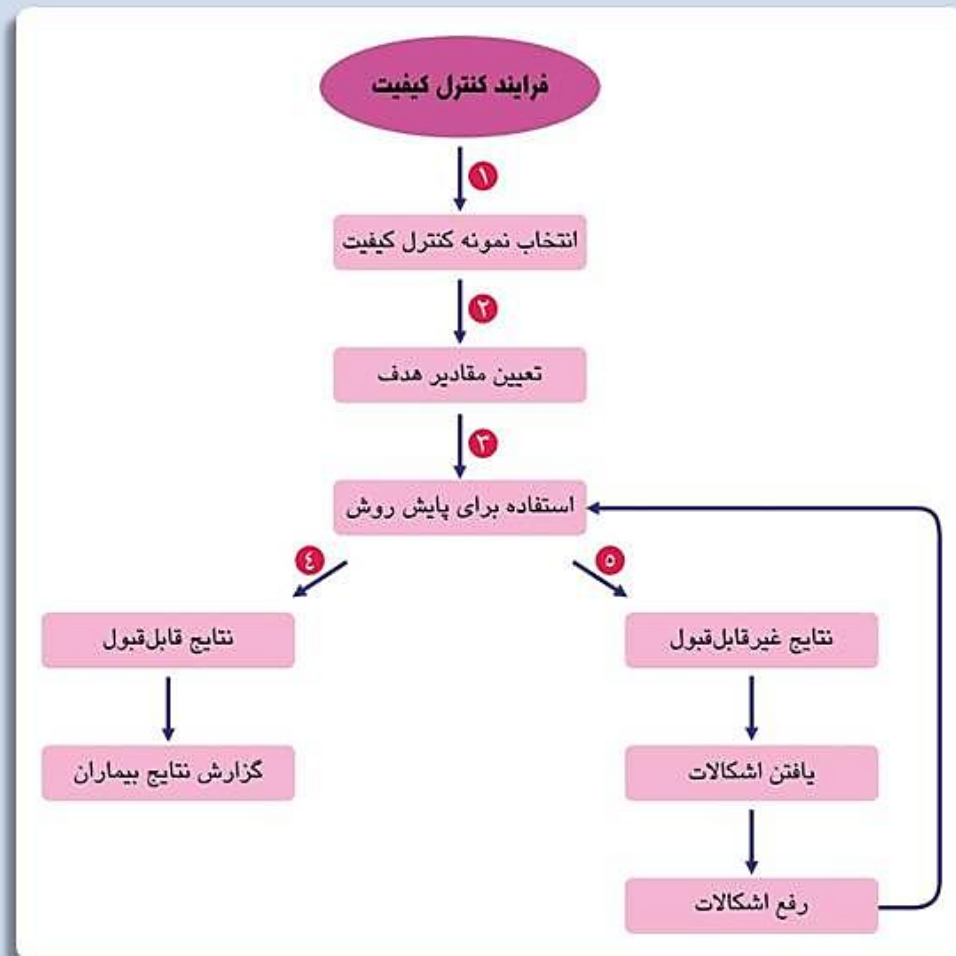
- ۱- تمامی جنبه‌های مربوط به انتخاب مواد کنترل
- ۲- نحوه تعیین پارامترهای آماری
- ۳- معیارهای تفسیر نتایج
- ۴- نحوه شناسایی مشکلات و انجام اقدامات اصلاحی مربوطه برای رفع آنها

مراحل کنترل کیفیت داخلی (IQC)

- ۱- انتخاب نمونه کنترل کیفیت
- ۲- تعیین مقادیر هدف و دامنه قابل قبول
- ۳- بکارگیری نمونه کنترل برای پایش عملکرد روش اندازه گیری
- ۴- استفاده از نمودارها و قوانین
- ۵- تفسیر نتایج
- ۶- برخورد با نتایج

فرایند کنترل کیفیت آماری

(Statistical Quality Control; SQC)



مرحله اول: انتخاب نمونه کنترل کیفیت

۱- مخلوط سرمی (Pooled Serum)

تهیه وقت گیر، پردردسر و احتمال آلودگی با عوامل عفونی ویروسی

۲- سرم کنترل تجاری

احتمال بروز اثرات ماتریکس

ویژگی‌های مورد نیاز برای نمونه‌های کنترل کیفیت

به شکل پایدار در ویالهای مجزا قرار داشته باشد.

تفاوت ویال به ویال در حداقل ممکن باشد.

ماتریکس نمونه کنترل مشابه ماتریکس نمونه‌های مورد نظر باشد.

نمونه‌های کنترل با غلظت‌هایی از آنالیت در دسترس باشند که برای تصمیم‌گیری پزشکی مهم هستند.



ماتریکس نمونه کنترل

- واکنش‌های اندازه‌گیری آنالیت‌ها تحت تاثیر: عوامل موجود در ماتریکس (زمینه) نمونه
- عوامل شامل: مواد معدنی و ترکیبات آلی موجود در نمونه
- به عنوان تسریع کننده (Accelerator) یا مهار کننده (Inhibitor)
- ماتریکس متفاوت نمونه کنترل با نمونه بیماران ← Matrix interference
- برای ممانعت از تداخلات ماتریکسی : ماتریکس نمونه کنترل و نمونه بیمار باید مشابه هم باشند.

نمونه کنترل وابسته و غیر وابسته

✓ نمونه کنترل وابسته (Dependent)

توسط شرکت تولیدکننده تجهیزات و یا معرف تولید می شود.
کالبراسیون درست-نتایج سرم کنترل درست-نتایج بیماران بالا یا پایین

✓ نمونه کنترل غیر وابسته (Independent)

توسط شرکت سوم (غیر از شرکت های تولیدکننده تجهیزات و معرف)

پایداری آنالیت‌ها

- نمونه‌های کنترل لیوفیلیزه (خشک): باید بازسازی شوند (Reconstitution)
- محدودیت: خطاهای حاصل از بازسازی
- نمونه‌های مایع: نیاز به بازسازی ندارند.
- محدودیت: تداخلات ماتریکسی
- پایداری آنالیت‌ها:
- در نمونه‌های باز نشده در یخچال و فریزر: بسیار زیاد
- در نمونه‌های باز شده: محدود با توجه به نوع آنالیت
- باید تاریخ انقضا (Expire time) تعیین شود.

حجم و تعداد نمونه‌های کنترل

• حجم

- در ویال‌های با حجم ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌لیتری در دسترس قرار دارند.
- در کاپ‌های تمیز به حجم مناسب (حداقل ۰/۵ میلی‌لیتری) تقسیم می‌شوند
- درب آن‌ها محکم بسته می‌شود.
- در شرایط مناسب معمولاً ۲۰- درجه نگهداری می‌شوند.

• تعداد

- هر چه تعداد بیشتر، کارایی بیشتر
- تعداد نمونه‌های کنترل مربوط به کسب نمره سیگما است.

غلظت آنالیت‌ها

- در هر برنامه QC باید از چند سطح کنترل (حداقل دو غلظت متفاوت) استفاده شود.

نوع آزمون	مثال	انتخاب غلظت
کمی متکی بر تفسیر کمی	تست‌های کمی بیوشیمی، هورمون، خون شناسی و ...	۱- دامنه آزمایش را مورد جستجو قرار دهد. ۲- در سطوح تصمیم‌گیری پزشکی قرار داشته باشد.
کمی متکی بر تفسیر کیفی	اندازه‌گیری غلظت داروها و HCG	در نزدیکی غلظت‌های آستانه برای تمایز جواب‌های مثبت و منفی
کیفی متکی بر پاسخ‌های درجه‌بندی	نوار ادرار در آنالیز ادرار	یک کنترل مثبت و یک کنترل منفی
کیفی وابسته به خصوصیات دیگر	روش‌های الکتروفورز، رنگ‌آمیزی مناسب، ایمونوفلورسانس و شناسایی میکروب‌ها	اطمینان از تمایز حالات طبیعی و پاتولوژیک

مرحله دوم: تعیین مقادیر هدف و انحراف معیار

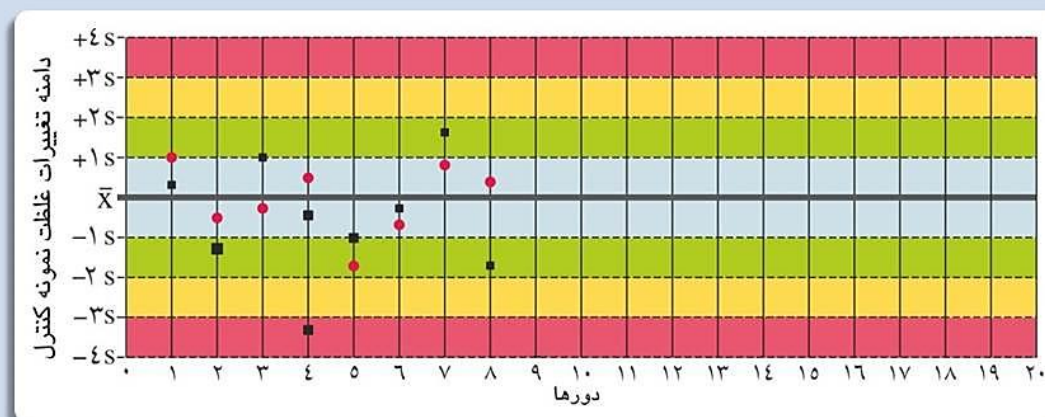
نکات مربوط به تعیین مقادیر هدف و انحراف معیار قابل اعتماد

تعیین پارامترهای آماری ابتدایی	نیاز به نمونه‌گیری تعداد نمونه کافی و طی دروه زمانی مناسب
شرایط مناسب	نیاز به حداقل ۲۰ نمونه (۲۰ روز کاری: بهترین حالت - ۱۰ روز کاری هر روز ۲ بار، ۵ روز کاری هر روز ۴ بار)
شرایط اضطرار	استفاده از نمونه کنترل با شماره ساخت جدید: نمونه کنترل وابسته است: می‌توان از محدوده و پارامترهای شرکت تولیدک‌کننده استفاده کرد. نمونه کنترل وابسته نیست: انجام آزمایش‌های تکراری (حداقل ۱۰ و ترجیحا ۲۰ بار) در یک دور کاری
مطلوب سازی پارامترهای قبلی	حالت ۱: استفاده از پارامترهای تعیین شده ابتدایی در سرتاسر دوره (امروزه توصیه نمی‌شود). حالت ۲: استفاده از پارامترهای تعیین شده هر ماه برای ماه بعد (احتمال انتقال خطاهای آشکار نشده به ماه بعد) حالت ۳: استفاده از پارامترهای تجمعی: (طی یک دوره ۶ تا ۱۲ ماهه؛ امروزه بیشتر توصیه می‌شود). حالت ۴: استفاده از ارزیابی هوشمندانه: اطمینان از کالیبراسیون صحیح روش و عدم دقت مورد انتظار

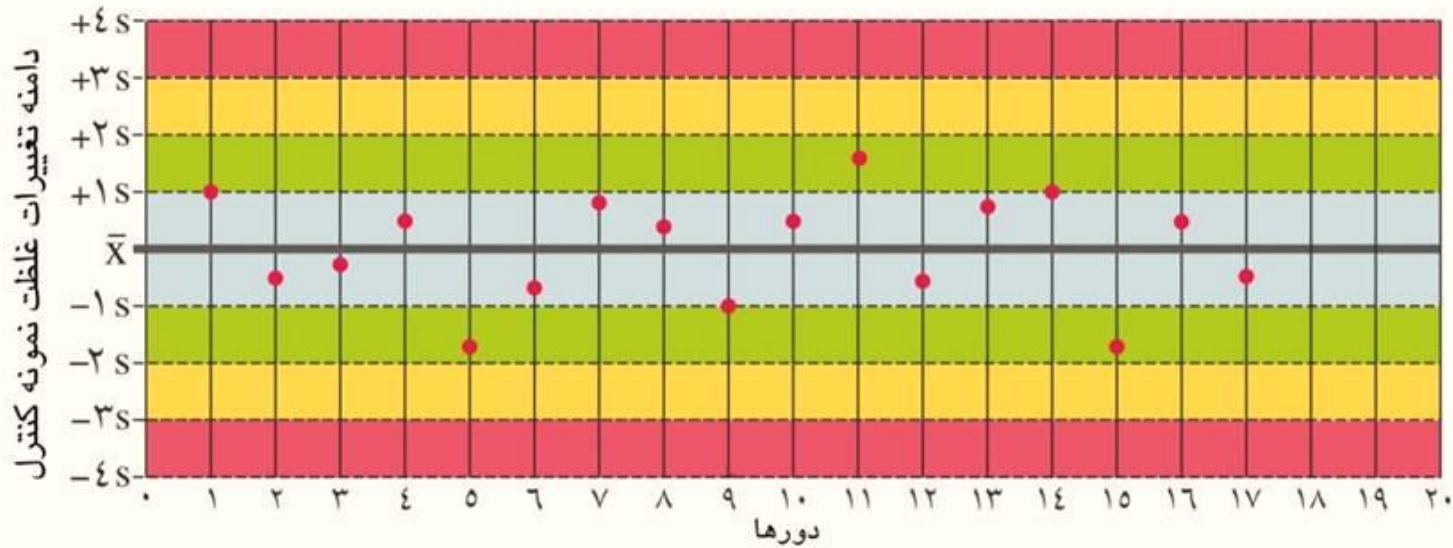


نمودارها و قوانین بررسی نتایج

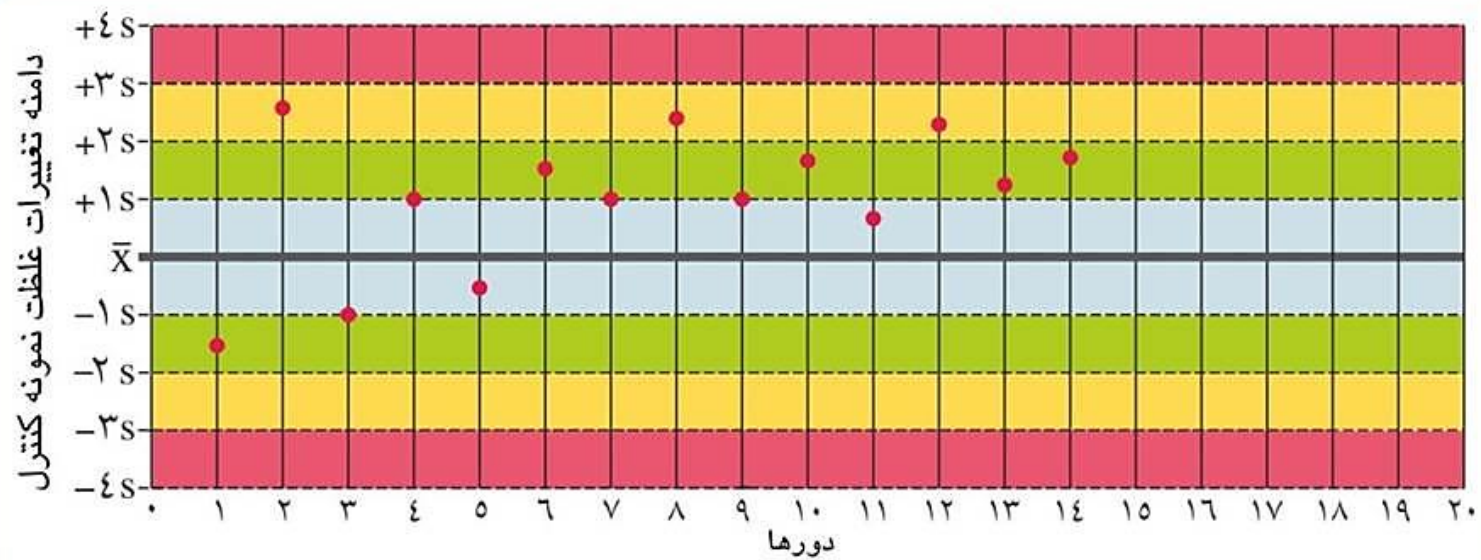
نمودار لوی-جینگز: تهیه نمودار



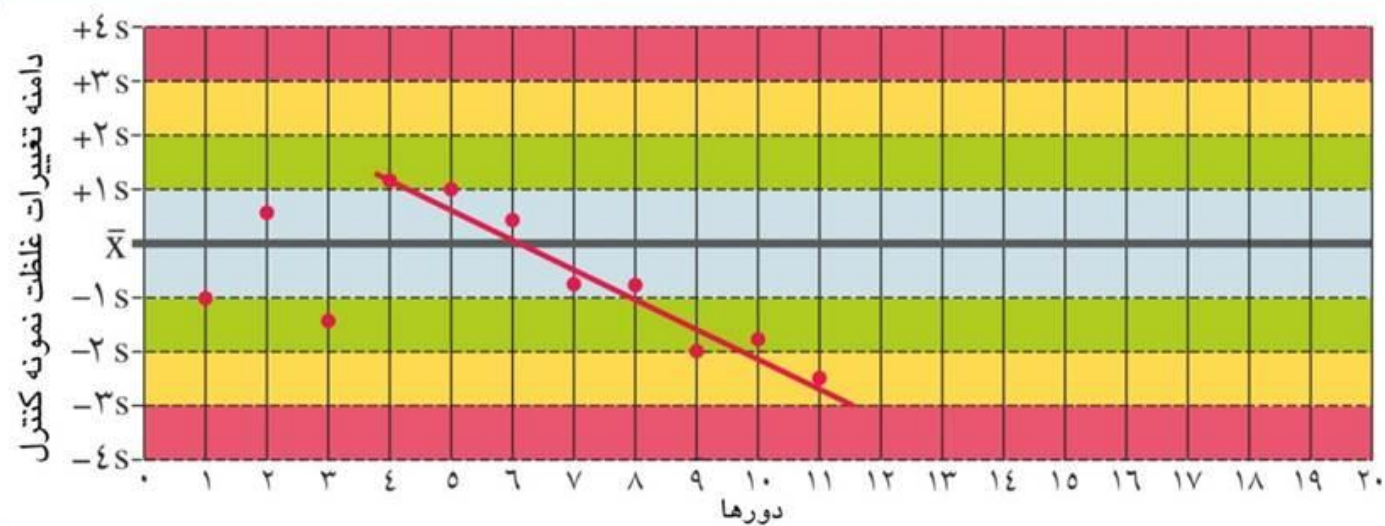
نمودار لوی-جنینگز: کنترل نتایج براساس قرارگیری آنها در محدوده $\bar{x} \pm 2SD$



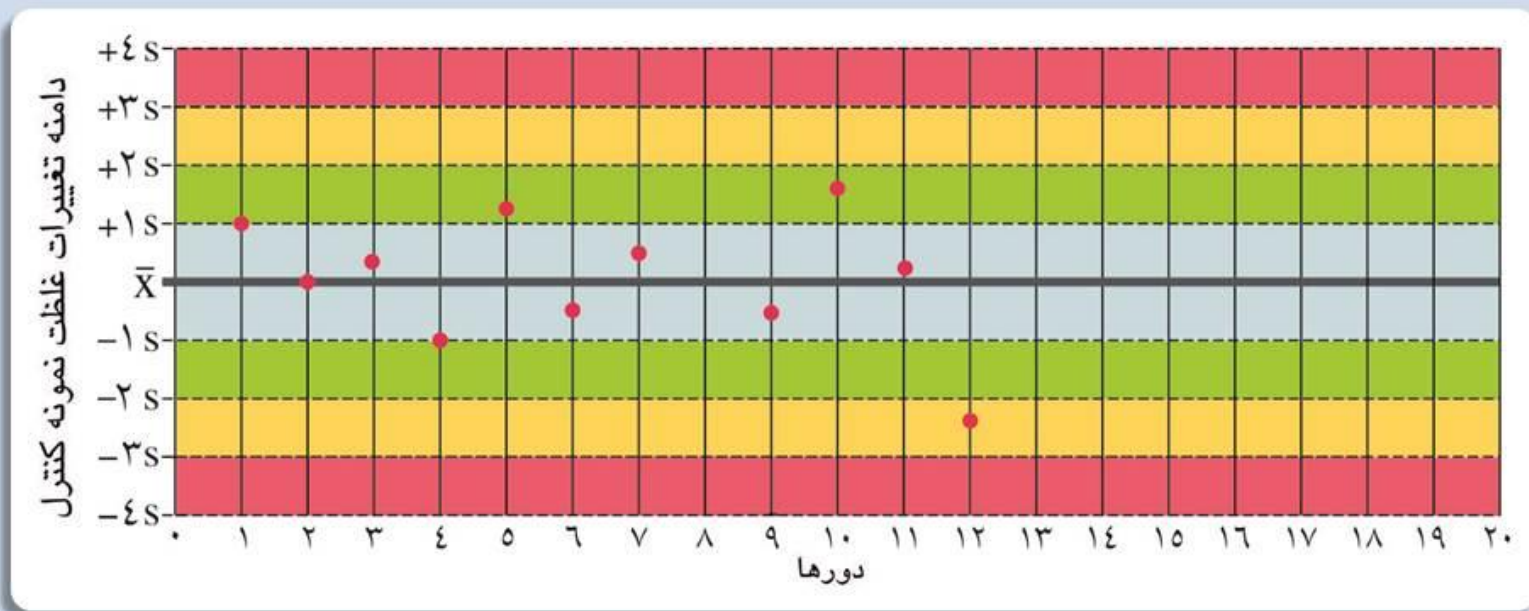
نمودار لوی-جینگز: جابه جایی



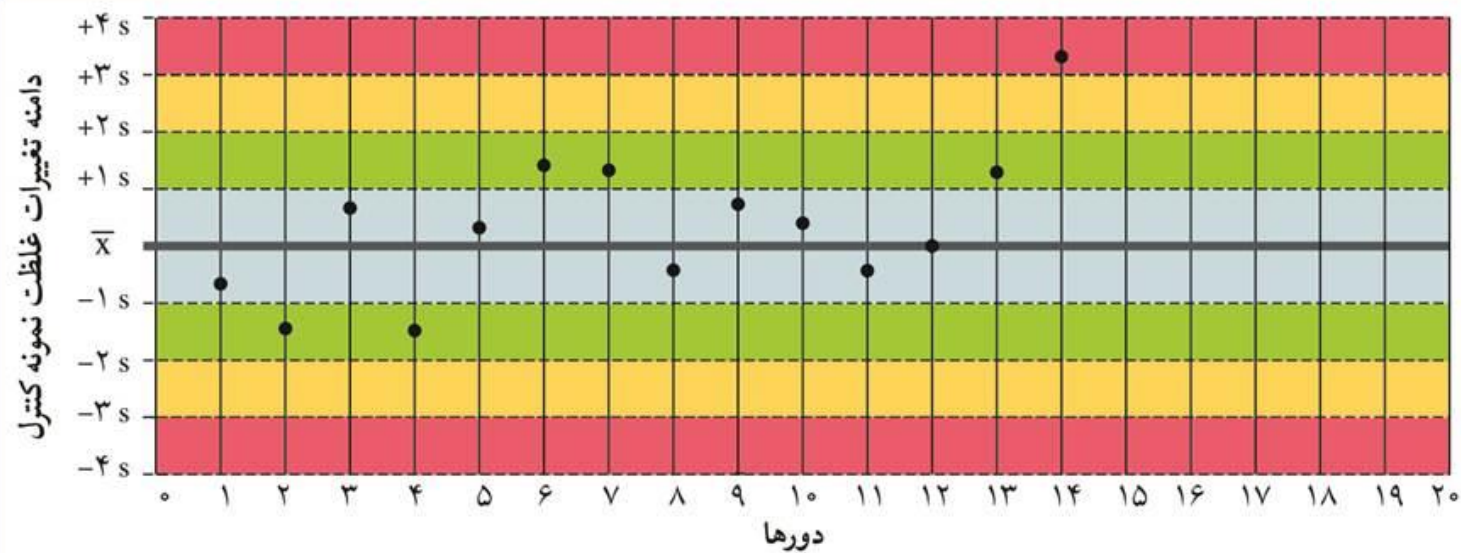
نمودار لوی-جینگز: گرایش



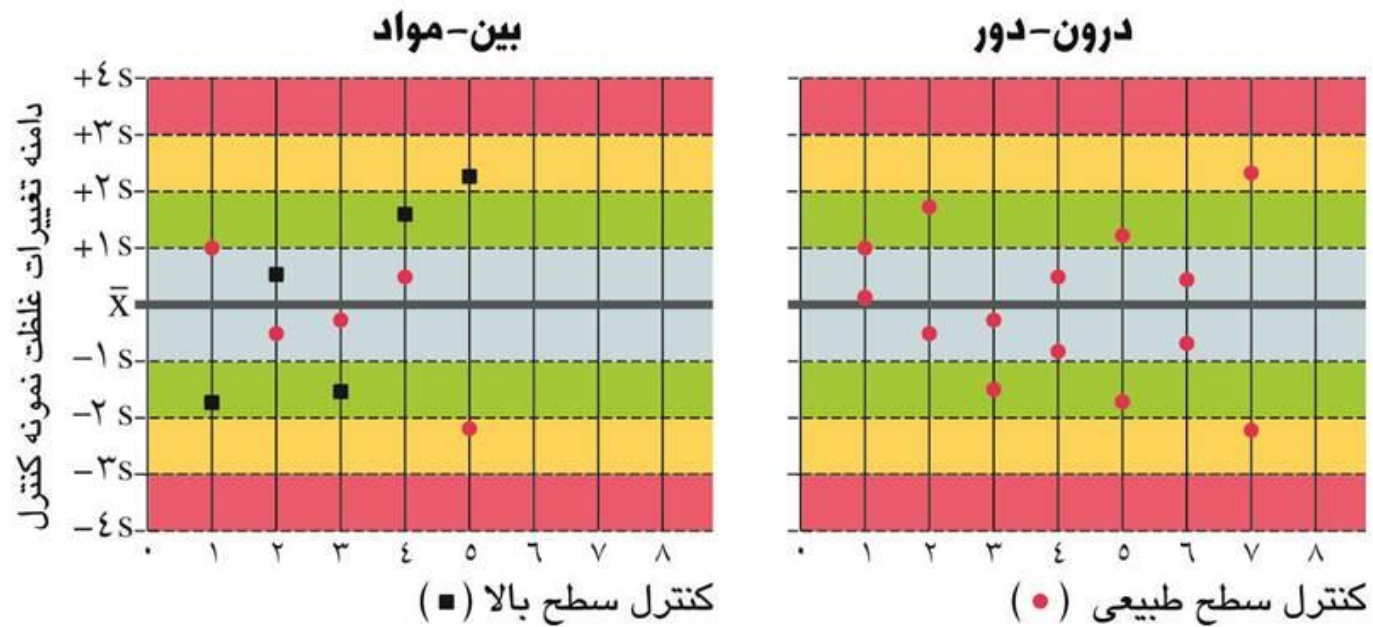
قواعد وستگارد: قانون 1_{2s}



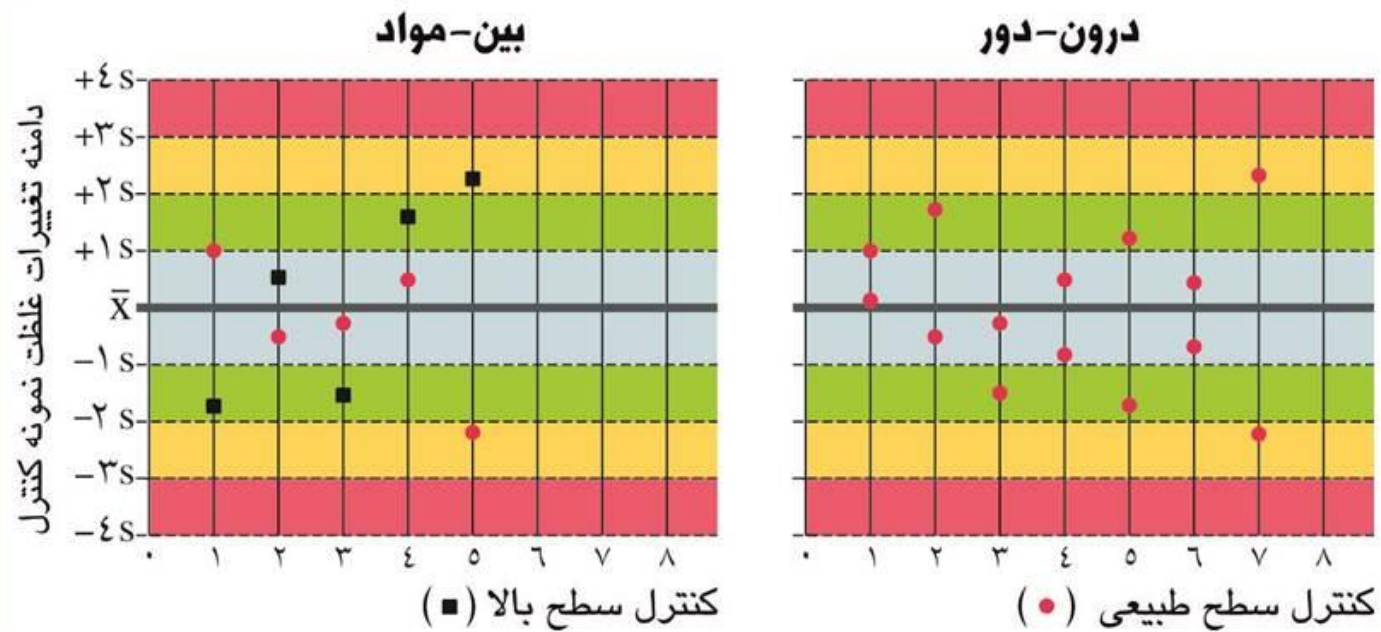
قواعد وستگارد: قانون 1_{3s}



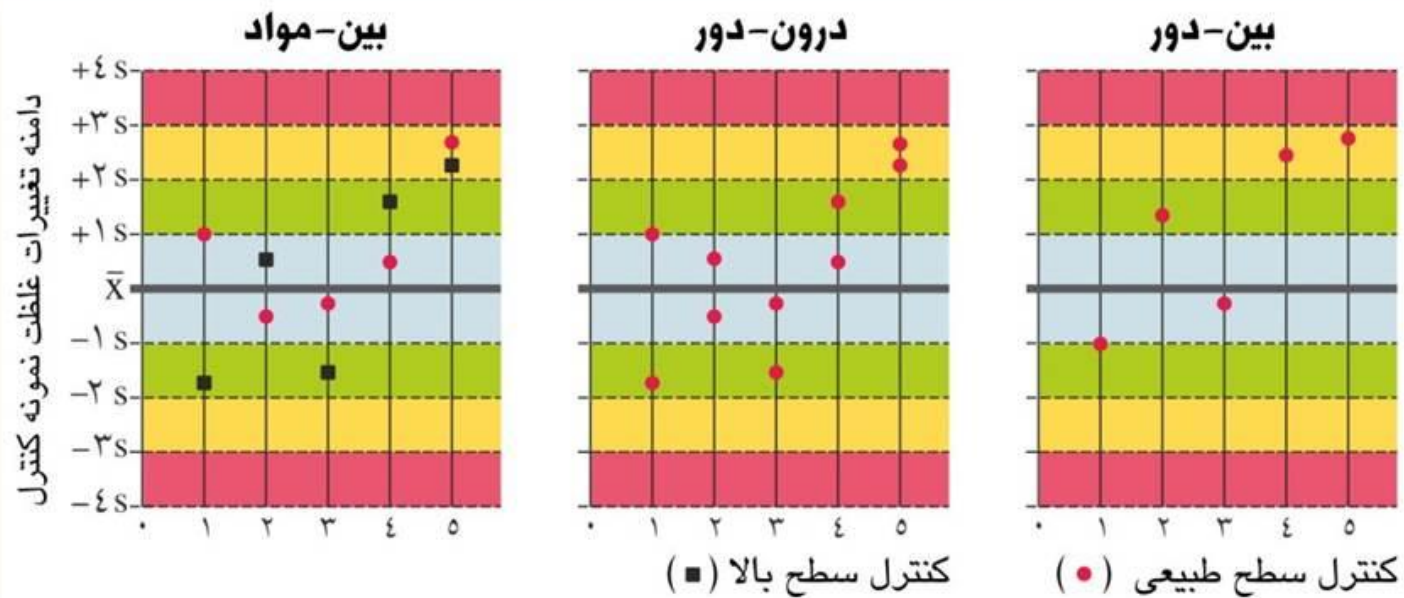
قواعد وستگارد: قانون R_{4s}



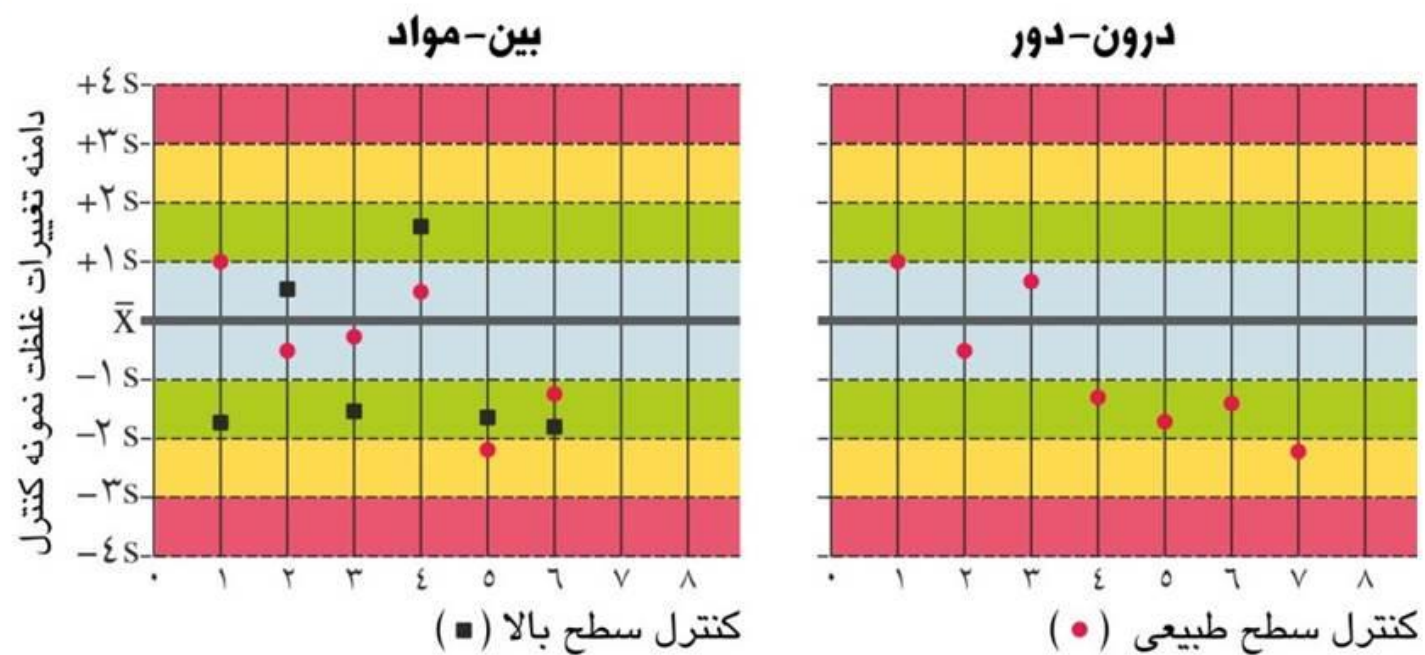
قواعد وستگارد: قانون R_{4s}



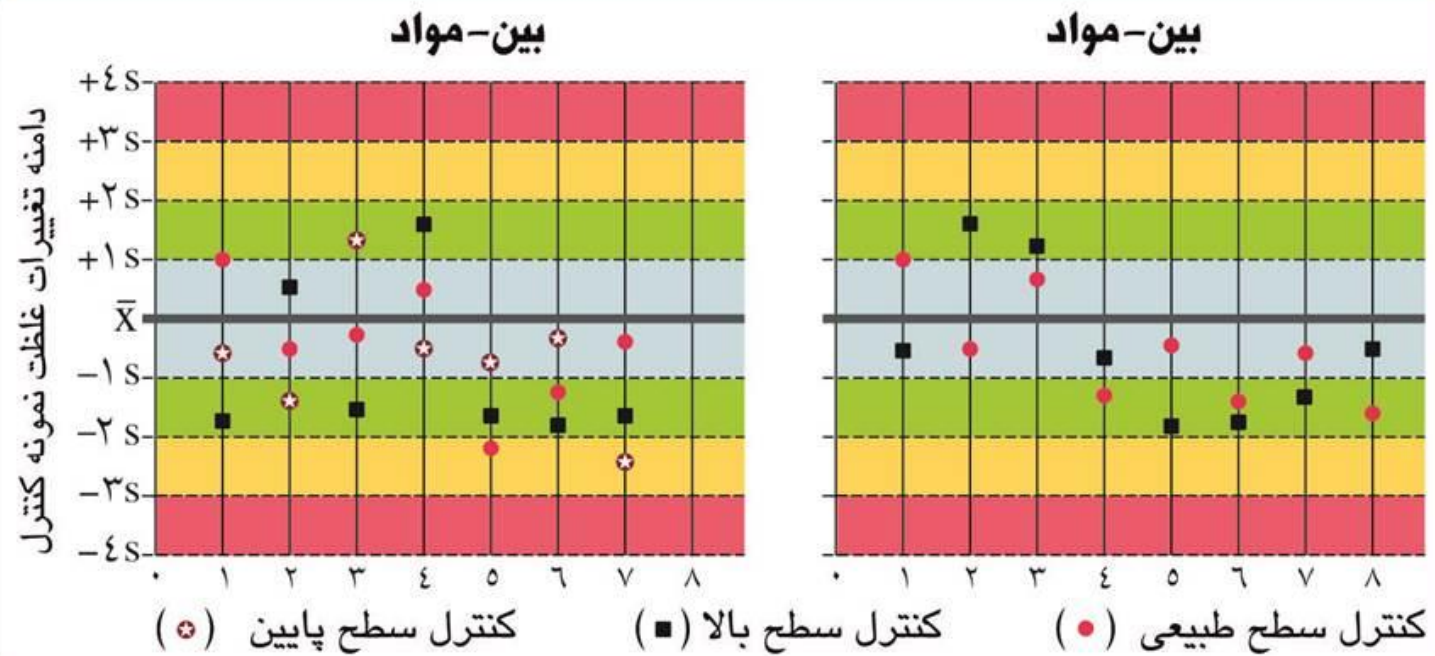
قواعد وستگارد: قانون 2_2s



قواعد وستگارد: قانون 4_{1s}



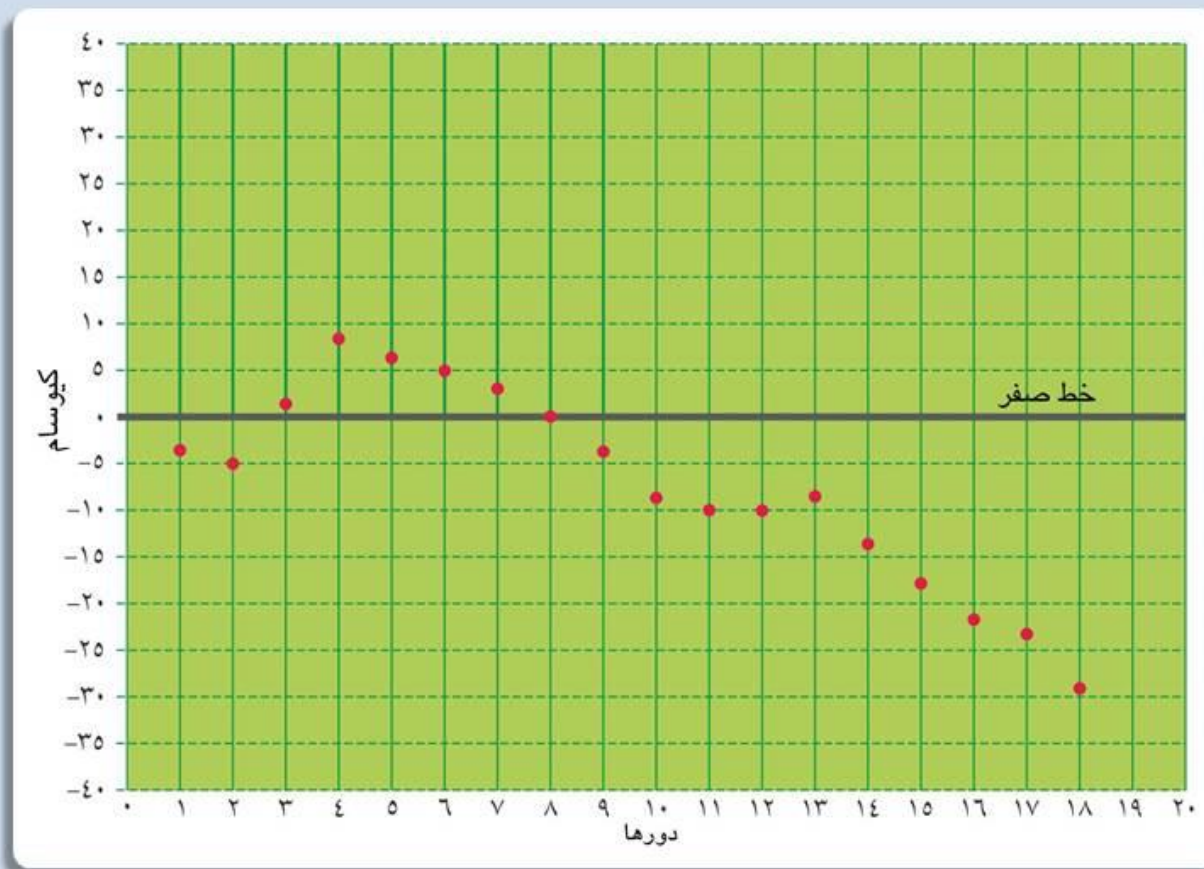
قواعد وستگارد: قانون 10_x



خصوصیات قواعد و ستگارد

جدول ۱-۷ خصوصیات قواعد و ستگارد				
قاعده	تعریف	آشکارسازی		قابلیت استفاده
		خطای	بین-دور	بین-مواد
1 _{2s}	اختلاف یک نتیجه از میانگین به میزان بیش از ۲ SD و کمتر از ۳ SD	تصادفی	-	-
1 _{3s}	اختلاف یک نتیجه از میانگین به میزان بیش از ۳ SD	تصادفی	-	-
R _{4s}	اختلاف دو نتیجه متوالی به میزان بیش از ۴ SD	تصادفی	خیر	بلی
2 _{2s}	اختلاف دو نتیجه متوالی از میانگین به میزان بیش از ۲ SD و در یک جهت (بالا یا پایین)	نظام‌مند	بلی	بلی
4 _{1s}	اختلاف چهار نتیجه متوالی از میانگین به میزان بیش از ۱ SD و در یک جهت (بالا یا پایین)	نظام‌مند	بلی	بلی
10 _x	قرارگیری ۱۰ نتیجه متوالی در یک سمت میانگین (بالا یا پایین)	نظام‌مند	بلی	بلی

نمودار کنترلی تجمعی (کیوسام)



مثالی از محاسبات کیوسام

جدول ۷-۲ مثالی از محاسبات کیوسام برای یک روش اندازه‌گیری گلوکز سرم با استفاده از یک نمونه کنترل دارای میانگین هدف ۱۰۰ mg/dL (شکل ۱۴-۷ را نیز ببینید)

شماره مشاهده کنترل	میزان کنترل	اختلاف با میانگین	اختلاف تجمعی
۱	۹۶	-۴	-۴
۲	۹۹	-۱	-۵
۳	۱۰۶	+۶	+۱
۴	۱۰۷	+۷	+۸
۵	۹۸	-۲	+۶
۶	۹۹	-۱	+۵
۷	۹۸	-۲	+۳
۸	۹۷	-۳	۰
۹	۹۶	-۴	-۴
۱۰	۹۶	-۴	-۸
۱۱	۹۸	-۲	-۱۰
۱۲	۱۰۰	۰	-۱۰
۱۳	۱۰۲	+۲	-۸
۱۴	۹۴	-۶	-۱۴
۱۵	۹۶	-۴	-۱۸
۱۶	۹۶	-۴	-۲۲
۱۷	۹۹	-۱	-۲۳
۱۸	۹۴	-۶	-۲۹

تفسیر نتایج کنترل کیفیت داخلی

• QC به عنوان یک سیستم زنگ خطر است.

برای داشتن یک زنگ خطر خوب نیاز است به:

✓ تعریف خطای مجاز

✓ استفاده از ابزار مناسب برای جستجوی خطا

دو نوع خطا:

۱. خطای ذاتی: همانند نویزی که در هر دستگاه به میزان کم و مختصر وجود دارد.

۲. خطای آزمایش: خطای تصادفی یا نظاممند بیش از حد، به صورت سیگنال شناسایی می شود.

روش کنترلی باید به گونه ای عمل کند که:

✓ اولاً سیگنال را در حضور نویز آشکار کند.

✓ ثانیاً: نویز را به عنوان سیگنال شناسایی نکند.

احتمال آشکارسازی خطا و احتمال رد کاذب

برای تمایز سیگنال و نویز از یکدیگر از دو نوع احتمال استفاده می‌شود:

۱. احتمال رد کاذب (P_{fr}): احتمال وجود یک زنگ در غیاب خطای آنالیتیکال

حالت ایده‌آل: $P_{fr} = 0.00$

۲. احتمال آشکارسازی خطا (P_{ed}): توانایی آشکارسازی خطای (سیگنال) فراتر از نویز

حالت ایده‌آل: $P_{ed} = 1.00$

وقتی روش کنترلی حاکم بتواند ۹۰٪ خطاها را شناسایی کند ($P_{ed} = 0.9$) و میزان رد کاذب حداکثر ۵٪ باشد ($P_{fr} = 0.05$) عملکرد آن مناسب در نظر گرفته می‌شود.

تفسیر نتایج کنترل کیفیت داخلی

امروزه قواعد و ستگارد به آن شکلی که پیشتر توضیح داده شده‌اند مورد استفاده قرار نمی‌گیرد.

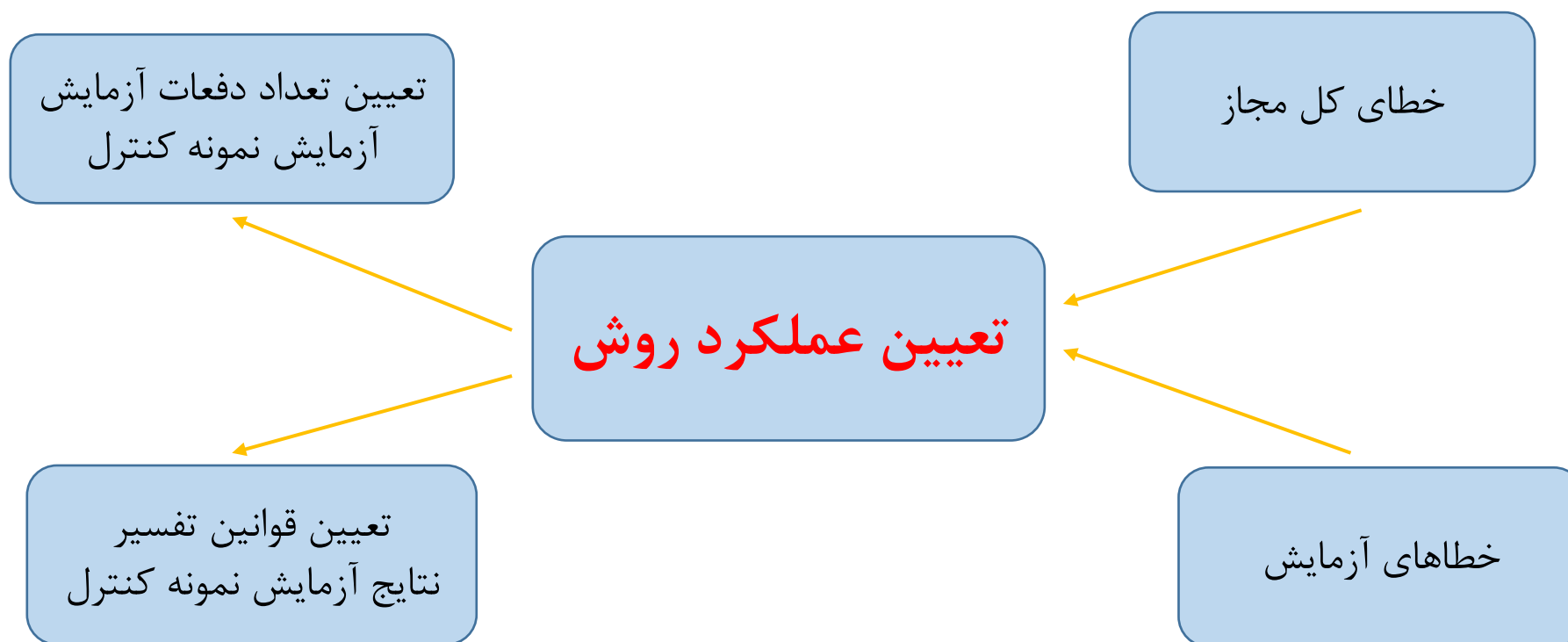
در آزمایشگاه‌های بالینی اولین ضرورت در راه‌اندازی کنترل کیفیت داخلی برای یک روش آزمایش، تعیین تعداد دفعات آزمایش نمونه کنترل و انتخاب قواعد کنترلی برای تفسیر نتایج بر اساس اهداف کیفیتی مورد نیاز و عملکرد روش می‌باشد.



انجام صحیح کنترل کیفیت داخلی صحیح با استفاده از تعداد مناسب دفعات
آزمایش نمونه کنترل و قواعد کنترلی صحیح

Westgard J.O. Ann Clin Biochem. Internal quality control: planning and implementation strategies.
Ann Clin Biochem 2003;40:593-611

تفسیر نتایج کنترل کیفیت داخلی (ادامه)



تفسیر نتایج کنترل کیفیت داخلی (ادامه)

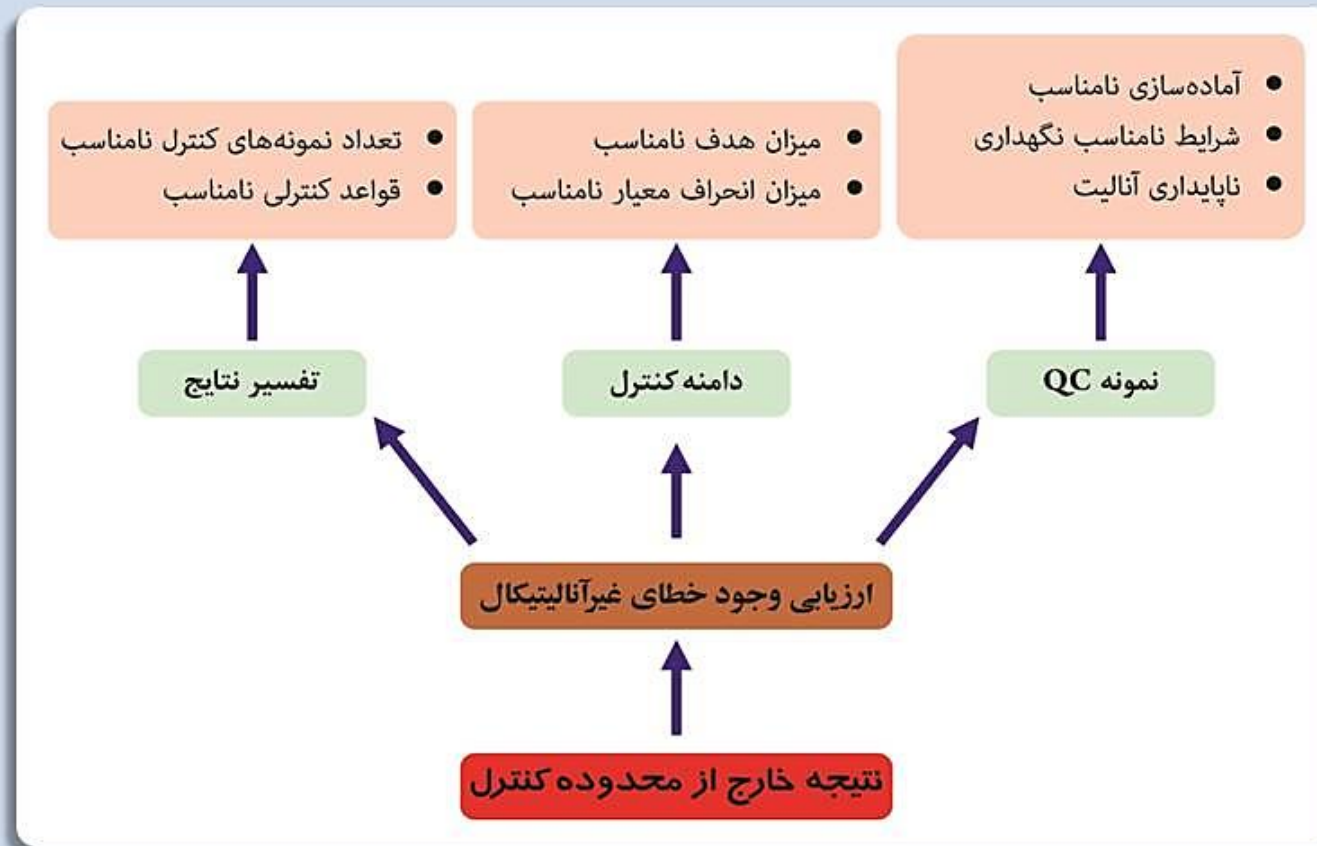
تعداد دفعات آزمایش نمونه‌های کنترل (N) در یک یا چند دور کار (R) روزانه و قواعد کنترلی مورد استفاده بر اساس عملکرد (سیگمای) روش در هنگام استفاده از دو سطح کنترل

سیگما	N	R	قاعده/قواعد	توضیحات
۶	۲	۱	1_{3S}	در هر دور دو بار اندازه‌گیری کنترل (هر سطح یکبار)
۵	۲	۱	$1_{3S}/2_{2S}/R_{4S}$	در هر دور دو بار اندازه‌گیری کنترل (هر سطح یکبار)
۴	۴	۱	$1_{3S}/2_{2S}/R_{4S}/4_{1S}$	در هر دور چهار بار اندازه‌گیری کنترل (هر سطح دو بار)
	۲	۲		تقسیم کار روزانه به دو دور و در هر دور چهار بار اندازه‌گیری کنترل (هر سطح یکبار)
۴>	۴	۲	$1_{3S}/2_{2S}/R_{4S}/3_{1S}/8_X$	تقسیم کار روزانه به دو دور و در هر دور چهار بار اندازه‌گیری کنترل (هر سطح دو بار)
	۲	۴		تقسیم کار روزانه به چهار دور و در هر دور چهار بار اندازه‌گیری کنترل (هر سطح یکبار)

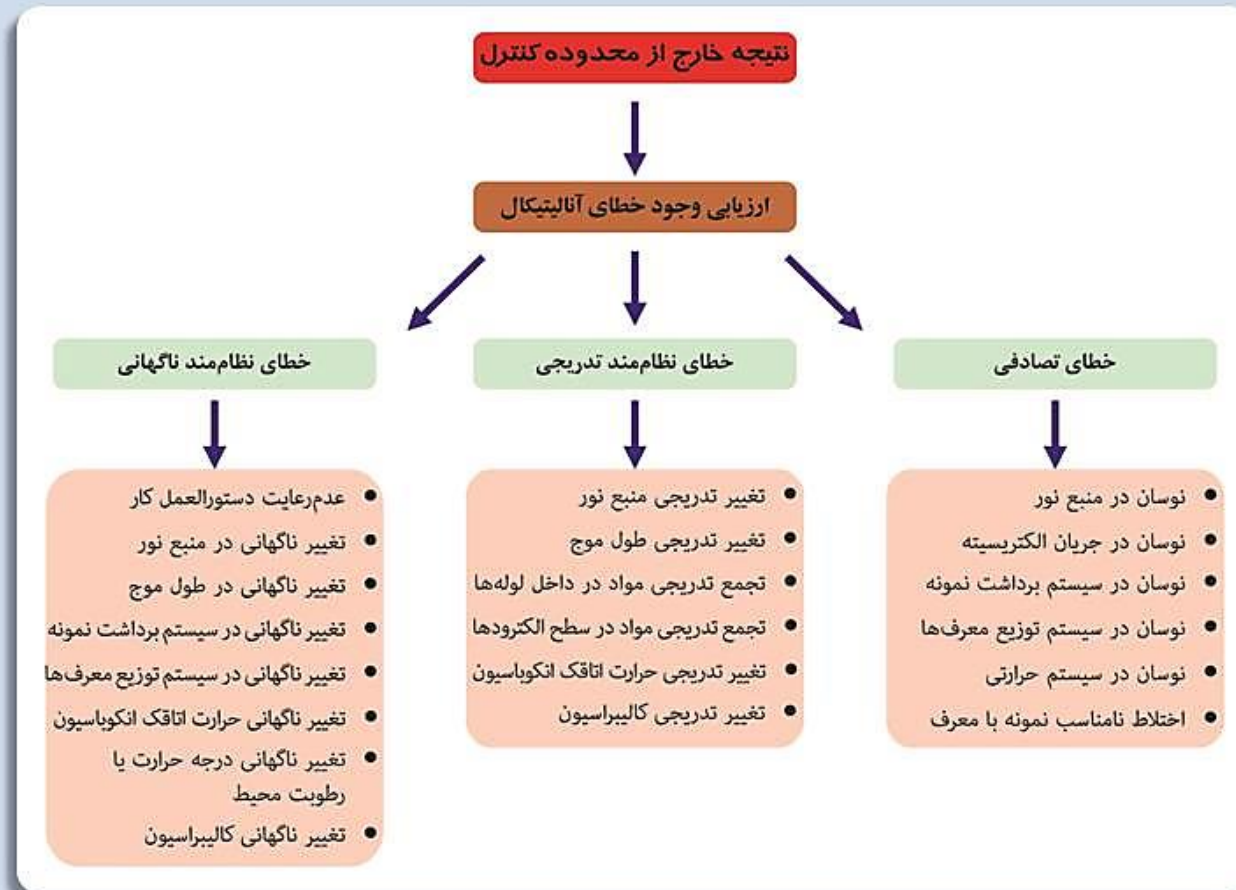
برخورد با نتایج خارج از محدوده



علل نتایج غیر قابل قبول



علل نتایج غیر قابل قبول



اقدامات اصلاحی و مستند سازی

راهکارهای اشتباه

۱. تکرار آزمایش نمونه QC

- تنها دلیل اجرای تکرار نمونه QC: شواهدی مبنی بر اشکال در نمونه QC

۲. کالیبراسیون مجدد (Recalibration)

- شرایط اجرای کالیبراسیون مجدد
- عدم تایید تصدیق کالیبراسیون
- کالیبراسیون با کالیبراتور شرکت تولید کننده روش
- عدم استفاده از میزان هدف نمونه کنترل برای کالیبراسیون

اقدامات اصلاحی و مستند سازی (ادامه)

- بازگشت دستگاه به محدوده نرمال به طور خودبخود (بدون هیچ مداخله‌ای)
- آنالیزیک نمونه به طور متوالی حداقل ۱۰ بار
- تعیین خطای تصادفی
- قرار گرفتن در محدوده مجاز: ادامه کار

از توجه شما سپاسگزارم

