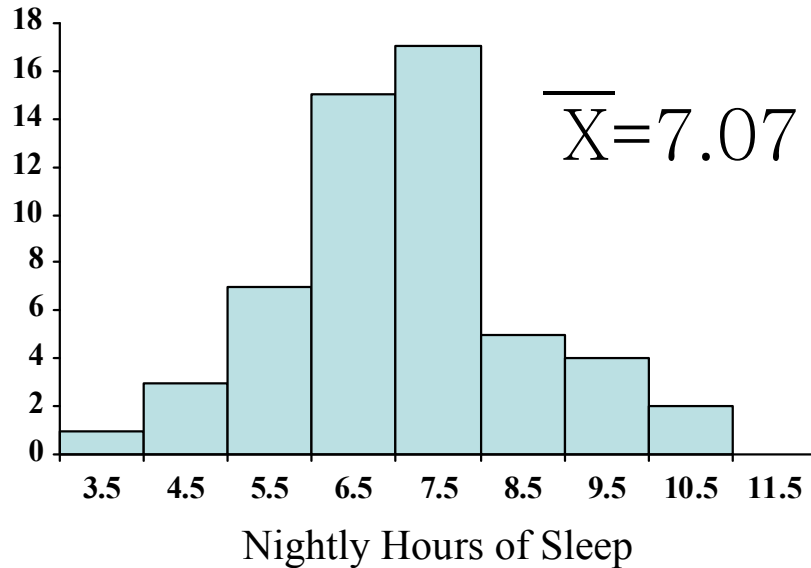


مروری بر مفاهیم آماری در آزمایشگاه

Arithmetic Mean

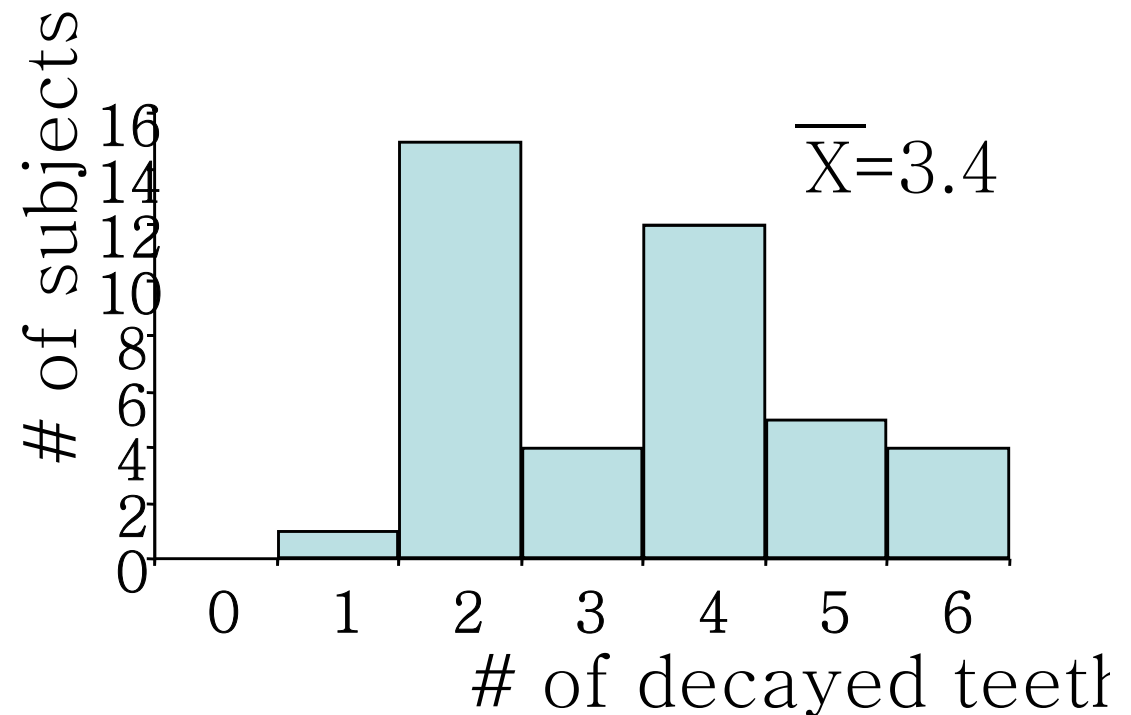
$$\bar{X} = \frac{\sum X}{n}$$

Arithmetic Mean



In order for the mean to be meaningful, the variable of interest must be measured on an interval scale.

In many cases the mean is the preferred measure of central tendency, both as a description of the data and as an estimate of the parameter.



وقتی به آزمایشو با روشهای مختلف انجام دادیم.

نتیجه کلی را چگونه گزارش کنیم؟

سه نفر فاصله دو نقطه را سنجیده اند و اعداد زیر بدست آمده

• حسن: ۱۰ متر

• حسین: ۱۵ متر

• محسن: ۲۰ متر

نتیجه قابل گزارش؟

$$\frac{15 + 10 + 20}{3} = 15$$


ابزار سنجش

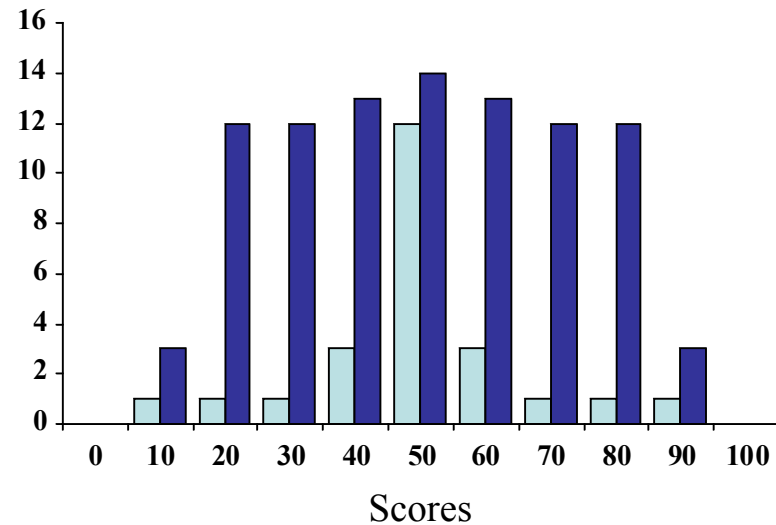
- حسن با متر
- حسین چشمی تخمین زده
- محسن با قدم سنجیده

به عبارت دیگر همیشه
میانگین
بهترین راه حل نیست

Range

- largest score minus the smallest score

- these two  have same range (80) but spreads look different



- says nothing about how scores vary around the center
- greatly affected by extreme scores (defined by them)

Deviation measures

- Might be better to see how much scores differ from the center of the distribution -- using distance
- Scores further from the mean have higher deviation scores

	Score	Deviation
Amy	10	-40
Theo	20	-30
Max	30	-20
Henry	40	-10
Leticia	50	0
Charlotte	60	10
Pedro	70	20
Tricia	80	30
Lulu	90	40
AVERAGE	50	

Deviation measures

- To see how 'deviant' the distribution is relative to another, we could sum these scores
- But this would leave us with a big fat zero

	Score	Deviation
Amy	10	-40
Theo	20	-30
Max	30	-20
Henry	40	-10
Leticia	50	0
Charlotte	60	10
Pedro	70	20
Tricia	80	30
Lulu	90	40
SUM		0

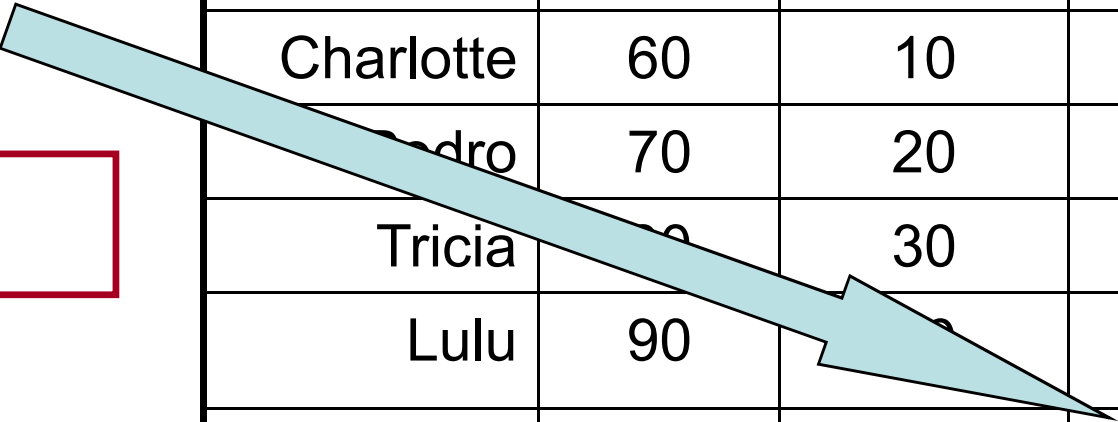
Deviation measures

So we use squared deviations from the mean

This is the sum of squares (SS)

$$SS = \sum (\bar{X} - X)^2$$

	Score	Deviation	Sq. Deviation
Amy	10	-40	1600
Theo	20	-30	900
Max	30	-20	400
Henry	40	-10	100
Leticia	50	0	0
Charlotte	60	10	100
Pedro	70	20	400
Tricia	80	30	900
Lulu	90	40	1600
SUM		0	6000



Variance

We take the
“average” squared
deviation from the
mean and call it
VARIANCE

$$s^2 = \frac{SS}{n-1}$$

Variance

1. Find the mean.
2. Subtract the mean from every score.
3. Square the deviations.
4. Sum the squared deviations.
5. Divide the SS by $N-1$.

	Score	Dev'n	Sq. Dev.	
Amy	10	-40	1600	
Theo	20	-30	900	
Max	30	-20	400	
Henry	40	-10	100	
Leticia	50	0	0	
Charlotte	60	10	100	
Pedro	70	20	400	
Tricia	80	30	900	
Lulu	90	40	1600	
SUM		0	6000	$6000/8=750$

Standard deviation

The standard deviation is the square root of the variance

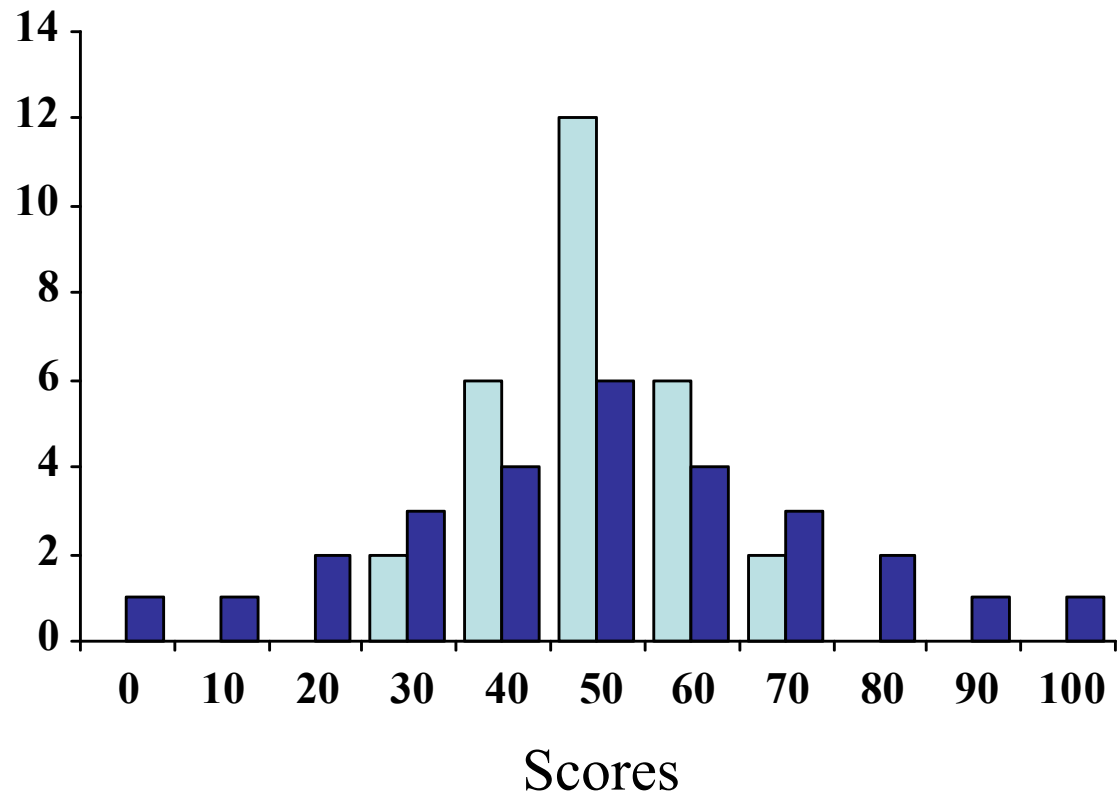
$$s = \sqrt{s^2} = \sqrt{\frac{SS}{n-1}}$$

The standard deviation measures spread in the original units of measurement, while the variance does so in units squared.

Example

$N = 28$
 $\bar{X} = 50$
 $s^2 =$
140.74
 $s = 11.86$

$N = 28$
 $\bar{X} = 50$
 $s^2 = 555.55$
 $s = 23.57$



Coefficient of Variation

- 1. Measure of *relative* dispersion
- 2. Always a %
- 3. Shows variation relative to mean
- 4. Used to compare 2 or more groups
- 5. Formula:

- Sample

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} (100)$$

Descriptive Statistics: Quick Review

	For a population:	For a sample:
Mean	$\mu = \frac{\sum X}{N}$	$\bar{X} = \frac{\sum X}{n}$
Variance	$\sigma^2 = \frac{SS}{N}$	$s^2 = \frac{SS}{n-1}$
Standard Deviation	$\sigma = \sqrt{\sigma^2}$	$s = \sqrt{s^2}$

Example: central tendency and spread of gravid var.

Statistics

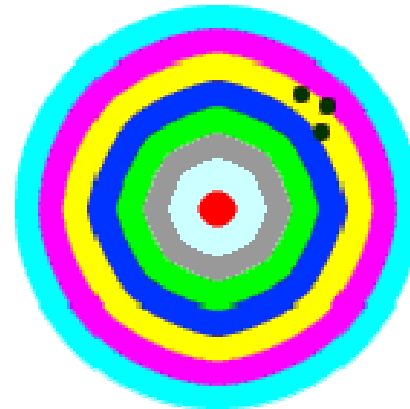
gravid		
N	Valid	460
	Missing	388
Mean		3.74
Median		3.00
Mode		3
Std. Deviation		2.435
Variance		5.928
Range		15
Minimum		0
Maximum		15
Percentiles	25	2.00
	50	3.00
	75	5.00

Accuracy
vs
precision

Accuracy/Precision

- Precision (American Heritage Dictionary):
 - The state or quality of being precise; exactness.
 - The ability of a measurement to be consistently reproduced.
 - The number of significant digits to which a value has been reliably measured.
- It gives an indication of the uniformity and/or reproducibility of a measurement

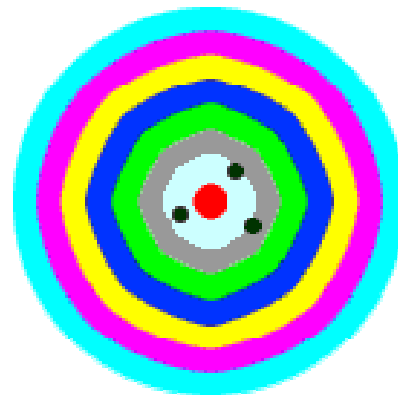
Precise, but not
very accurate



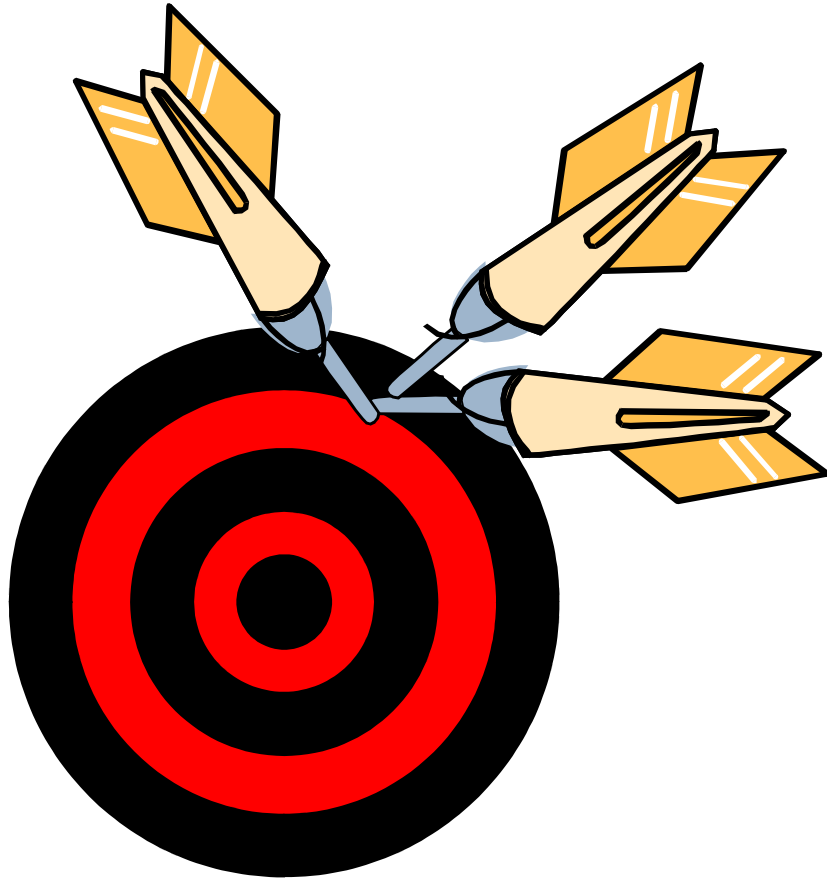
Accuracy/Precision

- Accuracy (American Heritage Dictionary):
 - Conformity to fact
 - Precision; exactness (Really?)
 - The ability of a measurement to match the actual value of the quantity being measured.
- Accuracy relates to the absolute quality of a measurement

Accurate, but not
very precise

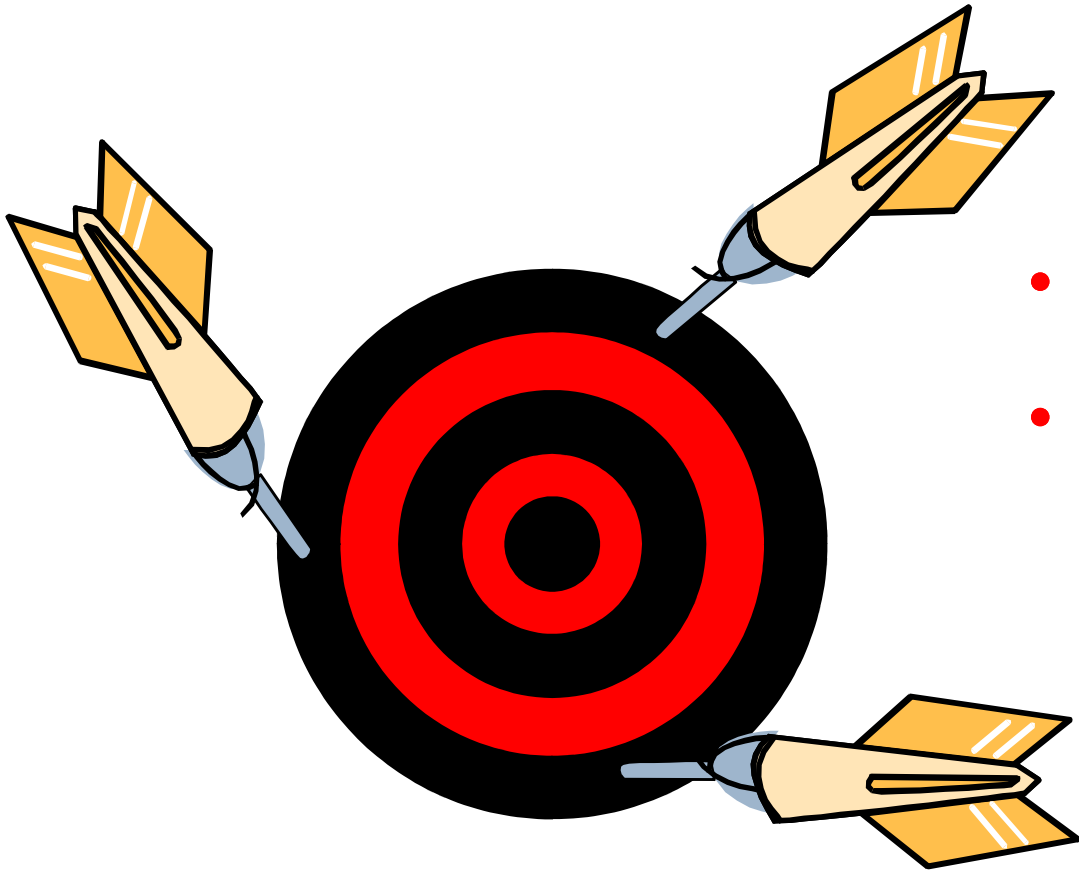


Accuracy vs precision



- Poor accuracy
- Good precision

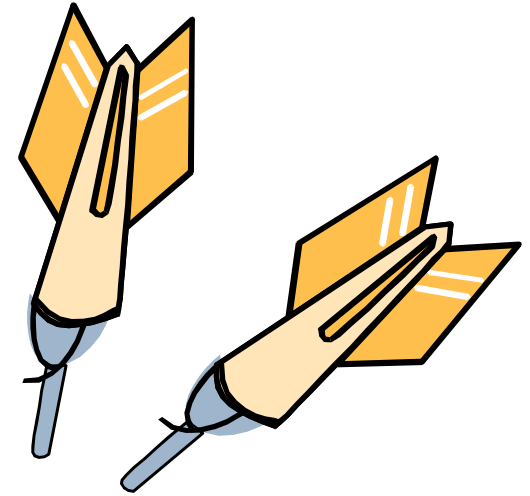
Accuracy vs precision



- Poor precision
- Good accuracy

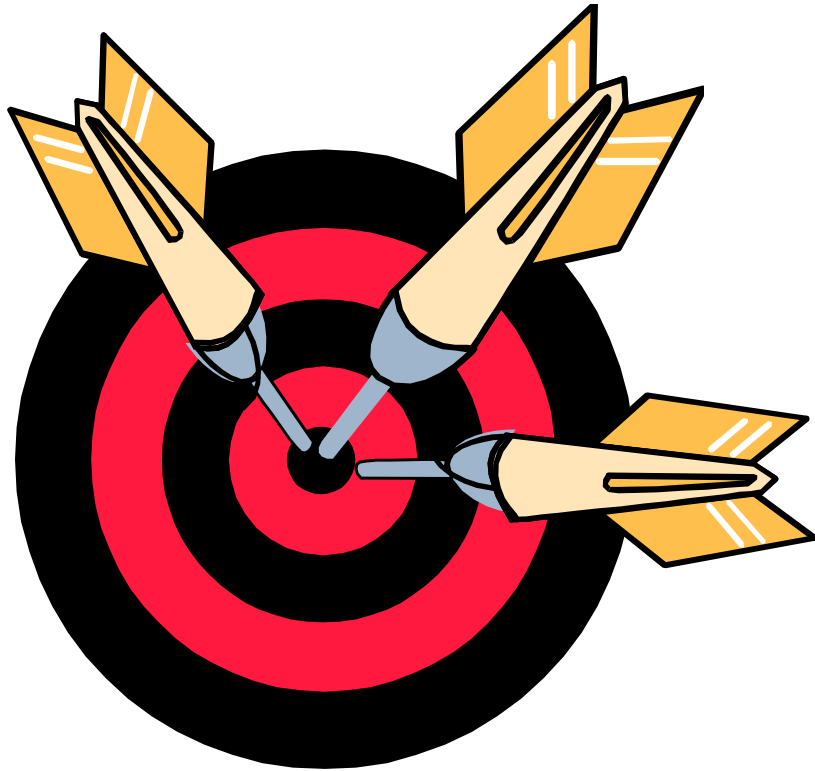
Accuracy vs precision

What would you call this?



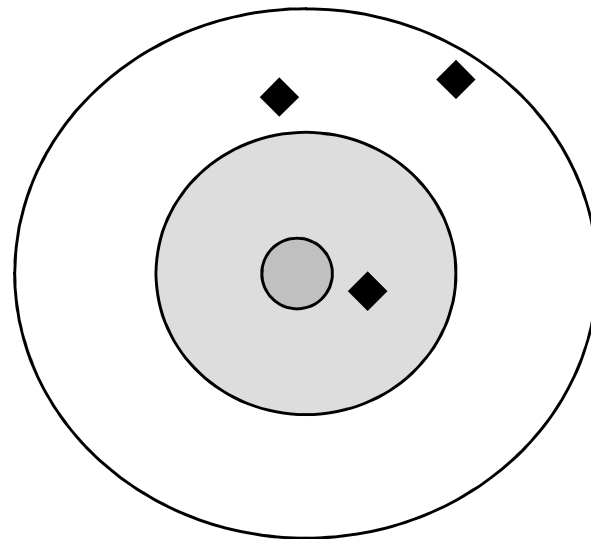
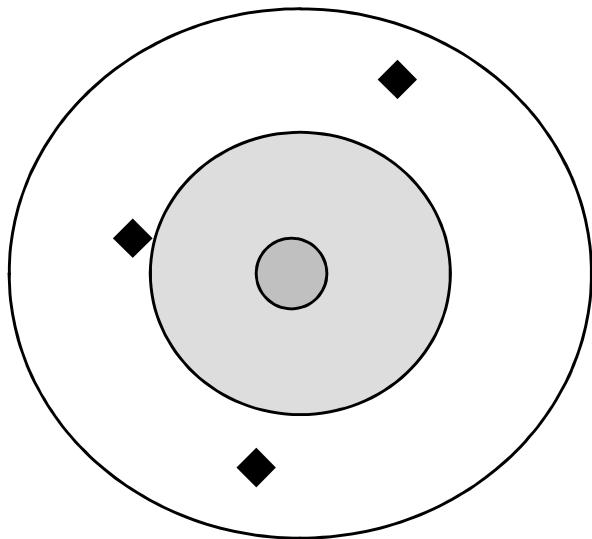
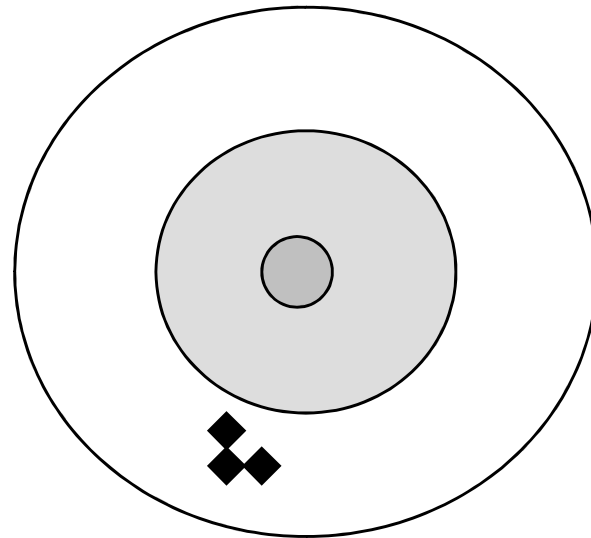
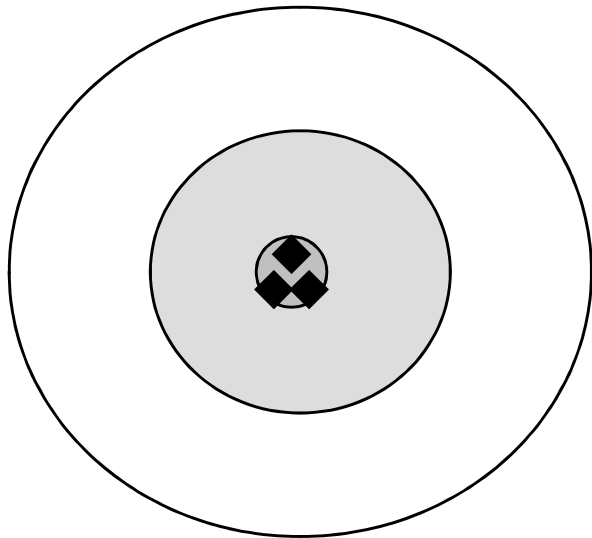
- **Totally hopeless!**
- **Poor precision**
- **Poor accuracy**

Accuracy vs precision



What you
would like
to see!

Are these accurate or precise?



Accurate/Valid

- Defined as:
 - The degree to which a variable actually represents what it is supposed to represent.
- Best way to assess
 - Compare with a reference
- Threatened by systematic error (bias)
 - Due to observer, subject and/or instrument

Reliable/Precise

- Defined as
 - The degree to which a variable has nearly the same value when measured several times
- Best way to assess
 - Repeated measures
- Threatened by random error
 - Due to observer, subject and/or instrument

Repeatability

- **Repeatability** expresses the **precision** under the same operating conditions over a short interval of time.
- **Repeatability is also termed intra-assay precision.**

Repeatability

- **Repeatability should be assessed using:**
a minimum of 9 determinations covering the specified range for the procedure (e.g. 3 concentrations/3 replicates each) or

Intermediate precision

- **Intermediate precision expresses within-laboratories variations:**
 - **different days**
 - **different analysts**
 - **different equipment**
 - **etc.**

Reproducibility

- **Reproducibility** is assessed by means of an **inter-laboratory** trial.
- **Reproducibility** should be considered in case of the standardization of an analytical procedure

Recommended Data

- standard deviation
- relative standard deviation (CV)
- confidence interval

should be reported for each type of precision.

SE, SP, PPV, NPV

- *sensitivity*
- *Specificity:*
- *Positive Predictive Value: (PPV)*
- *Negative Predictive Value: (NPV)*

Now to the Math

	Patient with the disease	Patient without the disease
Test is positive	A True Positive	B False Positive
Test is negative	C False Negative	D True Negative

- **Sensitivity = True positives / Total positives x 100**

Specificity = True negatives / Total negatives x 100

Positivity Predictive value = True positives / Tested positive x 100

Negativity Predictive value = True negatives / Tested negative x 100

Using the 2X2 table you can calculate

$$\text{Sensitivity} = a / (a+c)$$

$$\text{Specificity} = d / (b+d)$$

$$\text{PPV} = a/(a+b)$$

$$\text{NPV} = d/(c+d)$$

**Knowing the prevalence of the
disease in the population is
necessary for these calculations**

Example

	Ref. Lab: +	Ref. Lab: -	TOTAL
Test Lab: +	140	4	144
Test Lab: -	25	163	188
TOTAL	165	167	332

The Screening Test

- Ideally should be inexpensive, easy to administer (low risk) and with minimal discomfort
- There should be a Gold Standard based on the evidence
- Results should be accurate/valid and reliable/reproducible/precise

The **sensitivity and specificity** are properties of the **test**.

The **positive and negative predictive values** are properties of both the **test** and the **population** you test.

If you use a test in two populations with different disease prevalence, the predictive values will be different.

A **screening test** is most useful if directed to a **high-risk population** (high prevalence and high predictive value).

How to remember

Sensitivity: "I know my patient has the disease. What is the chance that the test will show that my patient has it?"

Specificity: "I know my patient doesn't have the disease. What is the chance that the test will show that my patient doesn't have it?"

Cont.

PPV: “I just got a positive test result back on my patient. What is the chance that my patient actually has the disease?”

NPV: “I just got a negative test result back on my patient. What is the chance that my patient actually doesn't have the disease?”

Effects of Prevalence

Sensitivity=95% Specificity=95%

Population's
Prevalence

Predictive Value of a
Positive Test

0.1%

1.9%

1.0%

16.1%

2.0%

27.9%

5.0%

50%

50%

95%

Effects of Prevalence

Sensitivity=99% Specificity=99%

Population's
Prevalence

Predictive Value of a
Positive Test

0.1%

9.0%

1.0%

50%

2.0%

66.9%

5.0%

83.9%

50%

99%

Replication experiment

***A minimum of 20 replicate determinations
On at least two levels of control materials
are recommended to estimate the
imprecision or random error of the
method.***

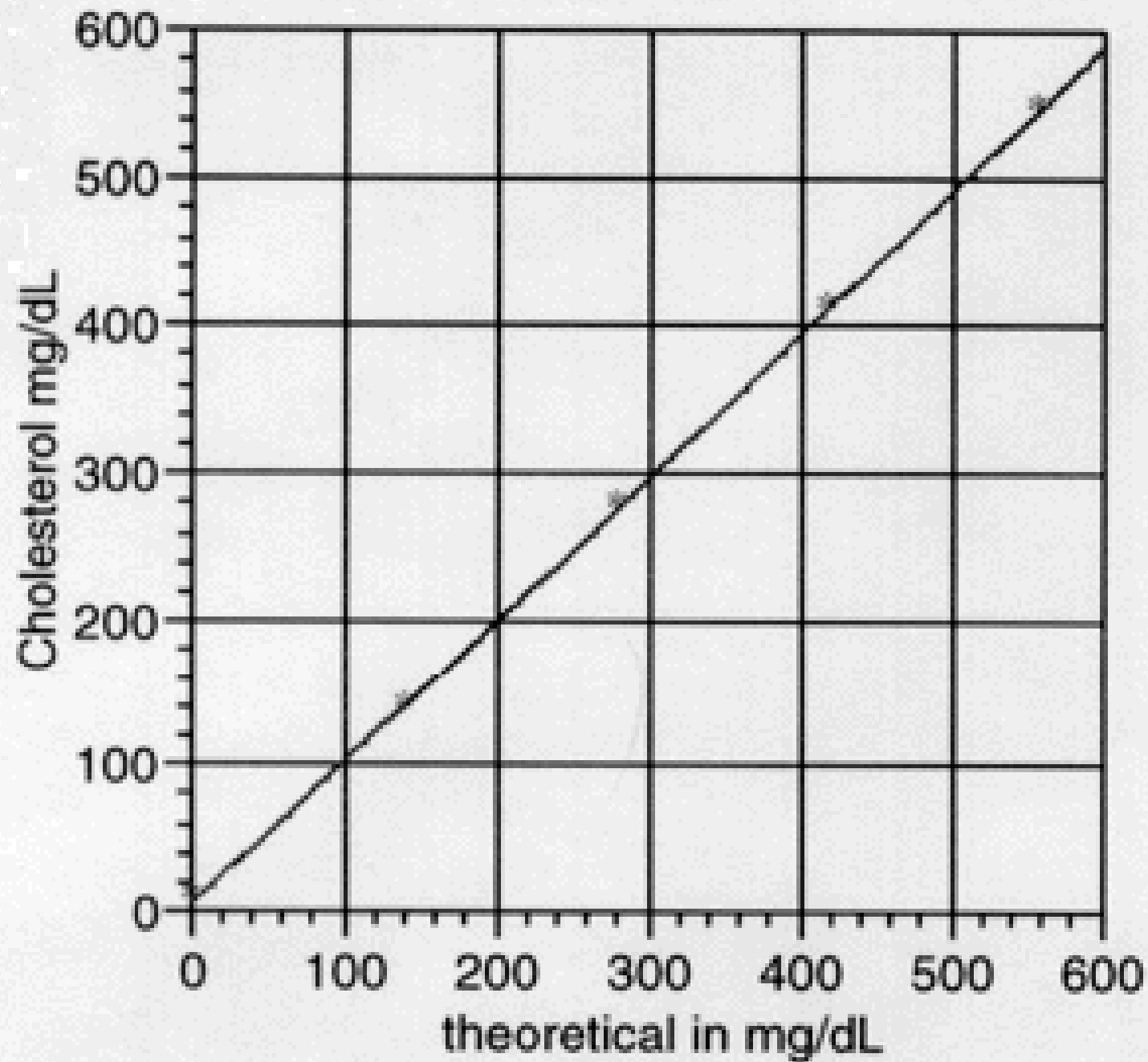
linearity type experiment

**A minimum of 5 specimens with
known**

**or assigned values should be
analyzed**

in to assess the reportable range.

Cholesterol

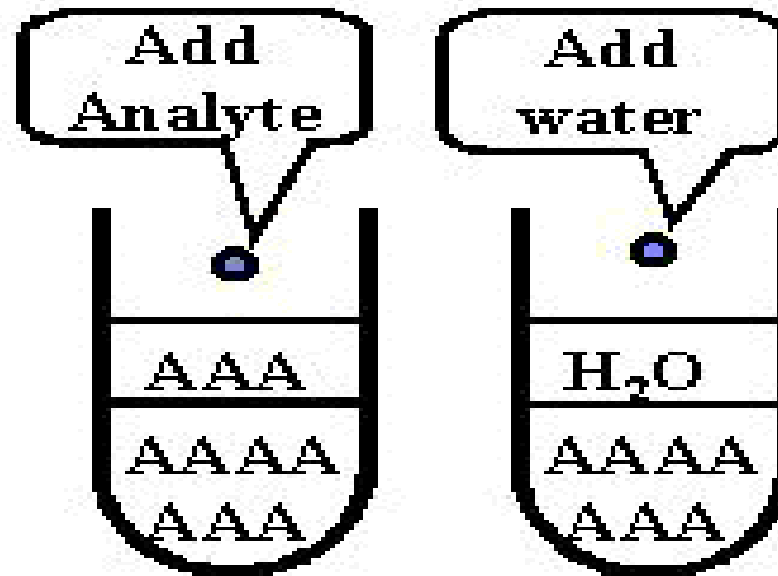


Slope = 0.97
y-intercpt = 1.0

Recovery Experiment

The Recovery Experiment

**Prepare pairs
of test samples**



**Calculate
A added**

**Measure A in
both samples**

10A

7A

**Calculate %
recovery**

$$\frac{10A - 7A}{3A} \times 100 = 100\%$$

Example : calcium method, if 0.1 ml of a 20 mg/dL standard is added to 1.0 ml of serum, the amount added is $20 \times (0.1/1.1)$ or 1.82 mg/dL.

Sample A addition = $(11.4 + 11.6)/2 = 11.5$ mg/dL;

Sample A dilution = $(9.7 + 9.9)/2 = 9.8$ mg/dL;

Sample B addition = $(11.2 + 11.0)/2 = 11.1$ mg/dL;

Sample B dilution = $(9.5 + 9.5)/2 = 9.5$ mg/dL;

Sample A addition = 11.5, Sample A dilution = 9.8, diff = 1.7 mg/dL

Sample B addition = 11.1, Sample B dilution = 9.5, diff = 1.6 mg/dL

$(1.7 \text{ mg/dL} / 1.82 \text{ mg/dL}) \times 100 = 93.4\%$ recovery

$(1.6 \text{ mg/dL} / 1.82 \text{ mg/dL}) \times 100 = 87.9\%$ recovery

Average the recoveries from all the specimens tested.

$(93.4 + 87.9)/2 = 90.6\%$ average recovery

$100 - 90.6 = 9.4\%$ proportional error

محدوده مرجع

محدوده مرجع

REFERENCE INTERVAL

- محدوده ای از کمیتها که به عنوان معیار برای تخمین (سلامت - بیماری) مقابل مقادیر بدست آمده از اندازه گیری در آزمایشگاه ، قرار میگیرد.

نام مراجعه کننده :		
شماره پذیرش :		
<u>Test</u>	<u>Result</u>	<u>Unit</u>
Glucose	100	mg/dl
REFERENCE INTERVAL		

طبیعی Normal

- مقادیر نرمال بطور معمول مقادیری هستند که توزیع آنها از توزیع گوسین تبعیت کند . (توزیع نرمال) و توزیع بیولوژیک همه کمیتها گوسین نمی باشد .

دامنه Range

برای توضیح مجموعه ای از داده ها استفاده شده و همه خواننده ها را بدون هیچ گونه دخل و تصرف در بر میگیرد .

تعریف سازمان جهانی بهداشت WHO از سلامت

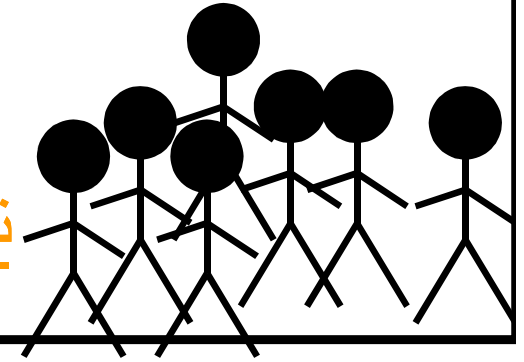
سلامت به وضعیت کاملاً مناسب فیزیکی، روانی و

اجتماعی اطلاق میشود و نه فقط به فقدان بیماری

<u>Test</u>	<u>Result</u>	<u>Unit</u>	<u>REFERENCE INTERVAL</u>
Glucose	100	mg/dL	

REFERENCE INTERVAL ?

تعیین آنچه سلامتی به شمار میرود نیاز به معیار دارد.



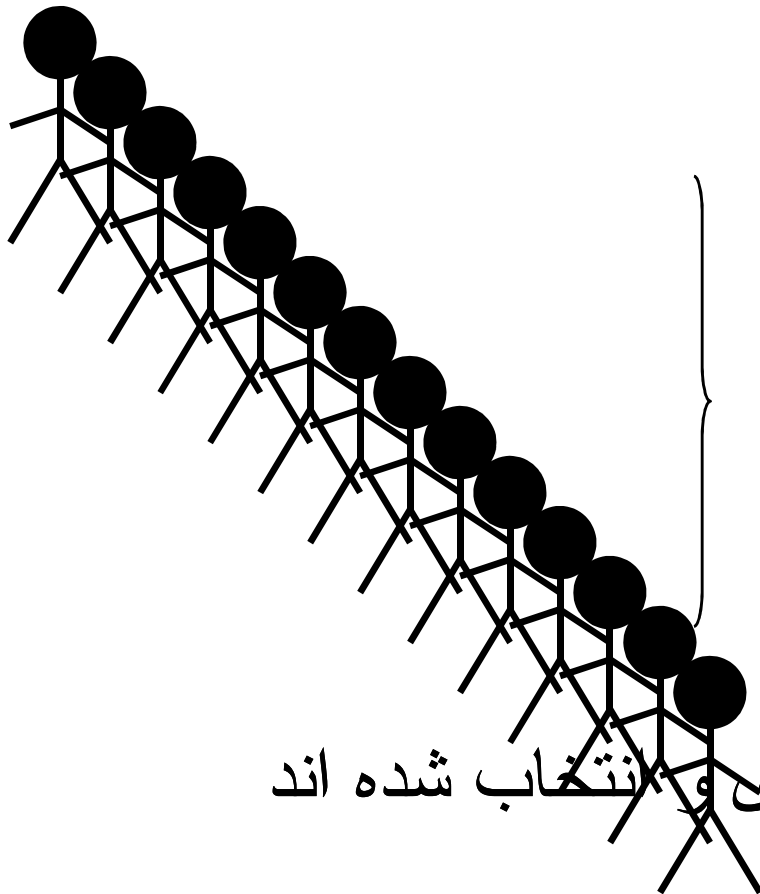
معیار های گروه بندی (گروه مورد مطالعه...)

- سن - جنس
- گروه خون
- تغییرات بیولوژیک
- رژیم غذایی
- موقعیت جغرافیایی
- ورزش
- فاکتورهای ژنتیک

معیار های جداسازی (افراد غیر...)

- مصرف الکل
- داروهای ضد بارداری خوراکی
- چاقی
- اهداء خون
- ناشتابودن یا نبودن
- شغل
- شیردهی
- فشار خون غیر طبیعی
- مصرف داروهای تجویزی
- مصرف نادرست ویتامینها
- بیماری

Reference Individual •



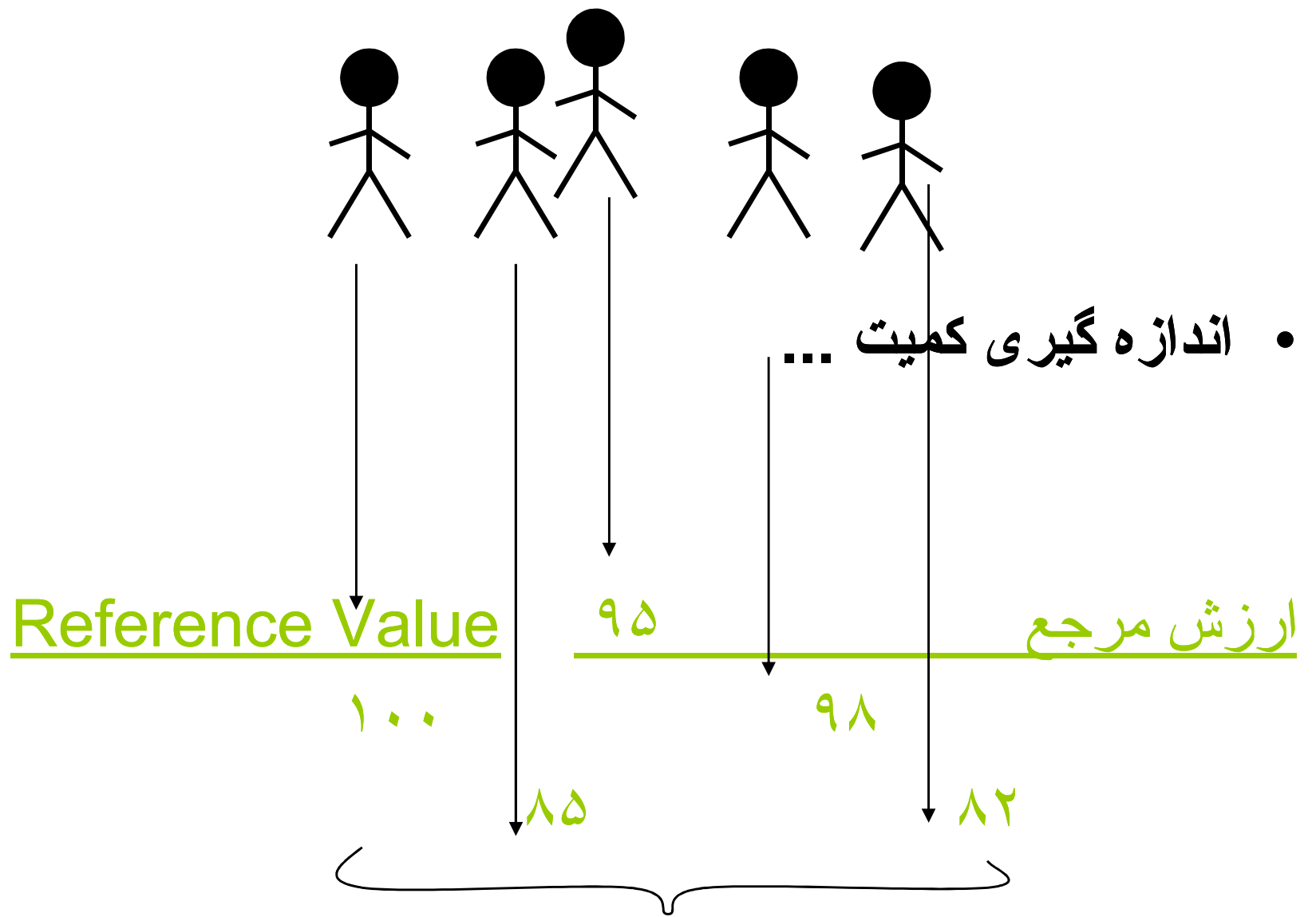
Reference sample group •

گروه مرجع :

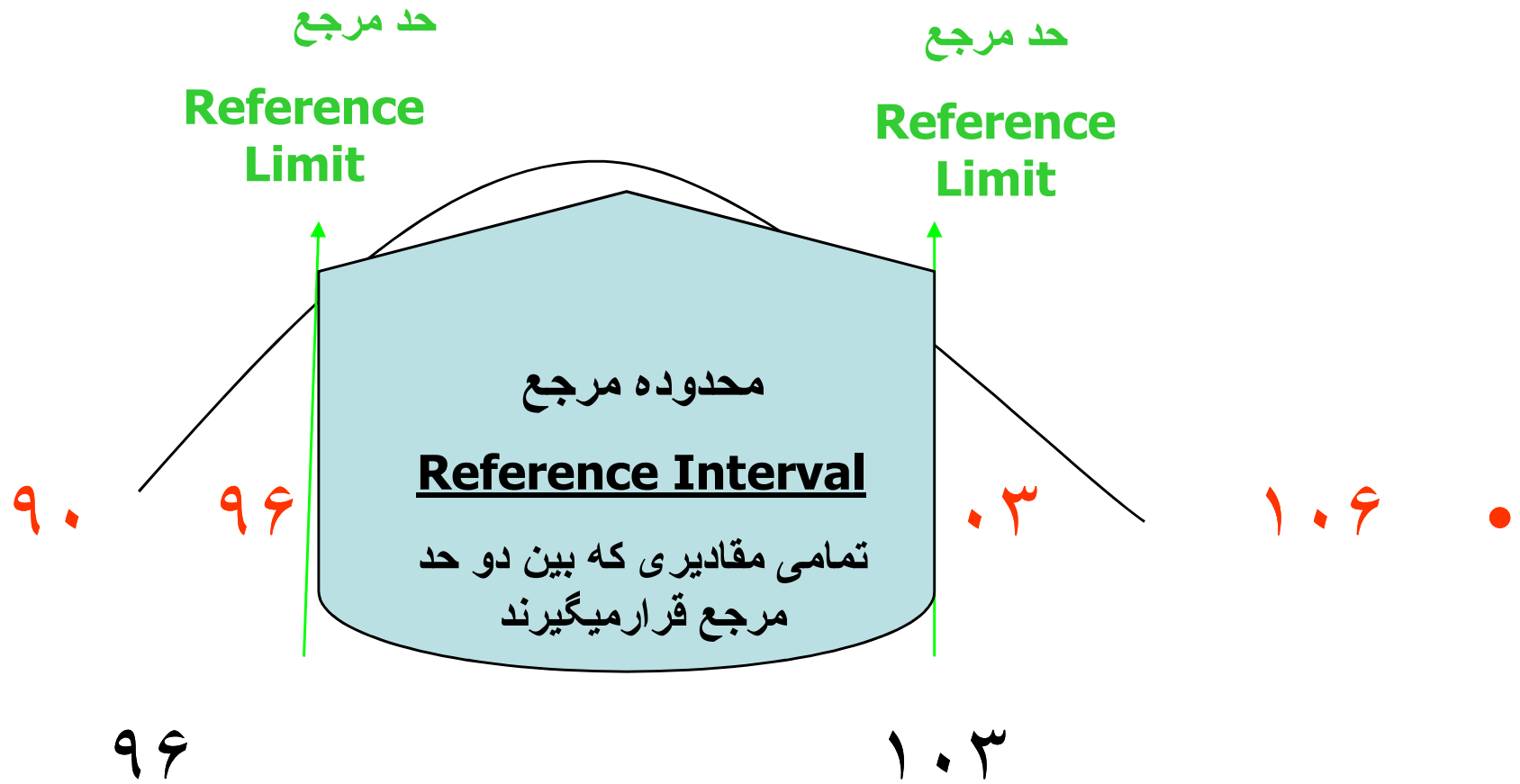
تعداد کافی از افراد منتخب ، که معرف جمعیت مرجع باشند

Reference population

همه جمعیتی که بر اساس معیارها جداسازی و انتخاب شده اند



ارزشهای مرجع Reference Values



• توزیع مرجع (Reference Distribution)

توزیع ارزش های بدست آمده از گروه مرجع

روش های دستیابی به محدوده مرجع مناسب در آزمایشگاه

**Full
Reference Interval
study**

**Transference
and
validation**

تعیین محدوده مرجع :

- ۱- تهیه لیست تغییرات بیولوژیک و تداخلات از منابع موجود
- ۲- تهیه مشخصه های انتخاب ، تقسیم بندی و پرسشنامه مناسب
- ۳- تهیه رضایت نامه کتبی از افراد مرجع و پر کردن پرسشنامه
- ۴- طبقه بندی افراد مرجع براساس پرسشنامه
- ۵- جداسازی افرادی که براساس مشخصه های تعریف شده فاقد خصوصیات فرد سالم هستند
- ۶- تصمیم گیری بر روی تعداد مناسب افراد مرجع (حداقل ۱۲۰ نفر)
باتوجه به محدوده اطمینان مورد نظر
- ۷- آماده سازی افراد برای نمونه گیری کنترل عوامل موثر (قبل، بعد، و در حین تجزیه)
- ۸- جمع آوری و حمل و نقل نمونه ها
- ۹- آنالیز و اندازه گیری و تعیین ارزشهای مرجع
- ۱۰- تهیه هیستوگرام و ارزیابی توزیع مرجع
- ۱۱- تعیین نتایج دور افتاده (قانون D/R)
- ۱۲- تجزیه و تحلیل ارزشهای مرجع، زیر گروهها، و تخمین محدوده مرجع

موارد مهم در استفاده و انتقال محدوده مرجع

- جمعیت مورد بررسی
- سیستم های اندازه گیری مورد استفاده

موارد مهم در استفاده و انتقال محدوده مرجع از پیش تعیین شده

- حالت اول - انتقال محدوده مرجع یک کمیت از یک آزمایشگاه به آزمایشگاه دیگر زمانیکه از سیستم اندازه گیری (روش و ابزار) یکسان استفاده میشود
- تطابق جمعیت مرجع و جمعیت منتخب فعلی به لحاظ شرایط جغرافیایی و دموگرافی و تطابق شرایط قبل از تجزیه مانند شرایط نمونه گیری و حمل و نقل باید مورد بررسی قرار گیرد.

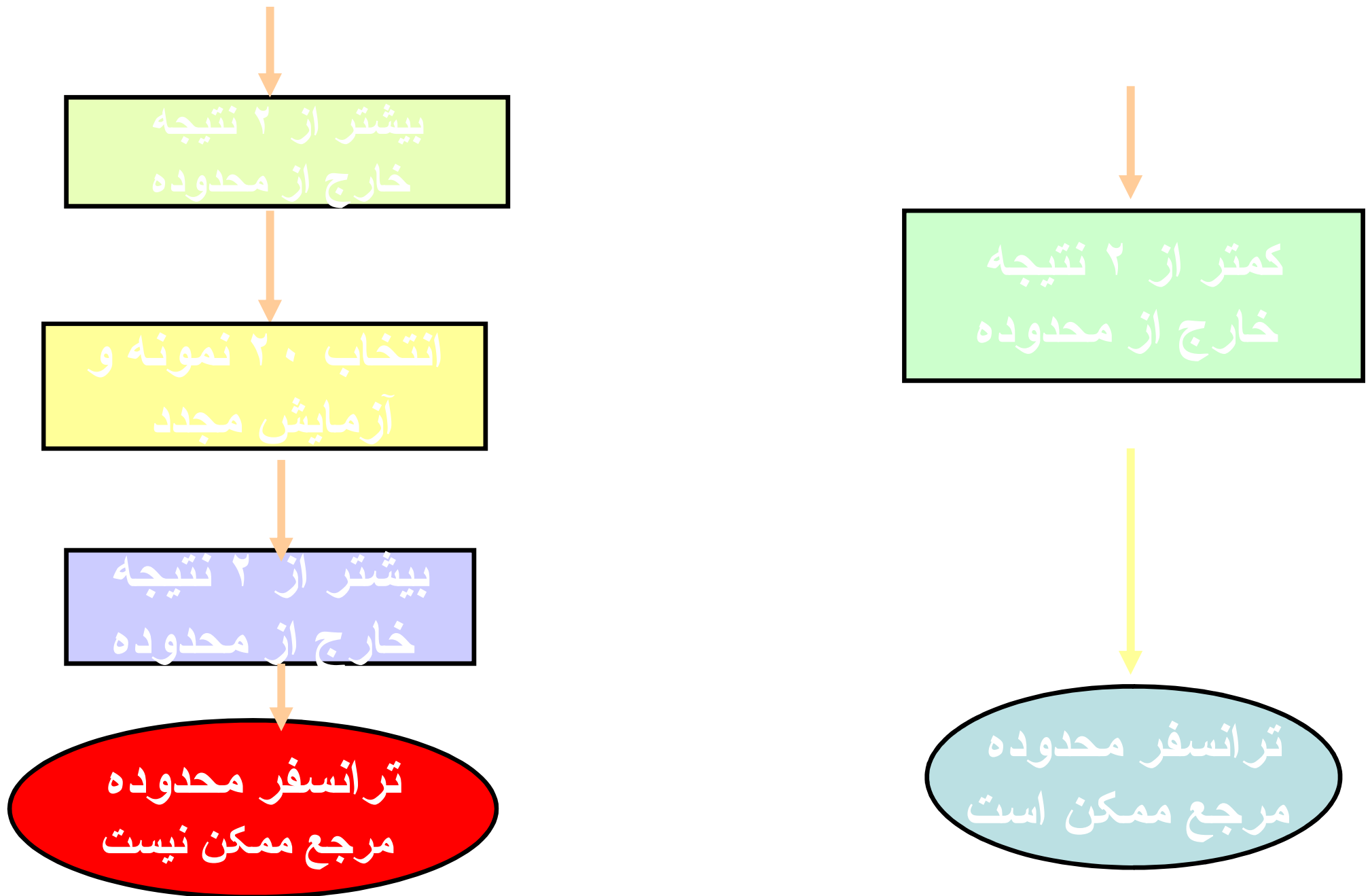
روشهای بررسی قابل قبول بودن انتقال محدوده مرجع

۱- استفاده از محدوده مرجع از پیش تعیین شده ، بدون هیچگونه ارزیابی عملی در آزمایشگاه

در صورتیکه

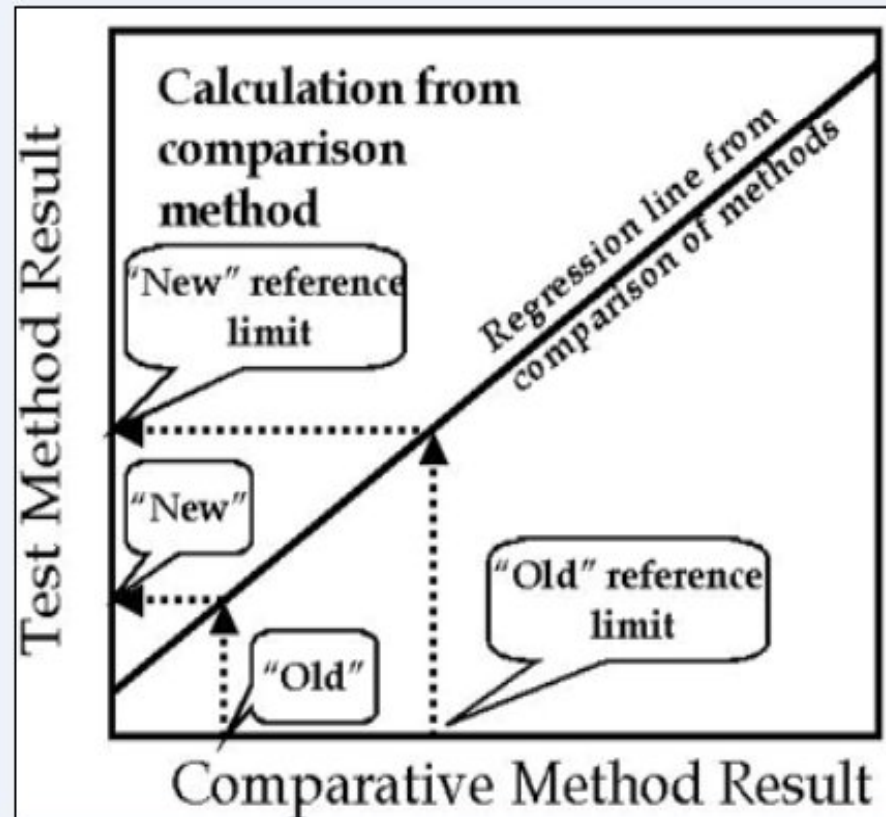
کلیه اطلاعات دموگرافیک و جغرافیایی نمونه ها در دسترس بوده و قابل مطالعه باشند . همچنین جزئیات دستورالعملهای قبل و حین تجزیه ، ویژگیهای عملکردی ، مجموعه کامل ارزشهای مرجع و روشهای محاسبه محدوده مرجع هر دو روش باید مطالعه و انطباق آنها مورد قضاوت مسئول آزمایشگاه قرار گیرد .

۲- مقایسه نتایج حاصله از ۲۰ نمونه انسانی دارای شرایط جغرافیائی و دموگرافی مشابه با جمعیت مرجع مورد مقایسه



Validation with 60 sample

- انتخاب ۶۰ نفر که نمایانگر جمعیت مرجع باشند.
- انجام آزمایش و حذف موارد پرت
- بررسی تطابق با محدوده مورد ادعای تولیدکننده و یا آزمایشگاه دیگر مطابق با دستورالعمل شناسایی زیر گروه ها
- در صورتیکه تفاوت معنی داری بین نتایج دو روش مشاهده شد میباید تعداد نمونه را افزایش داده مطالعه کامل محدوده مرجع انجام شود.



$$Y = a + bX$$

$$x=150 \quad U/l \quad a=1 \quad b=2$$

$$Y=1+2*150=301 \quad U/l$$

حالت دوم انتقال محدوده مرجع

زمانیکه جمعیت مورد بررسی با جمعیت مرجع اولیه انطباق داشته ولی از سیستم های اندازه گیری (روش و ابزار) مختلف استفاده میشود باید از روش مقایسه متد استفاده شود .

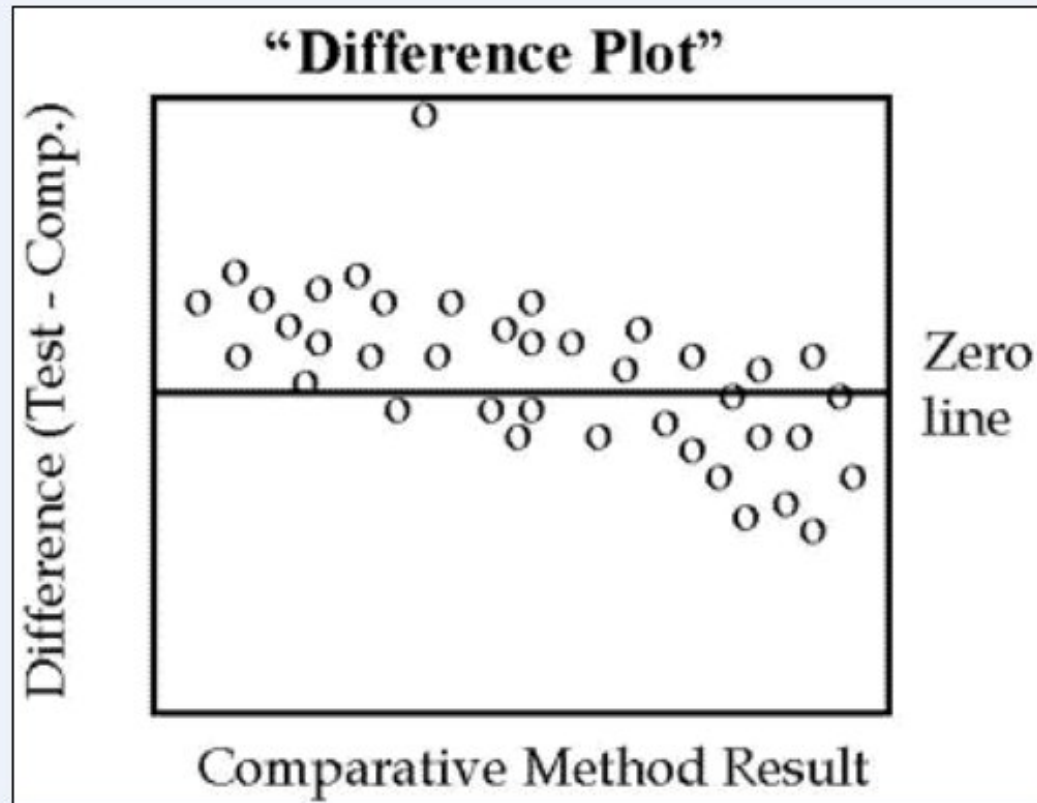
بررسی صحت نتایج در آزمایشگاه

- ۱- استفاده از کنترل صحت (دارای ارزش مرجع)
- ۲- مقایسه باروش مرجع (یاروشی با کیفیت مناسب و مشخص)
- ۳- شرکت در برنامه ارزیابی خارجی کیفیت

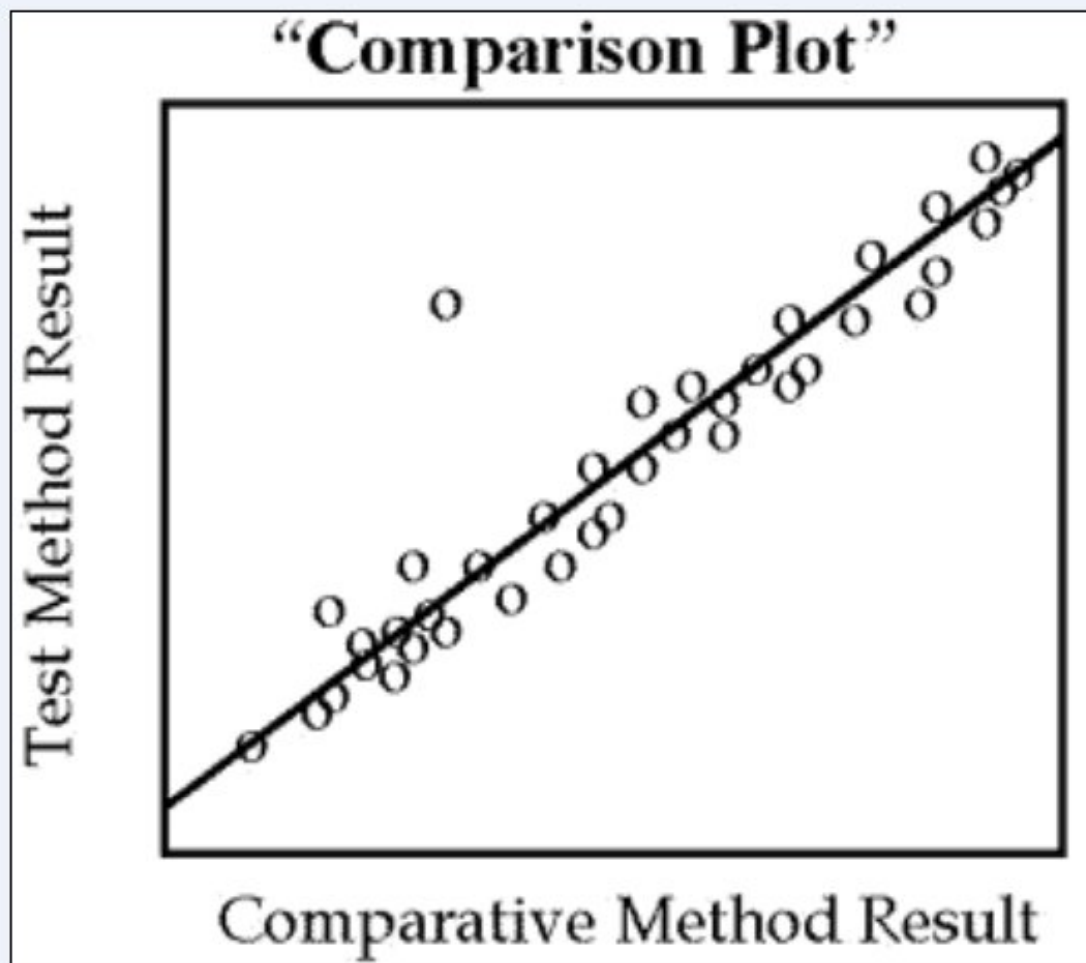
■ حالت دوم انتقال محدوده مرجع

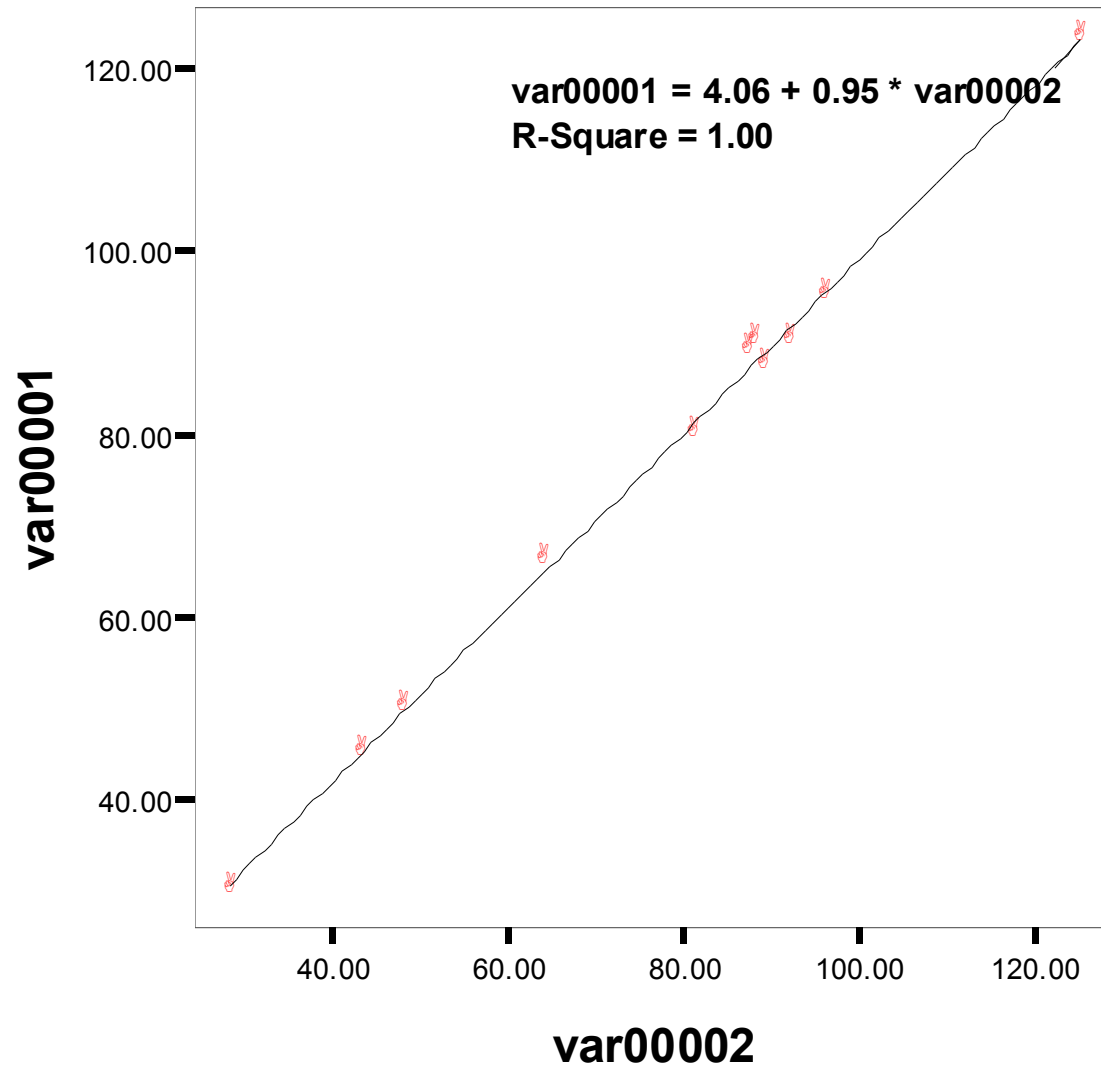
زمانیکه جمعیت مورد بررسی با جمعیت مرجع اولیه انطباق داشته ولی از سیستم های اندازه گیری (روش و ابزار) مختلف استفاده میشود .

- ۱- ۴۰ نمونه سرم بیمار در گستره اندازه گیری روشها انتخاب شود
- ۲- به مدت ۵ روز ، روزانه ۸ نمونه در حداکثر فاصله زمانی دو ساعت با هر دوروش مورد اندازه گیری قرار گیرد .
- ۳- هرروز نتایج را بلافاصله بر روی نمودار برده و ارتباط نتایج بطور چشمی بررسی میشود هرگونه خواننده دور از انتظار میباشد تکرار گردد.
- ۴- اگر نتایج تفاوت حاصل شده باشد کلیه مراحل ۵ روز دیگر تکرار میگردد.
- ۵- **correlation / coefficient** انجام شده و اگر $r > 0.99$ بود رگرسیون خطی ساده انجام شده و خطای سیستماتیک در محدوده تصمیم گیری تخمین زده میشود.
- ۶- اگر $r < 0.99$ باشد خطای میانگین خواننده هارا از طریق **t-test** محاسبه کرده و سپس خطای کلی در محدوده تصمیم گیری تخمین زده میشود.



difference between the test minus comparative results on the y-axis





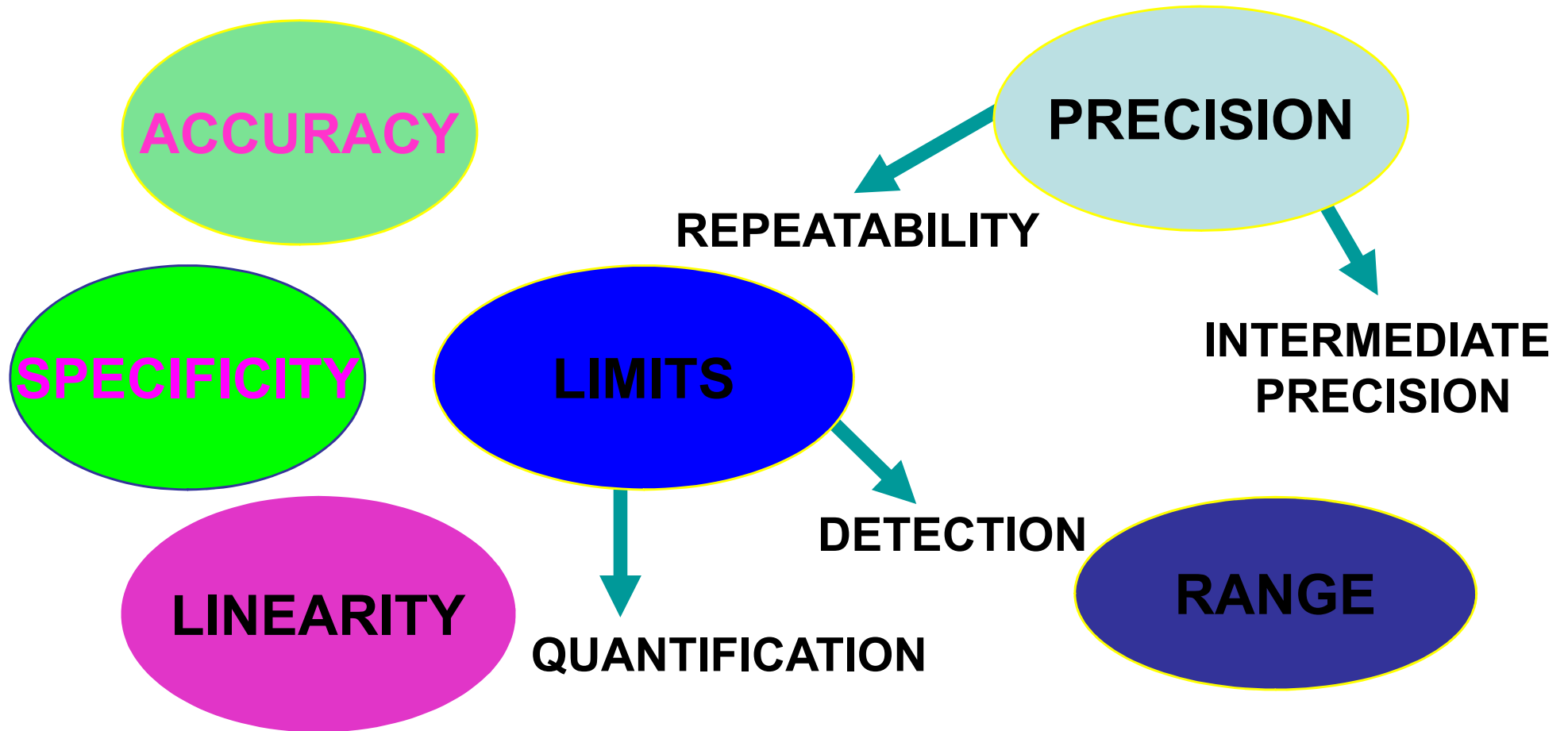
Dot/Lines show Means

Linear Regression

Validation

- The objective of **validation** of an analytical procedure is to demonstrate that it is suitable for its intended purpose.

Criteria For Analytical Test Validation



Table

Type of analytical procedure	IDENTIFICATION	TESTING FOR IMPURITIES		ASSAY - dissolution (measurement only) - content/potency
characteristics		quantitat.	limit	
Accuracy	-	+	-	+
Precision				
Repeatability	-	+	-	+
Interm.Precision	-	+	(1)	+
Specificity (2)	+	+	+	+
Detection Limit	-	-	(3)	+
Quantitation Limit	-	+	-	-
Linearity	-	+	-	+
Range	-	+	-	+

Detection limit
vs
Quantitation limit

'Know that it's there'

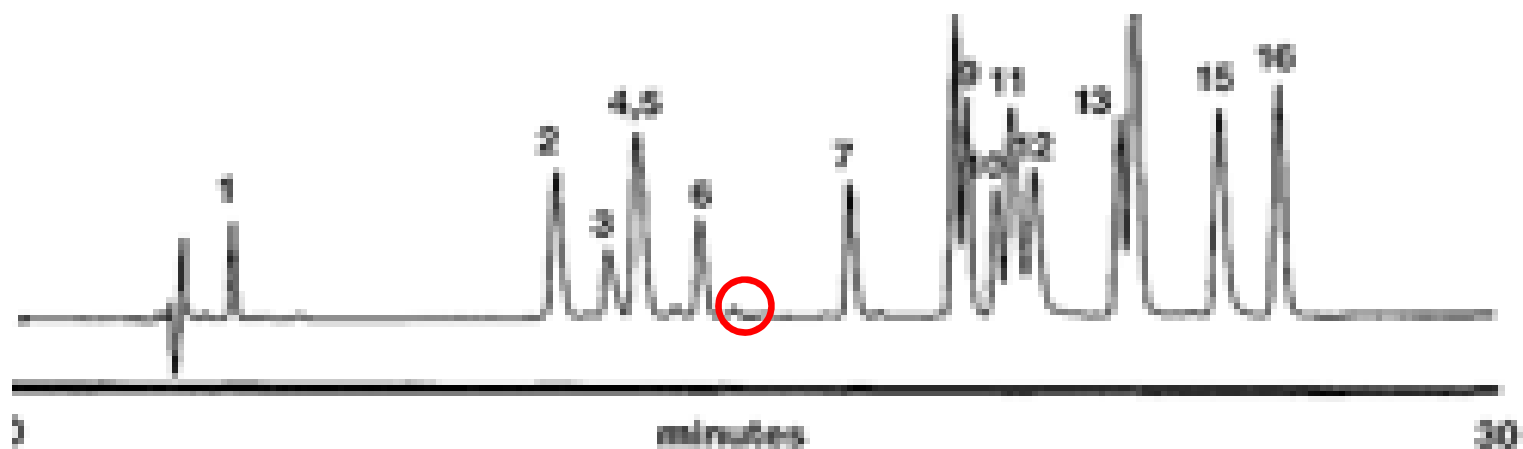
vs

'Know how much is there'

Detection limit

(means)

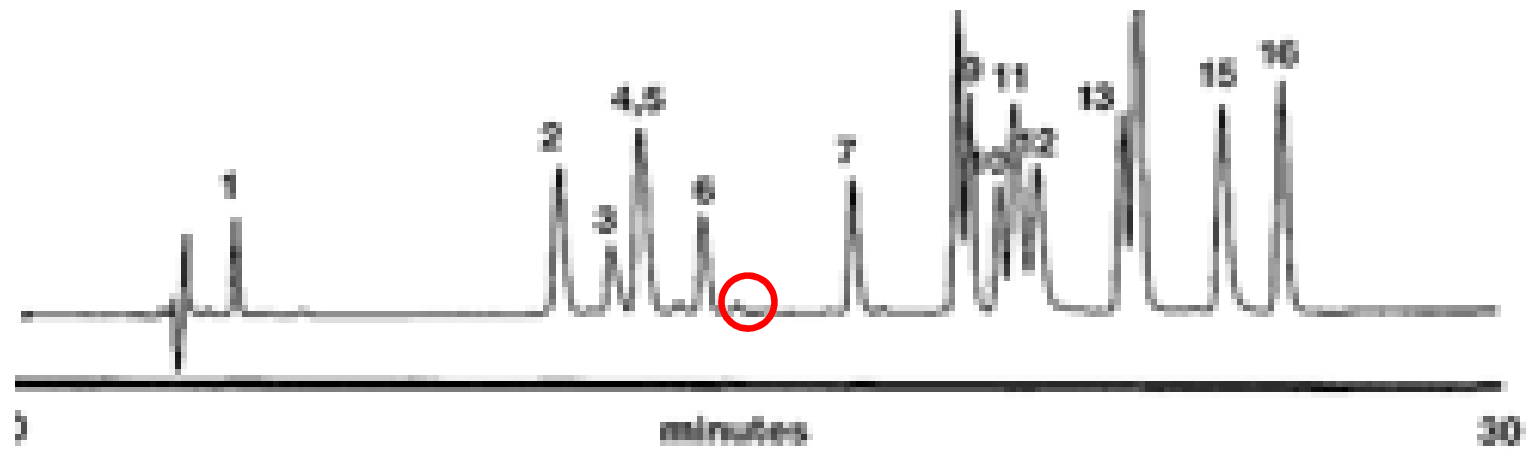
Is any of it present?



Is it there?

Quantitation limit

How much of it is present???



How much of it is there?

DETECTION LIMIT

- **The detection limit of an individual analytical procedure is the lowest amount of analyte in a sample which can be detected but not necessarily quantitated as an exact value**