تشخیص سندرم های تالاسمی
و
کنترل کیفی درخون شناسی

نویسنده: دکتر حبیب اله گل افشان
عضو هیئت علمی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز

بخش چهاردهم

روش‌های کالیبراسیون سیستم‌های شمارشگر و کنترل کیفی

برای این که دستگاههای خودکار گزارش صحیح از CBC ارائه دهند، احتیاج به کالیبراسیون دقیق دارند. قبل از اقدام به کالیبراسیون باید اطمینان حاصل کرد که تمام قسمت‌های دستگاه به طور صحیحی کار می‌کنند و نقصی در دستگاه وجود ندارد. نخست باید دقت دستگاه را بررسی کرد زیرا تا زمانی که یک آنالیزور قابلیت تکرار پذیری نتایج یک CBC را نداشته باشد نمی‌تواند دقیقاً کالیبره شود. بنابراین در مرحله نخست باید قابلیت تکرار پذیری نتایج آنالیزور را ارزیابی نمود و برای این کار یک نمونه خون را چندین بار پشت سر هم به دستگاه داده و ضریب تغییرات آن در مورد هر پارامتر ارزیابی می‌شود.

راههای گوناگونی جهت کالیبراسیون دستگاه وجود دارد که هر کدام دارای مسائل مربوط به خود است.

تعدادی از کالیبره کننده‌های تجاری وجود دارد ولی چون اکثراً دارای فیکساتیو هستند، انعطاف‌پذیری سلول‌ها را تغییر داده و از این رو نمی‌توانند مانند یک گلبول تازه برای کالیبره کردن پارامترهایی مانند MCV عمل کنند. روش‌های دستی کالیبراسیون هنوز جزء

روش‌های مرجع برای کالیبراسیون دستگاه است.

برای کالیبراسیون دستگاه باید نمونه خونی را که دارای مقادیر CBC شناخته و دقیق است به دستگاه داد و روی آن مقادیر، دستگاه را کالیبره کرد. می‌توان در آزمایشگاه از خون حاوی Citrate Phosphate dextrose یا CPD استفاده کرد و بعد از یک فیکس ملایم با فرمالین یا گلوتار آلدئید آنرا برای مدت چند ماه پایدار کرد. چنانچه مقادیر CBC این خون پایدار شده را با یک دستگاه که از قبل کالیبره شده به دست آورند، می‌توان از خون پایدار شده جهت کنترل روزانه برای حصول اطمینان از کالیبراسیون دستگاه استفاده کرد.

یکی از روش‌های کالیبراسیون انتخاب ۱۰ و ترجیحاً ۲۰ خون تازه است، هر کدام از نمونه‌ها را سه بار به دستگاه داده و سه بار هم به روش دستی تعیین مقدار می‌کنیم. تعیین مقدار به روش دستی باید با استفاده از روش‌های مرجع باشد. با روش دستی و دستگاهی CBC را انجام داده و برای پارامترهای هر نمونه خون مطابق رابطه زیر یک فاکتور تصحیح بدست می‌آید.

$$CF\ (\text{فاکتور تصحیح}) = \frac{\text{میانگین حاصل از روش دستگاهی - میانگین حاصل از روش دستی}}{\text{میانگین حاصل از روش دستگاهی}} \times ۱۰۰$$

یک فاکتور تصحیح مثبت نشان می‌دهد که نتایج به دست آمده از دستگاه اتوماتیک پائین‌تر از روش دستی است و فاکتور تصحیح منفی بیانگر آن است که نتیجه دستگاه اتوماتیک بالاتر از روش دستی است.

از ۱۰ یا ۲۰ نمونه خون، ۱۰ تا ۲۰ فاکتور تصحیح برای هر پارامتر مانند Hct, Hb, RBC, WBC, MCHC, MCV و... به دست می‌آید. میانگین فاکتورهای تصحیح برای هر پارامتر را حساب کرده و از آن برای اصلاح دستگاه استفاده می‌کنیم.

مثال: برای کالیبراسیون پارامتر هموگلوبین، ۵ نمونه خون را هر کدام سه بار با روش دستی مرجع و روش دستگاهی به شرح زیر تعیین مقدار کرده‌ایم:

	Hb روش دستی بار اول	Hb روش دستی بار دوم	Hb روش دستی بار سوم	Hb روش دستگاهی بار اول	Hb روش دستگاهی بار دوم	Hb روش دستگاهی بار سوم	میانگین روش دستی	میانگین روش دستگاهی
نمونه اول	۱۶	۱۵.۵	۱۵	۱۵	۱۴	۱۴/۵	۱۵/۵	۱۴/۵
نمونه‌دوم	۱۷	۱۶	۱۵/۸	۱۶	۱۵/۵	۱۶/۵	۱۶/۲	۱۶
نمونه‌سوم	۱۲	۱۱	۱۰/۵	۱۱	۱۲	۱۱/۵	۱۱/۲	۱۱/۵
نمونه‌چهارم	۱۴	۱۵	۱۴/۶	۱۴	۱۴	۱۴/۵	۱۴/۵	۱۴/۲
نمونه‌پنجم	۱۱	۹	۱۰	۱۰	۹	۹/۲	۱۰	۹/۴

فاکتور تصحیح را برای هر نمونه طبق فرمول زیر محاسبه می‌کنیم:

$$CF = \frac{\text{میانگین حاصل از روش دستگاهی} - \text{میانگین حاصل از روش دستی}}{\text{میانگین حاصل از روش دستگاهی}} \times ۱۰۰$$

$$CF_1 = \frac{۱۵/۵ - ۱۴/۵}{۱۴/۵} \times ۱۰۰ = ۶/۹٪$$

$$CF_2 = \frac{۱۶/۲ - ۱۶}{۱۶} \times ۱۰۰ = ۱/۲٪$$

$$CF_3 = \frac{۱۱/۲ - ۱۱/۵}{۱۱/۵} \times ۱۰۰ = -۲/۶٪$$

$$CF_4 = \frac{۱۴/۵ - ۱۴/۲}{۱۴/۲} \times ۱۰۰ = +۲/۱٪$$

$$CF_5 = \frac{۱۰ - ۹/۴}{۹/۴} \times ۱۰۰ = +۶/۴٪$$

$$\text{میانگین فاکتور تصحیح} = \frac{+۶/۹ + ۱/۲ - ۲/۶ + ۲/۱ + ۶/۴}{۵} = \frac{۱۴}{۵} = +۲/۸٪$$

میانگین فاکتور تصحیح برای هموگلوبین در مثال فوق ۲/۸ درصد است و چون علامت آن مثبت است به مفهوم آن است که دستگاه ۲/۸ درصد کمتر از روش مرجع دستی هموگلوبین را گزارش می‌کند. بنابراین باید ۲/۸ درصد Hb آن را بالا برد. برای این کار یک نمونه خون اختیاری به دستگاه داده می‌شود و هموگلوبینی که دستگاه گزارش می‌کند آن را ۲/۸ درصد بالا می‌بریم. مثلاً اگر Hb این نمونه خون را دستگاه ۱۶ گرم درصد گزارش کند، آن را به ۱۶/۴ تغییر داده و دستگاه را روی این مقدار تنظیم می‌کنیم یا ضریب هموگلوبین

دستگاه را ۲/۸ درصد بالا می‌بریم.

۱۶ × ۲/۸٪ = ۰/۴

۱۶ + ۰/۴ = ۱۶/۴

اگر میانگین فاکتور تصحیح ۲/۸- درصد بود میزان هموگلوبین دستگاه را ۲/۸ درصد کاهش می‌دادیم و آن را روی ۱۵/۶ گرم درصد تنظیم می‌کردیم در مثال فوق:

۱۶ × ۲/۸٪ = ۰/۴

۱۶ - ۰/۴ = ۱۵/۶

مثال دوم:

اگر میانگین فاکتور تصحیح WBC عدد ٪۵+ باشد بایستی WBC دستگاه را ۵ درصد بالا برد. برای این کار یک نمونه خون اختیاری به دستگاه داده می‌شود اگر WBC این خون برای مثال ۸۰۰۰ در میلی‌متر مکعب باشد در سطح عدد ۸۴۰۰ دستگاه را تنظیم می‌کنیم و از این پس دستگاه برای WBC کالیبره است

۸۰۰۰ × ۵٪ = ۴۰۰

۸۰۰۰ + ۴۰۰ = ۸۴۰۰ تعداد WBC در میلی متر مکعب

مثال سوم:

اگر میانگین فاکتور تصحیح برای MCV برابر ٪۳- باشد باید MCV دستگاه را ۳ درصد کاهش داد. در این حالت یک خون به طور شانسی به دستگاه داده می‌شود و چنانچه برای مثال MCV این خون ۷۰ فمتولیتر گزارش شود میزان MCV را در دستگاه روی عدد ۶۸ تنظیم می‌کنیم و از این پس دستگاه برای MCV کالیبره است.

۷۰ × ۳٪ = ۲/۱

۷۰ - ۲/۱ = ۶۸

انتخاب روش‌های مرجع برای تعیین مقدار CBC به روش دستی

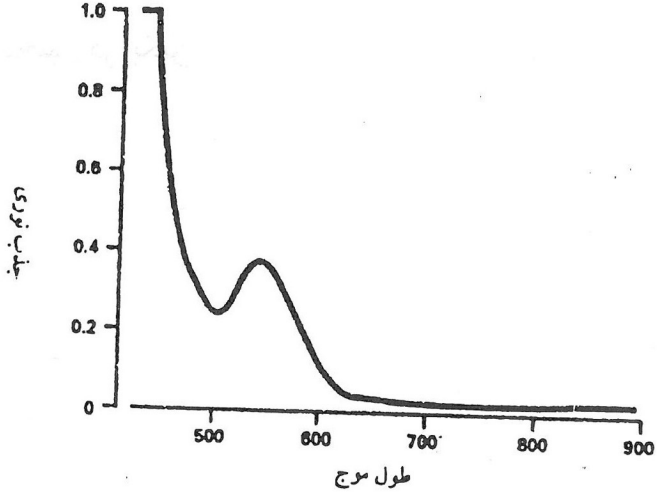
همان طور که مطرح گردید دستگاه شمارشگر سلولی باید توسط حداقل ۱۰ نمونه خون

که با روش دستی و دستگاهی تعیین مقدار می‌گردد کالیبره گردد. در واقع مقادیر بدست آمده از روش‌های دستی به عنوان پایه برای کالیبراسیون قرار می‌گیرد. برای بدست آوردن مقادیر CBC به روش دستی باید روش‌های معتبر و مرجع را انتخاب کرد.

روش مرجع اندازه‌گیری هموگلوبین

کمیته بین‌المللی استاندارد کردن در هماتولوژی (ICSH) اندازه‌گیری هموگلوبین به روش سیان مت هموگلوبین (سیانور هموگلوبین) را روش مرجع قرار داده است. این روش اندازه‌گیری دارای سه مزیت به شرح زیر است:

۱ ـ تمام انواع هموگلوبین‌ها از قبیل مت هموگلوبین، کربوکسی هموگلوبین، اکسی هموگلوبین به جز سولف هموگلوبین (SHb) که به مقدار ناچیزی در خون وجود دارد همگی به سیانو مت هموگلوبین تبدیل می‌شوند، البته سرعت تبدیل کربوکسی هموگلوبین به سیانومت هموگلوبین در مقایسه با بقیه کمتر است.



طیف جذب نوری سیانومت هموگلوبین با توجه به گراف در طول موج ۵۴۰ نانومتر به صورت نسبتاً پهن است.

۲ - استانداردهای پایدار سیان‌مت هموگلوبین برای کالیبراسیون به صورت تجارتی موجود است.

۳ ـ ماکزیمم جذب نوری سیان مت هموگلوبین در طول موج ۵۴۰ نانومتر به صورت یک باند نسبتاً پهن و صاف است از این رو اندازه‌گیری Hb با اسپکتروفتومتر یا کالریمتر قابل اعتماد است.

مواد لازم برای ساختن محلول در ابکین

۱ ـ فری سیانور پتاسیم (Potassium Ferricyanide) $K_3 Fe (CN)_6$ با وزن مولکولی ۳۲۹/۲۴گرم

۲ ـ سیانور پتاسیم (KCN) با وزن مولکولی ۶۵/۱۱گرم (احتیاط: بسیار سمی)

۳ ـ دای هیدروژن پتاسیم فسفات (KH_2PO_4) با وزن مولکولی ۱۳۶/۱۳

۴ ـ دتر جنت (پاک کننده) مناسب مانند استروکس SE یا تریتون ۱۰۰ ـ X

طرز تهیه محلول در ابکین

$K_3 Fe (CN)_6$	۰/۲ گرم
KCN	۰/۰۵ گرم
KH_2PO_4	۰/۱۴ گرم
Sterox SE/ or	
(Triton X-۱۰۰)	۰/۵ تا یک سی‌سی
آب مقطر	۱۰۰۰cc سی‌سی

محلول فوق در دمای ۲۵ـ۴ درجه در شیشه قهوه‌ای بوروسیلیکات برای چندین ماه پایدار است.

با وجود داشتن سیانور محلول فوق نسبتاً بی ضرر است (مصرف ۴ لیتر آن مرگ‌زا است)

محلول در ابکین باید صاف و زرد روشن باشد و جذب نوری آن در طول موج ۵۴۰ نانومتر با شاهد آب مقطر باید صفر شود.

میزان PH آن بین ۷/۴ ـ ۷ بوده و توصیه می‌شود که PH آن به طور منظم حداقل ماهی یک بار با پ هاش متر (PH - meter) چک شود.

محلول در ابکین در موارد زیر باید دور ریخته شود:

۱ ـ PH خارج از محدوده ۷/۴ ـ ۷ باشد.

۲ ـ جذب نوری آن در طول موج ۵۴۰ با شاهد آب مقطر عددی غیر از صفر باشد.

۳ ـ کدر شدن محلول

۴ ـ چنانچه به طور اتفاقی منجمد شود. انجماد محلول دراب کین موجب از هم پاشیدگی ترکیبات آن می‌شود.

مزیت محلول در ابکین با فرمول فوق

الف ـ استفاده از KH_2PO_4 باعث کم شدن PH محیط و تسریع واکنش‌ها می‌شود و می‌توان بعد از سه دقیقه از مخلوط کردن خون با محلول در ابکین میزان Hb را اندازه گرفت.

ب ـ محلول پاک کننده غیر یونی، همولیز گلبول‌های قرمز را سرعت بخشیده و موجب کاهش کدورت ناشی از لیپوپروتئین‌ها و غشای گلبول‌ها می‌شود.

روش انجام آزمایش

۱ ـ نمونه خون را کاملاً مخلوط کرده و سپس مقدار ۰/۰۲ سی سی با پی پت سالی (Sahli pipette) برداشته و به ۵ سی سی محلول در ابکین اضافه کنید تا رقت $\frac{1}{251}$ بدست آید. پی پت سالی را چندین بار در محلول آبکشی کنید.

۲ ـ جذب نوری دستگاه اسپکتروفتومتر را با آب مقطر یا محلول در ابکین در طول موج ۵۴۰ نانومتر صفر کرده و سپس جذب نوری محلول تست و استاندارد را به دست آورید.

$$\text{غلظت تست بر حسب گرم درصد} = \frac{\text{غلظت استاندارد} \times \text{جذب نوری تست}}{\text{جذب نوری استاندارد}}$$

نکته: برای به دست آوردن غلظت استاندارد بر حسب گرم درصد میزان mg% که روی ویال استاندارد درج شده است در عدد $\frac{۲۵۱}{۱۰۰۰}$ ضرب کنید.

ضریب ۲۵۱ نسبت رقت و ۱۰۰۰ در مخرج کسر برای تبدیل میلی‌گرم به گرم است. اگر غلظت استاندارد mg% ۶۰ باشد.

$$\text{غلظت استاندارد بر حسب گرم درصد} = \text{غلظت استاندارد mg\%} \times \frac{۲۵۱}{۱۰۰۰} = ۶۰ \times \frac{۲۵۱}{۱۰۰۰} = ۱۵ \text{ g\%}$$

اندازه‌گیری هماتوکریت یا حجم فشرده (PCV) به روش میکروهماتوکریت

نسبت درصد حجم گلبول‌های قرمز فشرده به کل حجم خون را حجم فشرده گویند. برای انجام تست هماتوکریت خون را به یک لوله موئین (کاپیلری) ۷۵ میلیمتری با قطر دهانه ۱/۲ میلی‌متر کشیده و حدود ۱۵ ـ ۱۰ میلی‌متر آن را خالی می‌گذاریم انتهای لوله را توسط خمیر با سطح صاف مسدود کرده و سپس به مدت ۵ دقیقه در سانتریفوژ میکرو هماتوکریت با شتاب ثقل بالا (۱۵۰۰۰ g - ۱۰۰۰۰) سانتری‌فوژ می‌شود.

حجم فشرده (PVC) با استفاده از خط کش یا ابزار با درجه‌بندی مخصوص قرائت می‌شود.

برای به دست آوردن حجم فشرده ارتفاع خون موجود درلوله موئین را معادل ۱۰۰٪ فرض کرده و سپس حجم گلبول‌های قرمز فشرده را از زیر لایه بافی کوت قرائت می‌کنیم.

کمیته بین‌المللی استانداردسازی در هماتولوژی زمان سانتری‌فوژ کردن را ۵ دقیقه برای خون‌های معمولی و برای نمونه‌های پلی سیتمی (پر خون) ۳ دقیقه دیگر علاوه بر ۵ دقیقه استاندارد توصیه می‌کند.

حجم فشرده را می‌توان با استفاده از خون وریدی با ضد انعقاد EDTA در لوله کاپیلری ساده و یا از خون مویرگی و با استفاده از لوله‌های کاپیلری که با ۲ واحد هپارین (2 IU) آغشته است، انجام داد.

۱۵۰ ± ۲۰ gr/L مقدار طبیعی هموگلوبین برای آقایان

۱۳۵ ± ۱۵ gr/L مقدار طبیعی هموگلوبین برای خانمها

۰/۴۵ ± ۰/۰۵ L/L مقدار طبیعی PCV در آقایان

۰/۴۱ ± ۰/۰۵ L/L مقدار طبیعی PCV در خانمها

منابع مهم خطا در اندازه‌گیری حجم فشرده گلبول قرمز (PCV)

۱ ـ استفاده از ضد انعقاد K_3EDTA حتی در مقدار طبیعی باعث اندکی چروکیدگی گلبول‌های قرمز و ۳٪ کاهش در هماتوکریت می‌گردد، لذا استفاده از K_2 EDTA توصیه می‌گردد.

۲ ـ افزایش غیر متناسب هر نوع نمک EDTA نسبت به حجم خون باعث چروکیدگی گلبول‌ها و در نتیجه کاهش هماتوکریت می‌گردد.

۳ ـ آن دسته از تغییرات شکل که موجب کاهش خاصیت انعطاف پذیری (Flexibility) گلبول‌های قرمز می‌شوند، مانند کم خونی داسی شکل و اسفروسیتوز به علت این که ضمن سانتریفوژ مقدار زیادی از پلاسما لابلای گلبول‌های قرمز به دام می‌افتد مقدار هماتوکریت را به طور کاذب افزایش می‌دهند. در آنمی داسی شکل چنانچه تمام گلبول‌های قرمز داسی شوند میزان پلاسمای به دام افتاده ممکن است به ۲۰ درصد برسد. پلاسمای به دام افتاده همچنین در کم‌خونیهای ماکروسیتیک، تالاسمی و کم‌خونی‌های هیپوکروم افزایش دارد.

۴ ـ ماندن خون به مدت زیاد در حرارت آزمایشگاه باعث کاهش انعطاف پذیری و افزایش هماتوکریت می‌شود.

۵ ـ میکروسیتوز با افزایش میزان پلاسمای به دام افتاده هماتوکریت را افزایش می‌دهد.

۶ ـ در حالت کلی میزان پلاسمای به دام افتاده معادل ۳٪ هماتوکریت در نظر گرفته شده و می‌توان میزان هماتوکریت را برای پلاسمای به دام افتاده تصحیح کرد. مثلاً اگر هماتوکریت بیماری ۴۷٪ باشد میزان واقعی هماتوکریت برابر است با:

حجم پلاسمای به دام افتاده ۱/۴۱ = ۳٪ × ۴۷٪

میزان هماتوکریت واقعی ٪ ۴۵/۶ = ۱/۴۱ ـ ٪۴۷

چنانچه هماتوکریت برای پلاسمای به دام افتاده تصحیح نشود موجب افزایش کاذب میزان MCV و کاهش MCHC خواهد شد.

شمارش گلبولهای قرمز و سفید

شمارش گلبول‌های قرمز و سفید را می‌توان با استفاده از آنالیزورهای تک کانالی و نیم اتوماتیک مانند کولتر مدل ZM را که قادر است گلبولها را در حجم ثابتی از خون رقیق شده مورد شمارش قرار داده و احتیاج به کالیبراسیون ندارد مورد شمارش قرار داد.

برای کاهش خطای عبور همزمان، گلبول‌های قرمز را به نسبت $\frac{۱}{۵۰۰۰}$ و گلبول‌های سفید را به نسبت $\frac{۱}{۵۰}$ رقیق می‌کنیم. برای رقیق کردن گلبولهای قرمز از یک میکروپی پت به حجم (۲۵٪ ± ۲) میکرولیتر برای انتقال خون به درون یک بالن حجم سنجی (ولومتریک) حاوی (۰/۰۸ ± ۱۰۰) میلی‌لیتر ایزوتون استفاده می‌شود. برای رقیق کردن گلبول‌های سفید از یک میکروپی پت به حجم (۰/۲۵ ± ۲۰) میکرولیتر برای انتقال خون به ظرف حاوی ۱۰ سی‌سی محلول ایزوتون استفاده می‌شود، که در نتیجه رقت $\frac{۱}{۵۰۰}$ تهیه می‌شود.

در صورت عدم دسترسی به سلول شمار تک کانالی یا دستگاه‌های دیگر اتوماتیک یا نیم اتوماتیک کالیبره شده برای شمارش چاره‌ای جز استفاده از روش شمارش دستی با هموسیتومتر نیست.

هر نمونه باید حداقل سه بار مورد شمارش قرار داد و میانگین شمارش را به دست آورد.

نتایج روش‌های دستی از تکرار پذیری خوبی برخوردار نیستند ولی وقتی که به عنوان تنها روش کار مطرح هستند باید مراعات تمام نکات از قبیل به کار گرفتن ملانژور سالم، هموسیتومتر سالم و لامل مخصوص شمارش را جهت کاهش خطای شمارش مد نظر قرار داد.

پس از محاسبه میانگین شمارش گلبول قرمز برای هر نمونه طبق فرمول‌های زیر اقدام

به محاسبه اندکس‌های خون می‌شود.

$$MCV = \frac{Hct}{RBC} \times 10$$

$$MCH = \frac{Hb}{RBC} \times 10$$

$$MCHC = \frac{Hb}{Hct} \text{ یا } \frac{MCH}{MCV} \times 100$$

در اینحالت گلبول‌های سفید و قرمز حداقل ۵ نمونه خون تازه را سه بار با روش دستی و دستگاهی تعیین مقدار کرده و برای هر کدام میانگین فاکتور تصحیح برای کالیبره کردن دستگاه بدست آورده می‌شود.

شمارش پلاکت

امروزه شمارش صحیح پلاکت‌ها تنها با دستگاههای پیشرفته اتوماتیک امپدانس یا اپتیک میسر است. منابع خطای فراوانی در رابطه با شمارش پلاکت‌ها با روش دستی وجود دارد.

تمایل پلاکت‌ها برای چسبیدن به همدیگر و به شیشه و نیز اندازه کوچک آن، که با ذرات دیگر اشتباه می‌شود، شمارش دستی آن را مشکل ساخته است. استفاده از اگزالات آمونیم به عنوان رقیق کننده که گلبول‌های قرمز را پاره می‌کند شمارش دقیق‌تری از پلاکت را نسبت به استفاده از فرمل سیترات (Formol - Citrate) که گلبول‌های قرمز را در محیط باقی می‌گذارد به دست می‌دهد. با استفاده از رنگ برلیان کریزل بلو می‌توان پلاکت‌ها را در هموسیتومتر تا حدی به رنگ آبی در آورد و شناسائی آنها را ساده‌تر کرد. سفارش می‌شود که شمارش پلاکتی دستگاه با تخمین شمارش از روی گستره محیطی خون EDTA دار همراه شود.

کنترل کیفی داخلی و تصدیق کالیبراسیون

مراقبت از روش‌های معمولی در آزمایشگاه به منظور کنترل جنبه‌های مختلف

روش‌های آزمایش، اندازه‌گیری‌های روزانه خون شاهد و بررسی آماری اطلاعات به دست آمده، که دقت و قابلیت تکرار پذیری را ارزیابی می‌کند، کنترل کیفی داخلی را تشکیل می‌دهند.

کالیبراسیون شمارشگرهای خودکار باید با خون کنترل مورد بررسی قرار گیرد تا چنانچه دستگاه از کالیبراسیون خارج شده باشد مجدداً اقدام به کالیبراسیون کرد.

نمونه خون کنترل یا به صورت تجارتی در دسترس بوده و یا این که هر آزمایشگاهی می‌تواند آن را تهیه نماید. از خون کنترل می‌توان روزانه استفاده کرد و چنانچه محدوده جواب‌های این خون کنترل قبلاً تعیین شده باشد می‌توان با استفاده از نمودار کنترل کیفی و ثبت روزانه مقادیر خون کنترل، نمودار را بررسی کرد که آیا جواب‌ها در محدوده ۲ SD ± است؟ آیا الگوی گرایش نتایج به یک طرف (Shift, trend) وجود دارد یا خیر؟ آیا با خطای اتفاقی روبرو هستیم یا سیستمیک؟

طرز تهیه خون کنترل

تهیه خون پایداری که بتوان نوسانات روزانه دستگاه را با آن مورد ارزیابی قرار داد مشکل است. سلول‌های خونی بسیار ترد و شکننده هستند لذا باید راهی را انتخاب نمود که بتوان آنها را پایدار (Fix) کرد یا از ذراتی استفاده کرد که از نظر حجم معادل سلول‌های خون باشند.

یکی از راه‌های آسان تهیه خون کنترل، استفاده از نمونه خون حاوی EDTA است که اندازه‌گیری پارامترهای آن تا ۲۴ ساعت در یخچال ۴ درجه قابل اعتماد است و این به مفهوم آن است که می‌توانیم از خون امروز به عنوان کنترل فردا استفاده کنیم.

در این حالت برای تصدیق کالیبراسیون دستگاه از آزمون آماری خاصی به نام (Student's *t* test) *t* استفاده می‌شود که نوسانات دیروز و امروز را مورد ارزیابی قرار می‌دهد (به توضیحات بعدی توجه کنید). برای تهیه خون کنترل می‌توان گلبول‌های قرمز و سفید را با استفاده از فیکساتیف پایدار ساخت و یا از ذرات لاتکس متناسب با اندازه هر سلول استفاده کرد.

مثلاً از ذرات لاتکس ۲ میکرومتری به جای پلاکت استفاده کرد (ذرات لاتکس با قطرهای ۱۲ ـ ۲ میکرومتر موجود است). از گلبول‌های قرمز فیکس شده بوقلمون یا مرغ می‌توان به جای گلبول‌های سفید خون کنترل استفاده کرد. گلبول‌های قرمز فوق به علت اینکه هسته‌دار هستند می‌توانند مانند گلبول سفید عمل کنند.

بنابراین روش‌های متعددی برای تهیه خون کنترل وجود دارد ولی ساده‌ترین روش که در آزمایشگاه رفرانس فارس از دوسال پیش تاکنون به کار می‌رود به شرح زیر است:

تهیه خون کامل پایدار شده شاهد (کنترل)

تهیه محلول فیکساتیف

۱ ـ فرمالدئید ۴۰٪ ـ ۳۷ (Formaldehyde) ۶/۷۵ سی‌سی

۲ ـ گلوتار آلدئید ۵۰٪ (glutaraldehyde) ۷۵cc٪ و چنانچه ۲۵٪ موجود باشد ۱/۵ سی سی استفاده شود.

۳ ـ سیترات سدیم ۲۶ گرم

۴ ـ آب مقطر (مواد فوق را با آب مقطر به ۱۰۰ سی سی برسانید)

روش تهیه خون کنترل

۱ ـ نمونه خون یک اهداکننده را در نگهدارنده CPD یا ACD یا CPD - A_1 جمع‌آوری کنید. سعی کنید تا حد امکان نمونه خون تازه بوده یا این که حداکثر بیش از ۴۸ ساعت از خون‌گیری نگذشته باشد.

۲ ـ به ازاء هر ۵۰ حجم از نمونه خون یک حجم از محلول فیکساتیف اضافه کنید. مثلاً اگر ۲۵۰ سی سی خون در CPD تهیه کرده‌اید آن را در ظرف استریل ریخته و به آن ۵ سی سی محلول فیکساتیف اضافه کرده و کاملاً مخلوط کنید.

۳ ـ به ازاء هر cc ۵۰۰ خون شاهد یک ویال پنی‌سیلین ۸۰۰۰۰۰ واحدی و یک گرم استرپتومایسین اضافه کرده و کاملاً مخلوط کنید. (یا برای مثال ۵۰-۲۵ میلیگرم پنسیلین و

همین مقدار جنتامایسین به ازای هر ۵۰۰ سی‌سی خون)

اضافه کردن سیکلو هگزامید نیز در صورت امکان کمک به نگهداری بیشتر این فرآورده می‌کند.

مقادیر ذکر شده فوق تجربی و مقداری کم و زیاد در اضافه کردن آنتی بیوتیک‌ها اشکالی ندارد.

۴ ـ خون کنترل را برای حداقل یک ساعت در درجه حرارت اتاق با دست مخلوط کرده و یا روی روتاتور قرار داده، و سپس آن را در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد بگذارید.

۵ ـ خون کنترل را به مدت ۷ روز در یخچال نگهدارید و هر روز به مدت یک ساعت آن را بیرون آورده و آن را روی روتاتور قرار داده و بعد در یخچال قرار دهید. بعد از یک هفته کاملاً آن را مخلوط کرده و آن را در ویال‌های ۳ـ۲ سی سی ریخته و در یخچال نگهداری کنید.

خون کنترل فوق به مدت چندین ماه (۶ـ۴ ماه) قابل استفاده است.

گفتنی است که با اضافه کردن محلول فیکساتیف گلبول‌ها به تدریج حالت چروکیده بخود گرفته و سپس پایدار می‌شوند. در روزهای اول این تغییرات با سرعت صورت می‌گیرد ولی بعد از یک هفته در یخچال این تغییرات بسیار اندک است. خون کنترل را می‌توان حداقل $n = ۲۰$ بار به یک دستگاه کالیبره داد و میانگین پارامترها و محدوده $\bar{x} \pm ۲\ SD$ آن را مشخص کرد و از آن پس به عنوان کنترل کیفی داخلی و تهیه نمودار کنترل کیفی استفاده کرد.

کنترل کیفی داخلی (Internal Quality Control) و تصدیق کالیبراسیون

کنترل کیفی داخلی به طور اولیه دقت و تکرار پذیری آزمون‌های روزانه را تحت کنترل می‌گیرد. کنترل کیفی داخلی معمولاً بر اساس ارزیابی نتایج روزانه کنترل و به کار بردن یک سری قوانین کنترل کیفی صورت می‌گیرد که بعضی از آن‌ها حساس به خطاهای راندوم و برخی به خطاهای سیستمیک است. متداول‌ترین و سریع‌ترین تجزیه و تحلیل آماری نتایج، استفاده از نمودار کنترل کیفی (Quality Control Chart) است. معمولاً خطاها شامل دو نوع است:

الف ـ خطاهای راندوم یا غیر قابل پیش بینی (Random error)

ب ـ خطاهای سیستمیک

خطاهای راندوم ممکن است مثلاً در اثر نوسانات غیر قابل کنترل در درجه حرارت، ولتاژ، ظروف حجمی و طول موج و از این قبیل موارد ایجاد شود.

خطاهای راندوم به صورت پراکنده رخ می‌دهند و ممکن است به طرف مثبت یا به طرف منفی میانگین و به مقادیر متفاوت وجود داشته باشد.

خطاهای سیستمیک غالباً به علت عملکرد غلط دستگاه رخ می‌دهد، به طور مثال اگر رقیق کردن خون توسط شمارشگر از صحت خوبی برخوردار نباشد و یا این که از مواد فاسد (مثلاً معرف‌های فاسد) استفاده شده باشد. و یا اینکه روزنه دستگاه با مواد پروتئینی نیمه مسدود شده باشد. خطاهای سیستمیک معمولاً نتایج را به یک اندازه و به یک طرف سوق می‌دهند.

با بررسی دقت و صحت می‌توان خطاهای حاصله را پی‌گیری کرد.

دقت (Percision)

تکرار یک آزمایش بر روی یک نمونه تحت شرایط یکسان به ندرت به جواب‌های یکسان می‌رسد و معمولاً نتایج حاصله پراکنده هستند. سنجش پراکندگی جواب‌ها با محاسبه انحراف معیار به دست آورده می‌شود. چنانچه نتایج تکراری یک آزمون تحت شرایط یکسان به هم نزدیک باشد گفته می‌شود که جواب‌ها از دقت خوبی برخوردار است.

صحت (Accuracy)

نزدیک بودن نتایج به دست آمده به مقدار واقعی گفته می‌شود.

تعیین محدوده اطمینان

چنانچه میانگین و انحراف معیار پارامترهای خون کنترل از قبل مشخص نباشد، حداقل

بیست بار از روی آن پارامترهای گوناگون CBC را با یک آنالیزور کالیبره تعیین مقدار کرده و میانگین و انحراف معیار را محاسبه می‌کنیم. در آزمایشگاه به صورت روزمره این پیش فرض گذاشته می‌شود که نتایج بدست آمده دارای پراکندگی نرمال یا گوسی (Gaussian) است.

مثال: اندازه‌گیری مکرر هموگلوبین (۱۲ مرتبه) روی یک نمونه خون کنترل به شرح زیر است:

دفعات اندازه‌گیری	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
مقدار هموگلوبین	۱۰	۹/۸	۱۰/۲	۱۰/۲	۱۰	۱۰	۹/۸	۱۰/۳	۹/۷	۱۰/۴	۱۰/۴	۱۰/۴

$\bar{X}$ = میانگین

X= نتیجهٔ قرائت یک آزمون

ΣX = مجموع نتایج آزمون‌ها

n = تعداد دفعات آزمایش

$$\bar{X} = \frac{\Sigma x}{n} = \frac{X_1 + X_2 + X_3 + \ldots\ldots + X_{12}}{n}$$

$$\bar{X} = \frac{۱۰ + ۹/۸ + ۱۰/۲ + ۱۰/۲ + ۱۰ + ۱۰ + ۹/۸ + ۱۰/۳ + ۹/۷ + ۱۰/۴ + ۱۰/۴ + ۱۰/۴}{۱۲} = \frac{۱۲۱/۲}{۱۲}$$

$\bar{X} = ۱۰/۱ \cong ۱۰$

$$SD = \sqrt{\frac{\Sigma (X - \bar{X})^2}{n-1}}$$ انحراف معیار

$X - \bar{X}$ اختلاف بین هر نتیجه و میانگین

$(X - \bar{X})^2$ اختلاف بین هر نتیجه از میانگین به توان ۲

$\Sigma (X - \bar{X})^2$ مجموع $(X - \bar{X})^2$

$(n - 1)$ تعداد دفعات آزمایش منهای یک (درجه‌ی آزادی)

بنابراین با توجه به جدول قبل و دانستن اینکه میانگین اندازه‌گیری Hb برابر ۱۰ است خواهیم داشت:

اندازه‌گیری Hb	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
مقدار هموگلوبین	۱۰	۹/۸	۱۰/۲	۱۰/۲	۱۰	۱۰	۹/۸	۱۰/۳	۹/۷	۱۰/۴	۱۰/۴	۱۰/۴
تفاوت از میانگین $(X - \bar{X})$	۰	-۰/۲	+۰/۲	+۰/۲	۰	۰	-۰/۲	+۰/۳	-۰/۳	+۰/۴	+۰/۴	+۰/۴
$(X - \bar{X})^2$	۰	۰/۰۴	۰/۰۴	۰/۰۴	۰	۰	۰/۰۴	۰/۰۹	۰/۰۹	۰/۱۶	۰/۱۶	۰/۱۶

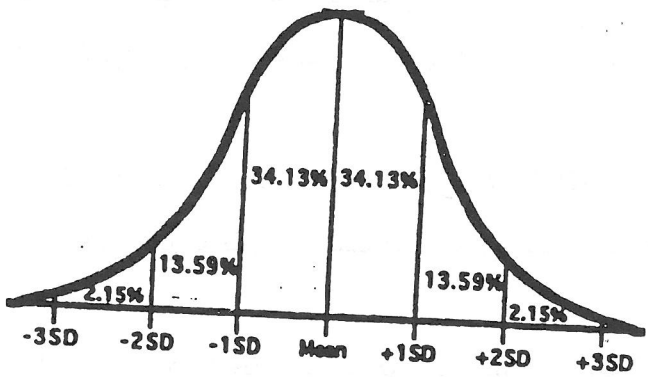
$$\text{انحراف معیار } SD = \sqrt{\frac{\Sigma(X- \bar{X})^2}{n-1}} = \sqrt{\frac{۰/۸۲}{۱۱}} = ۰/۲$$

در منحنی انتشار نرمال:

۶۸٪ از نتایج حاصل بین میانگین و یک انحراف معیار قرار می‌گیرد:($\bar{X} \pm ۱ SD$)

۹۵٪ از نتایج حاصل بین میانگین و دو انحراف معیار قرار می‌گیرد:($\bar{X} \pm ۲ SD$)

۹۹/۷٪ از نتایج حاصل بین میانگین و سه انحراف معیار قرار می‌گیرد:($\bar{X} \pm ۳ SD$)



منحنی پخش نتایج طبیعی (Gaussian Curve)

با انتقال میانگین و انحراف معیار روی محور y یک کاغذ شطرنجی چارت کنترل کیفی بدست می‌آید.

بر روی این چارت محدوده هشدار و محدوده کنترل مشخص شده و محور X بر اساس دفعاتی که خون کنترل قرار است به دستگاه داده شود درجه‌بندی می‌شود.

محدوده هشدار بالایی	$\bar{X} + ۲ SD$
محدوده هشدار پائینی	$\bar{X} - ۲ SD$
محدوده کنترل بالایی	$\bar{X} + ۳ SD$
محدوده کنترل پائینی	$\bar{X} - ۳ SD$

میانگین توسط خط مشکی بزرگ در مرکز و محدوده‌ها با خط چین مشخص می‌شوند. حال که محدوده‌های نمودار مشخص شده می‌توان به طور روزانه خون کنترل را به دستگاه داد و نتایج آن را در نمودار کنترل کیفی مانند نمودار زیر رسم کرد.

نمودار زیر به چارت لوی جنینگ (Levy Jennings) مشهور است. در این نمودار به جز نتیجه شماره ۱۴ (که ممکن است به طور قابل انتظار از هر ۲۰ نمونه یکی رخ دهد بقیه نتایج در محدوده $\pm ۲ SD$ هستند. با به کارگیری قوانین وست‌گارد (Westgard) می‌توان نمودار کنترل کیفی را آنالیز کرد. قوانین و ست گارد عبارتند از:

۱ ـ قانون 1:2S: قرار گرفتن یک نتیجه کنترل بالاتر یا پائین‌تر از حد $\pm ۲ SD$ به عنوان هشدار است.

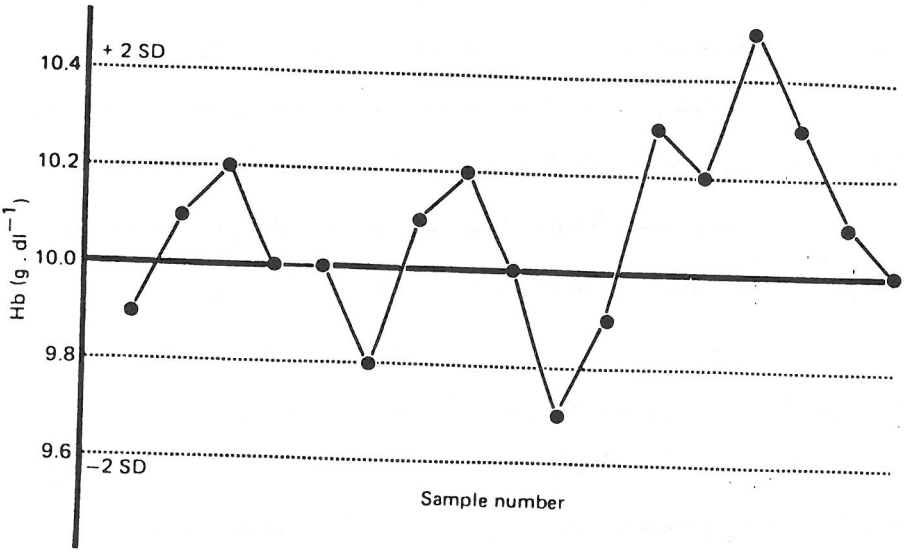
۲ ـ قانون 1:3 S قرار گرفتن یک نتیجه خون کنترل بالاتر از $+ ۳ SD$ یا پائین‌تر از $۳ SD$ ـ دلیل بر نپذیرفتن نتایج به طور کلی است. این قانون نسبت به خطاهای راندوم یا پراکنده حساس است.

۳ ـ قانون 2:2 S قرار گرفتن دو نتیجه پشت سر هم، بالای $+ ۲ SD$ یا زیر $۲ SD$ ـ دلیل بر نپذیرفتن نتایج است، این قانون نسبت به خطاهای سیستمیک حساس است.

۴ ـ قانون R:4 S قرار گرفتن دو نتیجه خون کنترل پشت سر هم که یکی بیشتر از

۲SD + و دیگری کمتر از حد ۲ SD ـ باشد دلیل بر نپذیرفتن جواب‌هاست. این قانون نسبت به خطاهای پراکنده حساس است.

۵ ـ قانون ۴:۱S قرار گرفتن چهار خوانده پیاپی در یک طرف خط میانگین (بالا یا پائین) ۱ SD ± دلیل بر نپذیرفتن جواب‌هاست. این قانون نسبت به خطاهای سیستمیک حساس است.



نمایش روزانه اندازه گیری هموگلوبین خون کنترل روی گراف لوی جنینگ (Levy-Jennings). *میانگین غلظت هموگلوبین خون کنترل ۱۰ گرم در دسی لیتر و میزان انحراف معیار ۰/۲ است. با توجه به گراف تمام نتایج به جز شماره ۱۴ در محدوده کنترلی (میانگین ± ۲ انحراف معیار) قرار دادند. از هر ۲۰ اندازه گیری ممکن است انتظار مشاهده یک نتیجه خارج از محدوده کنترلی باشد.*

۶ـ قانون M : ۱۰ (Mean : ۱۰) قرار گرفتن ۱۰ خوانده پیاپی خون کنترل در یک طرف خط میانگین بدون توجه به مقدار انحراف دلیل بر نپذیرفتن جواب‌هاست. این قانون به خطاهای سیستمیک حساس است.

خطاهای راندوم موجب پراکندگی شدید نتایج روی نمودار می‌شوند. قوانین وست‌گارد 1:3S و R:4S بیان این نوع خطاهاست.

خطاهای سیستمیک با قوانین و ست گارد 2:2 S و 1 S : ۴ و M:۱۰ مشخص شده که در این حالت نتایج کنترل پشت سر هم و به طور مداوم در یک طرف خط میانگین قرار می‌گیرند و در چارت به صورت الگوی گرایش یا جابجایی در می‌آیند.

هنگامی که نتایج متوالی به صورت تدریجی در یک طرف خط میانگین سیر صعودی یا نزولی داشته باشد به آن الگوی گرایش یا ترند (Trend) گفته می‌شود.

چنانچه پشت سر هم قرار گرفتن نتایج در یک طرف خط میانگین بعد از تغییر ناگهانی از میانگین رخ دهد به آن الگوی جابجایی یا شیفت (Shift) گفته می‌شود.

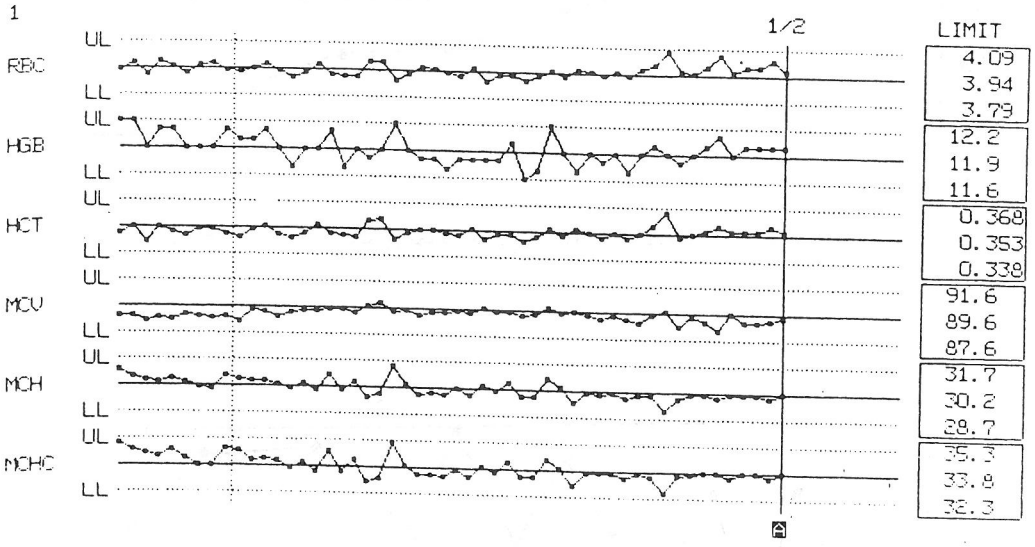
نتایج پارامترهای خون کنترل به منظور کسب اطمینان از صحت جوابهای بیماران در محدوده 2± انحراف معیار ثبت شده است.

از خون با دوام کنترل که طرز تهیه آن قبلاً بیان شد بایستی نخست میانگین و انحراف معیار برای هر پارامتر را بدست آورد. چارت لوی جنینگ را با خط افقی پررنگ که به مفهوم میانگین و خطوط نقطه‌چین بالا و پایین برای هر پارامتر که محدوده ۲SD± را مشخص می‌کند رسم می‌شود. (UL و LL به ترتیب محدوده بالا و پائین را نشان می‌دهد)

خون کنترل با یک دستگاه کالیبره برای مثال ۲۰ بار (n=20) مورد آزمایش قرار داده و سپس با توجه به داده‌های هر بار میزان میانگین و انحراف معیار برای هر پارامتر محاسبه می‌شود.

خون کنترل را روزانه (یک بار یا بیشتر) به دستگاه داده و میزان هر پارامتر به صورت نقطه روی چارت مربوط به خود با توجه به مقدار آن ثبت می‌شود. تقسیم‌بندی محور افقی بیانگر هر بار که نمونه کنترل به دستگاه داده می‌شود در نظر گرفته می‌شود.

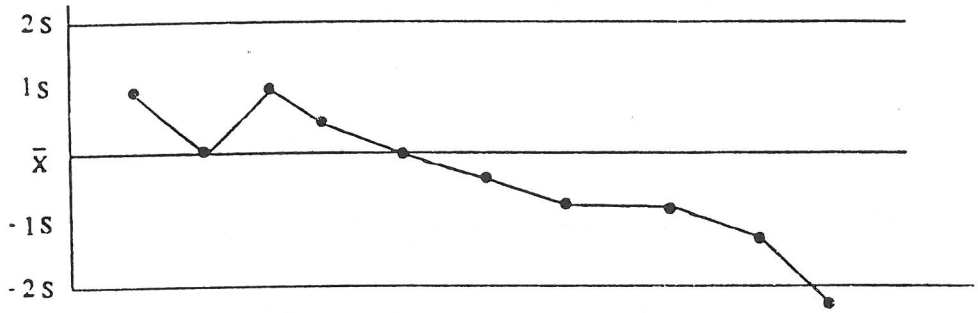
هنگامی که دستگاه از دقت و صحت خوبی برخوردار باشد، نقاط بدست آمده در اطراف خط میانگین نوسان داشته و کمتر از ۵ درصد نتایج درخارج از 2SD قرار می‌گیرد.



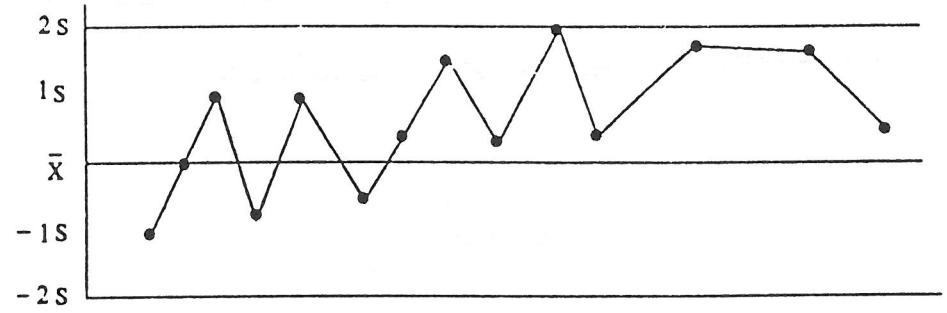
چارت کنترل

قرار گرفتن دو یا بیشتر از نتایج در خارج از محدوده 2SD± یا میل نقطه‌ها به سمت بالا (Positive trend) یا پایین خط میانگین (Negative trend) یا خواندن پیاپی خون کنترل در یک طرف خط میانگین چه در جهت مثبت (Positive shift) و چه منفی (Negative shift) بیانگر نقص در روش کار یا کالیبراسیون دستگاه است.

مشاهده الگوی تمایل نقطه‌ها به یک سو (trend) و یا جابجایی نقطه‌ها در یک طرف (shift) حاکی از خطای سیستمیک بوده و ممکن است بیانگر بهم خوردن کالیبراسیون، اشکال فنی در دستگاه، خراب شدن معرف‌های مصرفی باشد و روی هم رفته یک مشکل پیش‌رونده را یادآوری می‌کند.



الگوی تمایل منفی (Negative trend)



الگوی جابجایی (Shift) *مثبت*

نمودار کیوسام (Cusum) یا مجتمع فراوانی (Cummulative sum)

در چارت کیوسام تفاوت روزانه نتایج خون کنترل از میانگین مورد انتظار محاسبه گردیده و سپس مجموع تفاوت‌های روزانه به منظور ارزیابی کلی مشاهدات روی نمودار برده می‌شود.

برای رسم نمودار کیوسام در محور Y خط صفر و محدوده ۲ SD ± رسم می‌شود. روی

محور X تعداد دفعات آزمایش خون کنترل قرار داده می‌شود.

توجه داشته باشید که چارت نمودارهای لوی جنینگ و کیوسام را برای هر پارامتر خون از قبیل اندکس‌ها، شمارش WBC و RBC می‌توان جداگانه رسم کرد. برای سادگی مطلب به مثال زیر توجه فرمائید:

چنانچه میانگین هموگلوبین خون کنترل ۱۰ و نتایج ۱۲ روز اندازه‌گیری پیاپی هموگلوبین به شرح زیر باشد می‌توان جدول و نمودار کیوسام را مانند زیر رسم کرد:

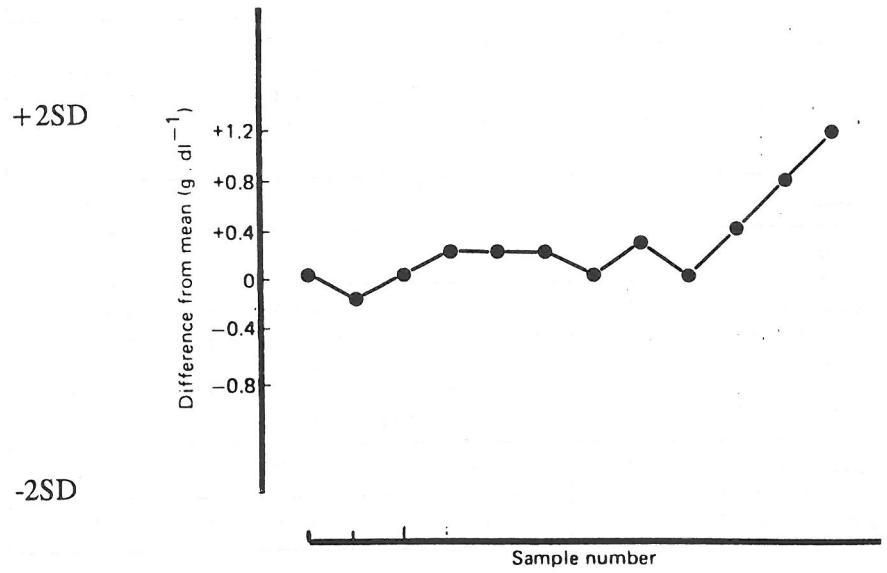
اندازه‌گیری هموگلوبین خون کنترل	مقدار Hb	مقدار میانگین	تفاوت روزانه	مجموع تفاوت روزانه
روز اول	۱۰	۱۰	۰	۰
روز دوم	۹/۸	۱۰	- ۰/۲	- ۰/۲
روز سوم	۱۰/۲	۱۰	+ ۰/۲	۰
روز چهارم	۱۰/۲	۱۰	+ ۰/۲	+ ۰/۲
روز پنجم	۱۰	۱۰	۰	+ ۰/۲
روز ششم	۱۰	۱۰	۰	+ ۰/۲
روز هفتم	۹/۸	۱۰	- ۰/۲	۰
روز هشتم	۱۰/۳	۱۰	+ ۰/۳	+ ۰/۳
روز نهم	۹/۷	۱۰	- ۰/۳	۰
روز دهم	۱۰/۴	۱۰	+ ۰/۴	+ ۰/۴
روز یازدهم	۱۰/۴	۱۰	+ ۰/۴	+ ۰/۸
روز دوازدهم	۱۰/۴	۱۰	+ ۰/۴	+ ۱/۲

هنگامی که جواب‌های خون کنترل نزدیک میانگین مورد نظر باشند مجموع تفاوت‌های روزانه در نمودار کیوسام بالا و پائین خط صفر حرکت کرده و خط نسبتاً مستقیمی بدست می‌دهد.

در نمودار کیوسام خطاها و تغییرات راندوم همدیگر را حذف کرده، لذا خطاهای سیستمیک به وضوح بهتری نشان می‌دهد. در مثال فوق گر چه نمودار لوی جنینگ خطایی را نشان نداده ولی نمودار کیوسام نشان می‌دهد که جواب‌های کنترل در حال گرایش (Trend) هستند و احتمال خطای سیستمیک را مطرح می‌سازد.

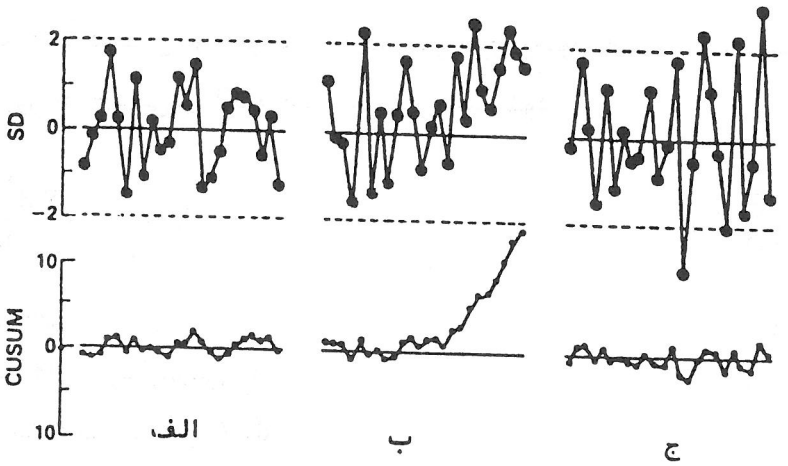
گرایش جواب‌های کنترل باعث می‌شود که منحنی کیوسام از خط مستقیم خارج شده و شیب پیدا کند. اندازه شیب منحنی به اندازه خطای سیستمیک است.

نمودار کیوسام بهتر از نمودار لوی جنینگ می‌تواند خطای سیستمیک را شناسائی کند و لذا توصیه می‌شود که در یک آزمایشگاه همزمان از هر دو نمودار استفاده شود.



روزهایی که نمونه کنترل مورد آزمایش قرار گرفته است

نمایش مجموع تفاوت‌های روزانه در اندازه‌گیری هموگلوبین نمونه کنترلی بر روی گراف کیوسام. با توجه به گراف نتایج خون کنترل تا شماره ۱۰ در محدوده کنترل است در حالی که از شماره ۱۱ به بعد یک مسیر بالا رونده در نتایج مشاهده می‌شود.



مقایسه چارت لوی جنینگ و کیوسام در نتایج روزانه یک نمونه کنترلی
الف ـ نتایج روزانه بر اساس هر دو نمودار در محدوده کنترل هستند
ب ـ با وجودی که نمودار لوی جنینگ همچنان دقت نتایج جواب‌های کنترل را در محدوده کنترل نشان می‌دهد ولی نمودار کیوسام گرایش نتایج را به طرف بالا بسیار بهتر نشان می‌دهد.
ج ـ نیمی از نتایج کنترل در محدوده و نیم دیگر در خارج محدوده پراکنده شده‌اند که حاکی از کاهش دقت می‌باشد.

آزمون آماری t

مشخص شده است که چنانچه نسبت افزایش خون به ضد انعقاد EDTA متناسب باشد پارامترهای RBC, WBC، هموگلوبین، Hct و ایندکس‌ها در خون حاوی EDTA که در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده حداقل برای ۲۴ ساعت ثابت خواهند بود.

تعداد پنج نمونه یا ترجیحاً ۱۰ نمونه خون که مقادیر پارامترهای آن در محدوده طبیعی است به دستگاه داده و مقادیر آن یادداشت می‌شود. سپس آنها را در یخچال گذاشته و روز بعد نمونه‌ها را از یخچال بیرون آورده و پس از آن که به دمای اتاق رسیدند دو مرتبه به

دستگاه داده و مقادیر آنها یادداشت می‌شود. این دو اندازه‌گیری برای هر پارامتر خونی به طور جداگانه با استفاده از آزمون آماری t (Student's t test) و محاسبه tn با هم مقایسه می‌شوند. اگر در بین دو جواب اختلاف معنی‌داری وجود داشته باشد، دستگاه از کالیبراسیون خارج و می‌باید اقدام به کالیبراسیون مجدد شود.

$$SD = \sqrt{\frac{\Sigma(d^2) - \frac{(\Sigma d)2}{n}}{n-1}} \qquad tn = \frac{\bar{d}}{SD}\sqrt{n}$$

در فرمول فوق:

تعداد جفت‌های مورد آزمایش = n

میانگین اختلافات (روز به روز) = $\bar{d}$

انحراف معیار اختلاف = SD

مقدار t_n برای هر پارامتر خونی محاسبه شده و چنانچه مقدار t_n محاسبه شده از مقدار بحرانی ۹۵٪ محدوده اطمینان که در جدول آماری t یافت می‌شود فراتر رود اختلاف در سطح ۵٪ معنی دار می‌شود.

مثال: تصدیق کالیبراسیون MCV با آزمون آماری t

نمونه خون	میزان MCV روز اول	میزان MCV روز دوم	(میزان d) یا اختلاف روزبه روز	d^2
۱	۸۰	۸۲	-۲	۴
۲	۱۰۰	۹۶	۴	۱۶
۳	۷۲	۷۰	۲	۴
۴	۶۲	۶۱	۱	۱
۵	۸۸	۸۵	۳	۹

$$\bar{d} = \frac{\Sigma d}{n} = \frac{۸}{۵} = ۱/۶$$

$$SD = \sqrt{\frac{\Sigma(d^2) - \frac{(\Sigma d)2}{n}}{n-1}}$$

$$SD = \sqrt{\frac{۳۴ - \frac{۶۴}{۵}}{۴}}$$

$$SD = \sqrt{۵/۳} = ۲/۳$$

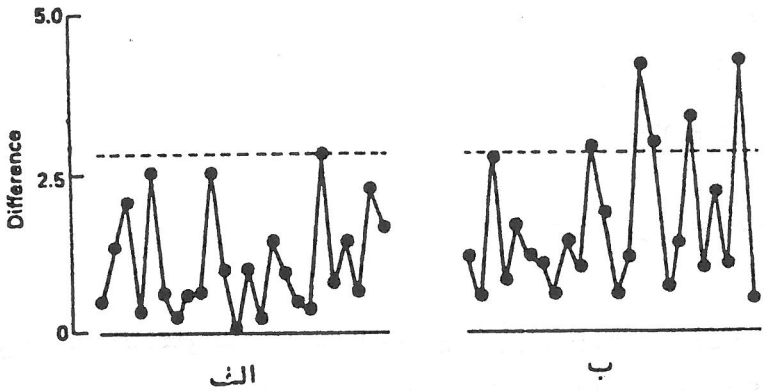
$$t_n = \frac{\bar{d}}{Sd}\sqrt{n} = \frac{۱/۶}{۲/۳}\sqrt{۵} = ۱/۵۴$$

برای n = ۵ (جفت‌های مورد آزمایش) مقدار t_n بحرانی با توجه به جدول t برابر ۲/۷۸ است. اگر میزان t_n بیشتر از ۲/۷۸ باشد می‌توان تا ۹۵ درصد اطمینان داشت که اختلاف معنی‌داری بین MCV دو روز وجود دارد. در صورت وجود یک t معنی‌دار باید اقدام به رفع اشکال در کانال مربوط به آن پارامتر نمود.

در مثال فوق چون مقدار t کمتر از ۲/۷۸ است نتیجه گرفته می‌شود که دستگاه از کالیبراسیون خارج نشده است.

نمودار کنترلی دوبل (duplicate)

وقتی که دستگاه شمارشگر از وضعیت کالیبراسیون خوبی برخوردار باشد حداقل ۲۰ نمونه خون از بیماران را به طور راندوم برداشته و به صورت راندوم هر کدام دوباره به دستگاه داده می‌شود. برای هر پارامتر اختلاف بین جواب‌های دوبل محاسبه می‌شود. قدر مطلق اختلاف در نظر گرفته (بدون توجه به علامت + یا - آن) و میانگین آنها محاسبه می‌شود. با ضرب کردن میانگین اختلاف در عدد ۲/۴۵ محدوده بالای ۹۵٪ اطمینان بدست می‌آید. بدین مفهوم که ۹۵٪ از مقادیر اختلاف بایستی بین صفر و محدوده بالای اطمینان قرار گیرد. با انتقال این محدوده اطمینان روی محور Y نمودار مضاعف (duplicate) ترسیم می‌گردد. بعد از رسم این نمودار می‌توان از هر ۲۰ تست روزانه یکی را به صورت دوبل به دستگاه داد و میزان اختلاف را روی نمودار رسم نمود. محور X تعداد آزمون‌های دوبل را نشان می‌دهد.



نمودار کنترل برای جواب‌های دوبل

تفاوت بین جواب‌های دوبل محاسبه می‌شود و به آن علامت مثبت داده می‌شود (بدون توجه به اختلاف مثبت یا منفی). مقدار عددی اختلاف محاسبه شده با توجه به محور X که بر حسب تعداد دفعات انجام آزمایش‌های دوبل درجه‌بندی گردیده است روی نمودار برده می‌شود. ۹۵ درصد از مقادیر می‌بایست بین صفر (خط مشکی پررنگ) و محدوده بالا (خط‌چین) قرارگیرند. در چارت «الف» نتایج در محدوده کنترل بوده، در حالی که در نمودار «ب» نیمی از جواب‌ها در محدوده کنترل و نیمی خارج می‌باشند و بیانگر عدم دقت می‌باشد.

در گراف الف مقادیر اختلاف جواب‌های دوبل برای پارامتر مورد نظر در محدوده اطمینان است، بنابراین دستگاه کالیبره است ولی در گراف ب نصف جواب‌ها خارج از محدوده اطمینان است. در آزمون آماری دوبل نیز می‌توان انحراف معیار را برای هر پارامتر ترجیحاً با استفاده از ۲۰ نمونه که به صورت دوبل به دستگاه کالیبره داده می‌شود طبق فرمول زیر محاسبه کرد:

$$Sd = \sqrt{\frac{\Sigma d^2}{2n}}$$

در رابطه فوق d^2 = مجذور اختلاف‌های نتایج دوبل برای یک پارامتر مخصوص و

n = تعداد مشاهدات زوج است.

پس از بدست آوردن انحراف معیار می‌توان از هر ۲۰ نمونه روزمره که به دستگاه داده می‌شود یکی را به صورت دوبل به دستگاه داد و اختلاف نتایج دوبل را برای پارامتر مورد نظر به دست آورد. تفاوت جواب‌های دوبل نباید خارج از محدوده ۲SD± باشد و تنها یک جواب از هر ۲۰ جواب می‌تواند خارج از محدوده فوق باشد.

برای دست‌یابی به نمودار کنترلی دوبل (duplicate test) می‌توان روزی که دستگاه از کالیبراسیون خوب برخوردار است ۲۰ نمونه که قبلاً به دستگاه داده شده است انتخاب و مجدداً در همان روز به دستگاه داد و برای هر پارامتر مقدار انحراف معیار مشخص کرد. برای مثال چنانچه ۱۰ نمونه شانسی انتخاب شده که برای بار اول و دوم به دستگاه داده می‌شود دارای مقادیر زیر برای هموگلوبین باشد.

تعداد نمونه	اولین اندازه‌گیری	دومین اندازه‌گیری	تفاوت بین دو اندازه‌گیری (d)	مجذور تفاوت d^2
۱	۱۲	۱۲/۴	۰/۴	۰/۱۶
۲	۱۴/۸	۱۵/۱	۰/۳	۰/۰۹
۳	۱۰/۶	۱۱/۳	۰/۷	۰/۴۹
۴	۱۶/۹	۱۶	۰/۹	۰/۸۱
۵	۱۰	۱۰/۵	۰/۵	۰/۲۵
۱۶	۱۸/۶	۱۹/۶	۱	۱
۷	۱۶	۱۷	۱	۱
۸	۱۵	۱۴/۴	۰/۶	۰/۳۶
۹	۱۶/۵	۱۵/۹	۰/۶	۰/۳۶
۱۰	۱۳	۱۳	۰	۰

$$Sd = \sqrt{\frac{\Sigma d^2}{2n}} = \sqrt{\frac{۴/۵۲}{۲۰}} = ۰/۴۷$$

$$2SD = ۰/۹۵$$

حال چنانچه در یک روز کاری یک نمونه را انتخاب و به صورت دوبل به دستگاه داده شود تفاوت جوابهای دوبل نبایستی از ۰/۹۵ تجاوز کند. برای مثال چنانچه جواب هموگلوبین برای بار اول ۱۶/۹ و جواب بار دوم ۱۵/۲ باشد تفاوت دو جواب برابر ۱/۷ می‌شود که از دو برابر انحراف معیار بیشتر است و قابل قبول نیست. چنانچه موارد دیگر دارای نتایج غیرقابل قبول باشد دستگاه از نظر هموگلوبین از کالیبراسیون خارج است. برای هر پارامتر خونی چنین چارتی را می‌توان تشکیل داده و از کالیبراسیون دستگاه آگاه شد.

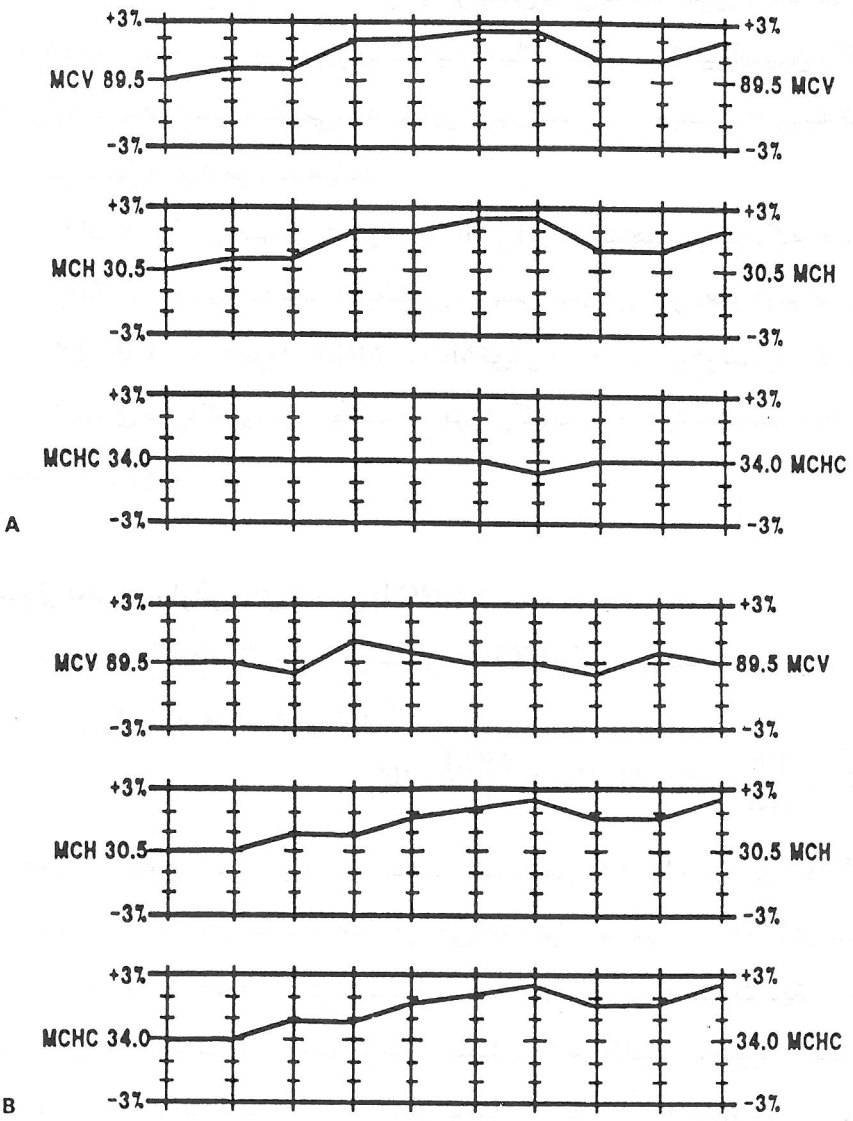
آزمون آماری میانگین متحرک (Moving Average)

آزمون میانگین متحرک توسط بول (Bull) برای کنترل کیفی داخلی اندکس‌های خونی ارائه گردیده است. طرح آزمون آماری فوق بر این اساس است که مقادیر اندکس‌های خون برای هر بیمارستان که بیماران مناطق مخصوص را می‌پذیرد ثابت است. بنابراین اگر میانگین اندکس‌های خون در جمعیت آن ناحیه مشخص شده باشد می‌توان از نمونه‌های خون بیماران که روزانه به دستگاه داده می‌شود برای کنترل کردن کالیبراسیون استفاده کرد.

برای شروع چنین برنامه‌ای دستگاه شمارشگر را طبق روش روزمره کالیبره کرده و حداقل ۵۰۰ نمونه بیمار را آزمایش می‌کنیم و میانگین پارامترها را حساب می‌کنیم. انجام کار فوق شاید هر چند سال یک بار نیاز باشد.

میانگین بدست آمده برای هر پارامتر به روش فوق به عنوان پایه برای چک کردن کالیبراسیون و انحراف دستگاه به کار می‌رود. بول (Bull) نشان داد که با محاسبه میانگین‌های متحرک MCHC, MCH, MCV برای هر ۲۰ نمونه متوالی که به طور راندوم پشت سر هم به دستگاه داده می‌شود می‌توان وضعیت کالیبراسیون را بررسی کرد. البته نباید نمونه ۲۰ بیمار که به عنوان مثال مبتلا به کم خونی یا لوسمی هستند را پشت سر هم به دستگاه داد. اگر مقادیر میانگین که به ازاء هر ۲۰ نمونه به دست می‌آید ۳٪ از میزان پایه تغییر کند کالیبراسیون دستگاه باید بررسی شود. قبل از اقدام به کالیبراسیون مجدد باید حداقل میانگین سه دسته ۲۰ تایی از نمونه‌ها بیش از ۳٪ از میانگین پایه اختلاف داشته باشد.

مزایای آزمون میانگین متحرک این است که خون تازه جهت کالیبراسیون دستگاه استفاده می‌شود.



کنترل کیفی با استفاده از پارامترهای بیماران

در آزمایشگاهی که روزانه حداقل ۱۰۰ نمونه دارد نبایستی اختلاف چشمگیری در میانگین روزانه اندکس‌های گلبول قرمز دیده می‌شود. البته بایستی از یک جمعیت پایدار استفاده کرد و برای مثال نباید از نمونه‌های مربوط به بیماران خاص که موجب تغییر ناگهانی در میانگین داده‌ها می‌شوند استفاده کرد. با این پیش فرض که نمونه‌های با وضعیت پایدار به دستگاه داده شده است هر تغییر چشمگیری بیانگر تغییر در کالیبراسیون یا اختلال عمل‌کرد دستگاه است. بنظر می‌رسد که این روش کنترل حساسیت ویژه‌ای به تغییرات شمارش گلبول‌های قرمز داشته باشد.

در گراف A افزایش همزمان در میزان MCV و MCH مشاهده می‌شود که احتمالاً به علت گرفتگی روزنه دستگاه با مواد پروتئینی و کاهش شمارش گلبول‌های قرمز است.

در گراف B افزایش همزمان MCH و MCH گویای خطای کاذب در شمارش گلبول‌های قرمز یا خطای اندازه‌گیری در هموگلوبین و افزایش کاذب آن مثلاً به علت کدر شدن محلول سنجش هموگلوبین است.

کنترل کیفی شمارش‌های دستی با MCHC

میانگین غلظت هموگلوبین درون سلولی (MCHC) یکی از پارامترهای خون است که بر طبق فرمول‌های زیر محاسبه می‌شود.

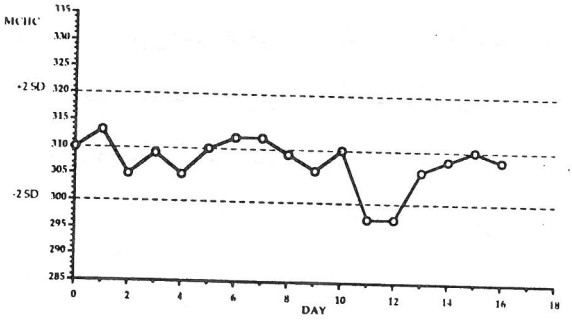
$$MCHC = \frac{Hb}{Hct} \times 100 \quad \text{یا} \quad MCHC = \frac{MCH}{MCV} \times 100$$

همان‌گونه که قبلاً یادآوری شد به عبارت ساده پارامتر MCHC نسبت وزن هموگلوبین به حجم گلبول نماینده را مورد سنجش قرار می‌دهد میزان طبیعی آن ۳۶-۳۳ درصد است. افزایش MCHC به مفهوم افزایش نسبت وزن به حجم است یا به عبارت دیگر نماینده گلبول‌های قرمز نسبت به حجمش از میزان بیشتری از هموگلوبین برخوردار است مانند مرفولوژی اسفروسیت. کاهش MCHC یعنی کم شدن نسبت وزن به حجم یا به عبارت دیگر با توجه به ظرف حجمی گلبول‌های قرمز که گنجایش بیشتری برای هموگلوبین داشته‌اند به

عللی مانند فقر آهن به اندازه کافی از هموگلوبین علیرغم داشتن ظرفیت دریافت نکرده‌اند. افزایش MCHC به غیر از موارد اسفروسیتوز بندرت رخ می‌دهد و چنانچه در یک آزمایشگاه موارد متعدد افزایش این پارامتر مشاهده شود به احتمال زیاد خطای تکنیکی یا خطای نمونه از قبیل نمونه هیپرلیپمی، نمونه همولیز یا نمونه‌هایی که موجب افزایش کاذب هموگلوبین شده‌اند بایستی مدنظر قرار گیرند. افزایش MCHC ممکن است به علت خطای کاذب در کاهش اندازه‌گیری هماتوکریت باشد.

در آزمایشگاههایی که با روش دستی کار می‌کنند یک اقتباس ساده از کنترل کیفی و شبیه به میانگین متحرک بول در قالب استفاده از MCHC قابل اجراست.

در این روش برای چند روز پی در پی (مثلاً برای ۱۵ روز) میانگین MCHC به صورت روزانه از نمونه‌ها گرفته می‌شود با توجه به داده‌های MCHC در این مدت میانگین کلی MCHC و انحراف معیار آن محاسبه می‌گردد. با توجه به میزان میانگین و انحراف معیار چارت کنترل کیفی در محدوده 2SD± طبق شکل زیر رسم می‌شود.



با در دست داشتن این چارت میانگین MCHC در پایان هر روز کاری محاسبه و بر روی گراف منتقل می‌شود. چنانچه جواب‌های روزانه در محدوده 2SD± قرار گیرند رضایت بخش است مشروط بر اینکه خطای همزمان جهت‌دار برای هموگلوبین و هماتوکریت رخ نداده باشد. در چارت ترسیم شده جواب‌هایی که خارج از محدوده 2SD- قرار دارند به علت کاهش

هموگلوبین یا افزایش هماتوکریت رخ داده است. این چارت به خطاهای اندازه‌گیری هموگلوبین و هماتوکریت به ویژه در ارتباط با وضعیت صحیح نمونه‌گیری حساس است.

همبستگی نتایج (Correlation Check)

این بدان مفهوم است که آیا یافته غیرمنتظره هر آزمون را می‌توان با توجه به شرایط بالینی بیمار یا در رابطه با آزمون‌های دیگر توجیه کرد یا خیر؟

برای مثال آیا افزایش شدید هموگلوبین در رابطه با پلی‌سیتمی یا کاهش آن در رابطه با کمبود آهن یا خون‌ریزی است؟ با کاهش پارامتر MCHC بایستی هیپوکروم بودن گلبول‌های قرمز روی گستره رنگ‌آمیزی شده را شاهد بود. با افزایش MCV می‌بایست ماکروسیتوز یا پدیده آگلوتیناسیون سرد را برای مثال مشاهده نمود. همچنین افزایش یا کاهش شمارش گلبول‌های سفید را می‌توان با برآورد شمارش از روی گستره محیطی تأیید کرد.

آیا افزایش شمارش پلاکت‌ها در بیمار ارتباطی به بیماری‌های التهابی دارد؟ آیا میکروسیتوز بسیار شدید یا گلبول‌های قرمز شکسته بجای پلاکت شمارش شده‌اند؟ آیا کاهش شمارش پلاکت با علائم پتشی و پورپورا همراه است؟ با ثبت داده‌های بیمار روی یک برگ و مقایسه نتایج دفعات مختلف ارسال نمونه به آزمایشگاه، یک سیستم کنترل کیفی بنا می‌شود که می‌توان رخداد یک انحراف چشمگیر را با مقایسه با میزان پایه در روزهای قبل را مورد آنالیز قرار داد.

این شیوه کار مخصوصاً برای حالاتی که خطای فاحش از قبیل اشتباه در نشانه‌گذاری (Labelling) نمونه، مخلوط نکردن کافی خون، حضور تکه‌های ریز لخته در خون یا خون مانده رخ داده باشد بسیار ارزشمند است. یک شیوه رسمی برای تست کردن جواب‌های غیرمنتظره به نام دلتاچک (delta check) است. پارامترهای خون در یک بیمار نبایستی از یک حد معقول با توجه به ضریب تغییرات آزمون (CV) و تغییرات فیزیولوژیک تغییر کند. با دستگاه‌های اتوماتیک این تفاوت‌ها عموماً نبایستی بیشتر از ۱۰ درصد برای هموگلوبین و

شمارش گلبول‌های قرمز و ۲۰ تا ۲۵ درصد برای شمارش گلبول‌های سفید و پلاکت‌ها باشد؛ البته با این پیش فرض که شرایط بالینی بیمار دچار تغییر فاحشی نشده‌اند.

کنترل کیفی خارجی (External Quality Control)

عبارت است از ارزیابی نتایج روی یک نمونه خاص که توسط آزمایشگاه‌های مختلف آزمایش می‌شود. ارزیابی کنترل کیفی خارجی توسط یک مرکز مستقل صورت گرفته و منظور آن مقایسه نتایج نمونه خاص تهیه شده مثل Hb خون کنترل در سطح استان یا کشور و حتی بین کشورهاست. اگر چنین نمونه‌ای در آزمایشگاه رفرانس تعیین مقدار شده باشد امکان بررسی صحت آزمایش‌های انجام شده توسط آزمایشگاه‌های مختلف را نیز فراهم می‌سازد.

اصول کار کنترل کیفی خارجی برای یک پارامتر مخصوص مثلاً بررسی نتایج مقدار هموگلوبین در استان به شرح زیر است:

۱ ـ نمونه‌های خون کنترل یکسان برای اندازه‌گیری Hb، به تعداد زیادی آزمایشگاه در سطح استان از طرف آزمایشگاه رفرانس مرکز ارسال می‌شود.

۲ ـ مقادیر اندازه هموگلوبین از طرف آزمایشگاهها به مرکز عودت داده می‌شود.

۳ ـ میانگین و انحراف معیار اندازه‌گیری هموگلوبین با استفاده از جواب‌های ارسالی محاسبه می‌شود.

۴ ـ آن دسته از نتایج اندازه‌گیری هموگلوبین که خارج از محدوده ±۳SD باشد حذف می‌شوند. و از ما بقی نتایج دو مرتبه میانگین سنجیده (وزین) (Weighted mean) و انحراف معیار سنجیده (Weighted SD) گرفته می‌شود.

۵ ـ با استفاده از رابطه زیر ایندکس انحراف برای هر نتیجه ارسالی محاسبه می‌شود.

$$\text{شاخص انحراف} = \frac{\text{میانگین سنجیده (وزین) ـ جواب آزمایشگاه}}{\text{انحراف معیار سنجیده}}$$

چنانچه میزان شاخص انحراف (Deviation Index) کمتر از ۰/۵ باشد نمره آزمایشگاه عالی

(excellent) و اگر ۱ ـ ۰/۵ باشد، رضایت بخش، و اگر ۲ ـ ۱ باشد هنوز قابل قبول و چنانچه بیش از ۲ باشد مبین وجود اشکال در کار آزمایشگاه است که به توجه و پی‌گیری نیاز دارد.

چنانچه انحراف معیار تحت شرایط مطلوب توسط آزمایشگاه‌های ماهر محاسبه گردد معمولاً کمتر از انحراف معیار نتایج شرکت‌کنندگان در برنامه کنترل کیفی خواهد بود.

داوری شیوه کار شرکت کنندگان با وسعت انحراف از روش محاسبه شده در شرایط فوق انجام می‌گیرد.

انحراف با یک SD دارای درجه عالی، بین ۲SD-۱ درجه رضایت بخش و بین ۳SD-۲ به عنوان اخطار با امکان حضور مشکل که به بررسی نیاز دارد و بیشتر از ۳SD بیانگر نقص کار و توجه فوری است.

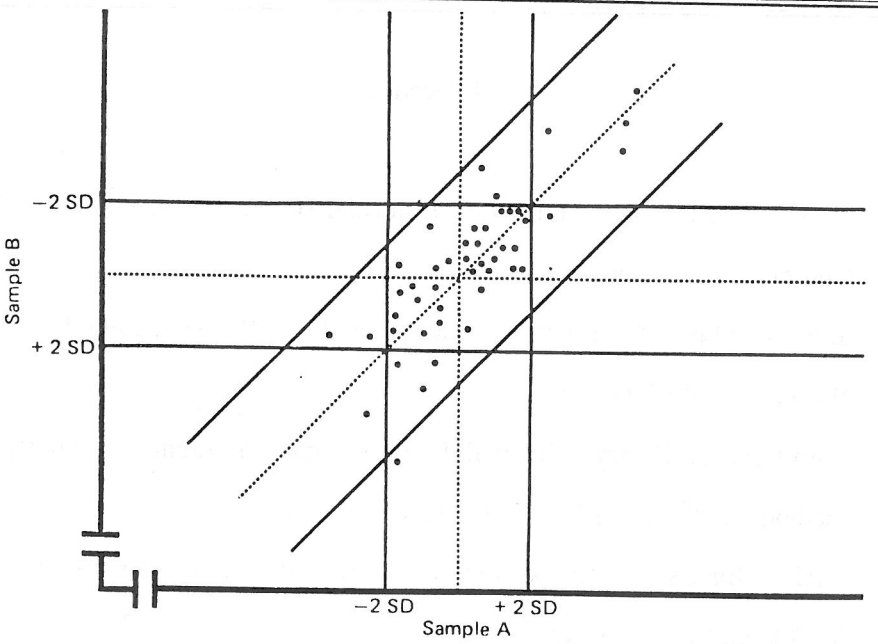
گفتنی است که برخی از دستگاههای شمارش‌گر سلولی حتی زمانی که درست کالیبره شده باشند. با خون فیکس شده کنترل شیوه عمل متفاوتی نسبت به خون تازه‌ای که روزانه به دستگاه داده می‌شود دارند. از اینرو ممکن است که آنالیز نتایج برای دستگاههای مختلف به طور جداگانه انجام شود. وقتی که اختلاف غیرقابل توجیهی در شمارش نمونه کنترل با دستگاههای مختلف وجود دارد، بایستی شمارش روی نمونه‌های تازه EDTAدار با دستگاه‌های مختلف انجام و سپس به مقایسه نتایج پرداخت.

گراف یودن (Youden Plot)

این روش مقایسه ممکن است وقتی که نمونه‌های دو کنترل با مقدار مختلف با یک روش مورد سنجش قرار گیرند یا هنگامی که نمونه‌های یک کنترل با دو روش مختلف مورد آزمایش قرار گیرد بکار گرفته شود. انحراف معیار برای هر کنترل یا برای هر روش محاسبه و گرافی رسم می‌شود که نشان‌دهنده میانگین و محدوده ۲SD± از نمونه A روی محور x و همچنین نشان‌دهنده میانگین و محدوده ۲SD± از نمونه B روی محور y باشد.

محورهای x و y می‌توانند بیانگر میانگین و محدوده ۲SD± از روش‌های A یا B باشند.

برای دست‌یابی به مقایسه نتایج در محدوده ۲SD± ممکن است گاهی به مقداری



گراف یودن دو نمونه‌ای

تنظیم اشل (Scale) احتیاج باشد. پخش نرمال یافته‌های A و B روی خطی که دو زاویه روبرو را بهم وصل می‌کند (خط دیاگونال diagonol line) قرار می‌گیرند. نقاط خارج از این خط هر چند درون مربع باشند بیانگر از دست دادن دقت و نقاط خارج از مربع بیانگر عدم صحت و خارج شدن از محدوده کنترل است. اگر نقطه‌ها در مرحله ترتیب آزمایش آنها شناسایی گردند، هر گونه تمایل سیستمیک که موجب رانده شدن به سوی از دست دادن کنترل شود قابل تشخیص خواهد بود.