عنوان دوره آموزشی

محاسبات شیمیایی و کنترل کیفیت در بخش بیوشیمی

بهار ۱۴۰۰

بسم الله الرحمن الرحيم

فهرست

اصول صحیح کنترل کیفی ۴

کنترل کیفیت آماری: ۵

اتوآنالایزر در آزمایشگاه بیوشیمی ۶

انواع اتوآنالایزر ۶

نکات مهم در مورد استفاده از اتوآنالایزر بیوشیمی ۷

نگهدای و کنترل کیفیت اتوآنالیزر ۷

سنجش عملکرد پروبها: ۸

دمای انکوباتور: ۸

انتقال ناخواسته *(Carry Over)*: ۸

کنترل کیفیت آماری ۱۰

انتخاب مواد کنترلی ۱۰

روشهای تعیین مقادیر خطای مجاز: ۱۴

نمودار کنترلی ۱۶

اقدامات اصلاحی ۳۰

خطای راندوم ۳۱

خطای سیستماتیک ۳۲

Cumulative Sum (Cusum) Control chart چارت کنترل تجمعی ۳۲

روشهای مختلف برای اجرای و تفسیر چارت *Cusum* : ۳۲

کنترل کیفیت بر اساس نتایج آزمایش بیماران ۳۶

نتایج هر بیمار بطور انفرادی ۳۶

هماهنگی با علائم بالینی ۳۶

هماهنگی با سایر نتایج آزمایشگاهی ۳۷

آزمایشهای مضاعف *(duplicate)* در آزمایشگاه ۳۷

دلتا چک با نتایج قبلی ۳۷

Limit checks ۳۸

بررسی هماهنگی نتایج آزمایشگاه با تشخیص نهایی ۳۹

تفسیر نتایج برنامه کنترل کیفی خارجی ۳۹

مراحل کار تفسیر نتایج EQA : ۴۲

منابع ۴۵

اصول صحیح کنترل کیفی

هدف از درخواست آزمایش توسط پزشک برای بیمار، بررسی وضعیت پاتوفیزیولوژیک وی به منظور تشخیص علت بیماری و پیگیری درمان وی می باشد. نتایج آزمایش وقتی میتواند به پزشک در این موارد کمک نماید که خطا در انجام آزمایشات وجود نداشته و یا به حداقل رسیده باشد و یا تاثیر این خطاهای احتمالی بر نتیجه نهایی ناچیز بوده و پاسخ آزمایش تنها نشان دهنده وضعیت بیولوژیک بیمار باشد. برای رسیدن به نتیجه درست و قابل قبول و به حداقل رسانیدن خطاهای آزمایشگاه، یک و روش صحیح برای برنامه تضمین کیفیت ضروری است. تضمین کیفیت طیف وسیعی از فعالیت ها را در بر می گیرد که اجرای آنها در یک قالب منسجم برای رسیدن آزمایشگاه به کیفیت مطلوب لازم می باشد.

عوامل بسیاری عملکرد آزمایشگاه را تحت تاثیر قرار میدهند که برخی از آنها عبارتند از:

- تغییرات بیولوژیک / فیزیولوژیک در بدن فرد
- مواد مداخله گر مثل داروها
- متغییرهای پیش از انجام آزمایش (Preanalytic) مانند جمع آوری، انتقال، آماده سازی و نگهداری نمونه ها
- متغیرهای حین انجام آزمایش (Analytic)
- متغییرهای پس از انجام آزمایش (Postanalytic)

تمامی این فعالیتها بایستی طوری انجام شود که سه بخش پیش از انجام آزمایش (Preanalytic) و حین انجام آزمایش (Analytic) و پس از انجام آزمایش (Postanalytic) را شامل گردد.

بسیاری از مشکلات مهمی که در آزمایشگاه ها رخ میدهد در بخش پیش از انجام آزمایش (Preanalytic) ایجاد میشود که مثالهایی از آن عبارتند از: درخواست آزمایش نامناسب، آماده نبودن بیمار برای انجام آزمایش، (عدم رعایت رژیم غذایی خاص، فعالیت بدنی زیاد یا کم، مصرف داروها و ...) ، رعایت نکردن دستورهای لازم برای آزمایش (مانند مواردی که در مورد جمع آوری نمونه ادرار ۲۴ ساعته یا آزمایش خون مخفی در مدفوع به بیمار توصیه میشود)، نمونه گیری

ناصحیح (ظرف یا نگهدارنه نامناسب، آلودگی در زمان نمونه گیری، بستن تورنیکه به مدت طولانی، اندازه سوزن، شرایط خوابیده و ایستاده و ...)، برچسب گذاری غلط، آماده سازی و نگهداری نامناسب

(سانتریفیوژ یا دمای نامناسب نگهداری و...)

معیارهای اصلی کنترل کیفی در آزمایشگاه : شامل ۴ بخش می باشد:

۱) کنترل پرسنل

۲) کنترل معرفها، کیتها و مواد مصرفی

۳) کنترل دستگاه ها و وسائل

۴) کنترل روش کار (SOP)

کنترل کیفیت آماری:

در کنترل کیفیت آماری ، نمونه کنترلی (به عنوان نماینده یک گروه از نمونه های بیماران) مورد آزمایش قرار گرفته و نتایج آن با مقدار مورد انتظار که اغلب به صورت یک محدوده تعریف شده ، مقایسه می گردد.

اگر نتیجه آزمایش نمونه کنترلی در محدوده مورد انتظار قرار بگیرد، نتایج بیماران قابل قبول شناخته میشوند.

برعکس اگر نتیجه نمونه کنترلی خارج از محدوده مورد انتظار قرائت شود، احتمال وجود خطا در سیستم آزمایش مطرح شده و طبیعتاً نتایج بیماران نیز غیر قابل قبول شناخته می شوند.

برای اینکه از بروز اینگونه خطاها جلوگیری نماییم بایستی دستورالعمل های پذیرش، نمونه گیری، انتقال و نگهداری نمونه به تفکیک نوع آزمایش (یا گروهی از آزمایشها که شرایط مشابهی دارند) تهیه و در ضمن اینکه به کارکنان آموزش داده می شود در اختیار آنها نیز قرار گیرد. ثبت غلط نتیجه آزمایش در برگه های جوابدهی و جابجایی نتایج از خطاهایی هستند

که در بخش پس از انجام آزمایش (Postanalytic) رخ می دهند و با آموزش کارکنان و کنترل نتایج به حداقل رسانیده می شود.

خطاهایی که در قسمت حین انجام آزمایش (analytic) صورت می گیرد مواردی مانند کالیبراسیون نامناسب سیستم، اشکال در روش آزمایشگاهی مورد استفاده و ... می باشد. موضوع اصلی که در این دستورالعمل ها مورد توجه قرار می گیرد روشهای شناسایی و نحوه برخورد با این خطاها می باشد.

گام نخست برای اینکه از تجهیزات آزمایشگاه به نحو احسن استفاده نماییم، مطالعه کاتالوگ ها و انجام دستورالعمل های نگهداری و کنترل کیفیت مندرج در آن می باشد و مطالبی که در ذیل آورده میشود جنبه عمومی داشته و به هیچ عنوان جایگزین دستورالعمل سازنده آن تجهیز نمی شود .

اتوآنالایزر در آزمایشگاه بیوشیمی

اتوآنالایزر در بیوشیمی بالینی ابزارهایی هستند که در بررسی بیوشیمیایی کمیت ها را با حداقل دخالت اپراتور انجام می دهد.

انواع اتوآنالایزر

اتوآنالایزر بر اساس ماهیت معرف مورد استفاده به اتوآنالایزرهای با معرف مایع و بدون معرف مایع مانند سیستمهای Kodak Ektachem, Vitros, Opus, تقسیم بندی می شوند. سیستمهای با معرف مایع در ایران رایج تر بوده و به همین علت در این بسته آموزشی مورد بحث قرار گرفته اند.

ساختمان کلی اتوآنالایزرهای با معرف مایع، شامل قسمت های زیر می باشد:

منبع نوری، مونوکروماتور، محفظه کووت، انکوباتور برای ایجاد دمای مناسب واکنش، بازوی مکنده معرف ، بازوی مکنده نمونه Sample/Reagent Prob ، دتکتور و واحد اطلاعات و پردازش این اطلاعات.

این اتوآنالایزرها بر اساس روش انتقال نمونه به دو دسته Continuous flow و Discrete Analyzer تقسیم میشوند.

در اتوآنالایزر خودکار Continuous flow نمونه از طریق بازوی مکنده نمونه (Sample Probe) به جریان مداوم معرف وارد میشود ولی در سیستم های Discrete Analyzer نمونه توسط Probe به محفظه واکنش خاص انتقال می یابد.

نکات مهم در مورد استفاده از اتوآنالایزر بیوشیمی

- ✓ آشنایی کامل با دستگاه قبل از شروع به کار
- ✓ ایجاد شرایط الزامی برای عملکرد صحیح دسته بهطور مثال برق مناسب و یا آب با خلوص خاص.
- ✓ استفاده از دستورالعمل اختصاصی ارائه شده توسط سازنده کیت برای دستگاه مورد نظر
- ✓ عدم استفاده از کنترل به جای کالیبراتور در عمل کالیبراسیون، در کالیبراسیون کمیت ها باید به غلظت مناسب کالیبراتور نیز توجه داشت به طور مثال برای کالیبراسیون HDL بایستی از کالیبراتور مخصوص همین کیت استفاده نمود، نه از کالیبراتور کلسترول توتال.
- ✓ استفاده از کالیبراتور و کنترل های مورد توصیه سازنده کیت یا استفاده از کالیبراتور و کنترل های هماهنگ.
- ✓ عدم تغییر فاکتور اعلام شده سازنده کیت برای آنزیم، این عمل که ممکن است به منظور تصحیح کنترل قرائت شده صورت گیرد مشکلات احتمالی از قبیل عدم کفایت، ناپایداری معرف و امکان تداخل زمینه سرم کنترل با معرف و یا اشکال در دمای انکوباتور سیستم را پوشانیده و مانع یافتن خطای واقعی می گردد.

نگهدای و کنترل کیفیت اتوآنالیزر

برای حفظ کیفیت عملکرد اتوآنالیزر لازم است کلیه موارد یاد شده در دستورالعمل همراه جهت نگهداری و سرویس دستگاه رعایت شود .

برای سرویس کالیبراسیون سیستم، برنامه زمانبندی شده تهیه و سوابق مکتوب انجام آن نگهداری شود.

برای بررسی عملکرد دستگاه بعد از هر سرویس و کالیبراسیون انجام تستهای زیر توصیه می شود.

سنجش عملکرد پروبها:

تستهایی انجام می شود که برای انجام آنها کمترین و بیشترین حجم نمونه لازم باشد (مانند تست پروتئین در سیستمهای RA) سپس یک نمونه کنترل ۳۰ بار مورد اندازه گیری پروتئین قرار می گیرد و پراکندگی نتایج حاصل بر حسب CV% نباید بیش از مقدار خطای مجاز ادعا شده توسط سازنده کیت باشد.

دمای انکوباتور:

برای بررسی پایداری دمای انکوباتور دستگاه تستی انجام می گیرد که به تغییرات دما حساس است مثل اندازه گیری تست ALT . سپس یک نمونه کنترل ۳۰ بار مورد اندازه گیری ALT قرار می گیرد و پرکندگی نتایج حاصل بر حسب CV% نباید بیش از مقدار خطای مجاز ادعا شده توسط سازنده کیت باشد.

انتقال ناخواسته *(Carry Over)*:

در دستگاه اتوآنالایزور ممکن است نمونه یا معرف بطور ناخواسته انتقال یابند.

برای بررسی انتقال ناخواسته معرف بایستی از دو تستی که NADH را اندازه گیری می کنند استفاده نمود .

به طور مثال LDH و ALT که یکی افزایش و دیگری کاهش NADH را اندازه گیری میکند.

بدین ترتیب که بر روی یک نمونه کنترل در یک سری کار و به ترتیب زیر ،۳۰ بار آزمایش LDH و ۱۰ بارALT انجام میشود.

LDH	ALT
LDH	-
LDH	-
LDH	ALT
LDH	-
LDH	-
LDH	ALT
LDH	-

میزان پراکندگی نتایج اندازه گیری LDH بر حسب CV اندازه گیری می شود .

سپس در یک سری کاری ۳۰ بار LDH به تنهایی (بدون همراهی با ALT) اندازه گیری و میزان پراکندگی نتایج اندازه گیری LDH بر حسب CV محاسبه می شود.

CV% در در حالت اول (آزمایش LDH و ALT) باید معادل یا کمتر از حالت دوم (اندازه گیری LDH به تنهایی) باشد.

انتقال ناخواسته نمونه با انجام آزمایش بر روی نمونه های با غلظت بالا و پایین کمیت های انتخابی، به‌طورمتوالی بررسی می شود. به طور مثال گلوکز با غلظتهای ۵۰ و ۵۰۰ میلیگرم درصد و یا ALT در غلظت های بالا و پایین انتخاب شده به طور متناوب هر یک از نمونه های با غلظتهای پایین (L) و بالا (H) سه بار مورد آزمایش قرار می گیرد.

H-H-H-L-L-L-H-H-H-L-L-L-...

پراکندگی نتایج غلظتهای پایین مورد محاسبه قرار می گیرد.

سپس در یکسری کاری مجزا، نمونه با غلظت پایین به تنهایی و به دفعات اندازه گیری و میزان پراکندگی نتایج حاصله بر حسب CV% محاسبه میشود .

پراکندگی نتایج حاصله بر حسب CV% در حالت اول نباید بیش از پراکندگی حاصله از تکرار همین نمونه به تنهایی و در سری کاری مجزا باشد. در غیر اینصورت تداخل در برداشت نمونه وجود داشته است.

اجرای برنامه کنترل داخلی کیفیت Internal Qualit Control برای کلیه کمیت هایی که اندازه گیری می شود با دستگاه جهت بررسی قابلیت تکرار و عضویت در برنامه ارزیابی خارجی کیفیت EQAS جهت بررسی صحت عملکرد دستگاه اتوآنالیزر الزامی می باشد.

کنترل متغییرها در مرحله انجام آزمایش

متغییرهای مرحله انجام آزمایش را می توان به دو روش تحت کنترل قرار داد.

- استفاده از نمونه کنترل و تعمیم نتایج آن به جواب آزمایشهای بیماران.
- استفاده از نتایج بیماران (دلتا چک، آزمایشهای مضاعف و...) .

کنترل کیفیت آماری

در کنترل کیفیت آماری نمونه کنترلی به عنوان نماینده ای از یک گروه از نمونه های بیماران مورد آزمایش قرار می گیرد و نتایج آن با مقادیر مورد انتظار که اغلب به صورت یک محدوده بیان می گردد، مقایسه می گردد. اگر نتایج آزمایش نمونه کنترل در این محدوده باشد نتایج آزمایش های بیماران نیز قابل قبول می باشد ولی اگر نتیجه نمونه کنترلی در این محدوده قرار نگیرد جواب های بیماران نیز مورد اعتماد نبوده و این نتایج هم قابل قبول نیست.

انتخاب مواد کنترلی

در انتخاب مواد کنترلی بایستی موارد زیر مورد توجه قرار گیرد.

- پایداری: بایستی این مواد برای مدت طولانی پایداری داشته باشند و در عین حال فاقد مواد نگهدارنده مداخله کننده باشد. این ویژگی به آزمایشگاه اجازه می دهد تا مواد کنترلی مورد نیاز خود را برای مدت مشخص، یکجا تهیه نماید (بهتر است مواد کنترلی برای مصرف یکسال، خریداری شود.)
- مشابهت با نمونه انسانی مورد آزمایش: بهتر است کنترل با توجه به نمونه انسانی مورد آزمایش انتخاب شود. به عنوان مثال کنترلهای با پایه سرم، ادرار، خون ،CSF و... .
- عدم وجود اثرات زمینهای(Matrix effect): برای انتخاب سرم کنترل باید همخوانی آن با معرفهای مورد آزمایش در نظر گرفته شود و از عدم وجود اثرات زمینهای اطمینان حاصل شده باشد.
- یکنواختی: ویالهای مختلف کنترل بایستی هموژن بوده و غلظت متغییرهای موجود در آنها یکسان باشد.
- بسته بندی مناسب: ویال بدون نشتی بوده و به حجم رسانیدن و نگهداری کنترل با سهولت انجام شود .
- قیمت ارزن و تعداد زیاد مصرف کنندگان.
- فاقد عامل بیماریزا: مثل باکتری، قارچ، ویروس و پریون.

برای استفاده هم میتوان از کنترلهای لیوفیلیزه و هم میتوان از کنترلهای مایع استفاده نمود. ولی وقتی میخواهیم یکی از آنها را انتخاب نماییم بایستی معایب و مزایای هر کدام را در نظر داشته باشیم. بهطور مثال خطا در به حجم رسانیدن کنترل های لیوفیلیزه ممکن است منجر به بروز مشکلاتی شود درحالیکه کنترلهای مایع آماده مصرف هستند. در عین حال موادی که در کنترل های مایع وجود دارند ممکن است در برخی روشها تداخل نموده و باعث خطا شود.

برای کنترل داخلی کیفیت، بهتر است حداالامکان دو غلظت مختلف از کنترل استفاده شود. انتخاب غلظت-های نزدیک به محدوده تصمیم گیری بالینی (Decision level) ارجح میباشد. مانند غلظت ۱۲۶ و ۲۰۰ میلیگرم در دسیلیتر برای گلوکز. برخی پیشنهاد می نمایند غلظت کنترلها طوری انتخاب شود که محدوده قابل گزارش در روش آزمایشگاهی (Reportable range) را پوشش دهد. برای مثال اگر سازنده ادعا کرده است که محدوده گزارشدهی کیت اندازه گیری گلوکز ۳۰ تا ۴۰۰ میلیگرم در دسیلیتر است میتوان کنترلهایی با غلظت تقریبی ۴۰ و ۳۸۰ میلیگرم در دسیلیتر را انتخاب نمود.

مواد کنترلی به دو شکل دارای مقادیر مشخص(assayed) و فاقد مقادیر مشخص(unassayed) موجود است و هر دو نوع آنها را میتوان در بررسی دقت(Precision) استفاد نمود.

نکته۱: مواد کنترلها را نمی توان به عنوان کالیبراتور استفاده شود. کالیبراتور مادهای است که برای کالیبراسیون روشهای آزمایشگاهی به کار می رود و دارای مقدار مشخصی است درحالی که مواد کنترلی برای کنترل کیفیت روشهای آزمایشگاهی به کار می رود و اغلب دارای محدوده غلظتی می باشد

نکته۲: در خرید کالیبراتور و مواد کنترلی به هم خوانی معرف با کالیبراتور و کنترل تجاری توجه داشته باشید. این موضوع را می توانید از شرکت پشتیبان کیت و معرف استعلام نمایید.

نکته۳: برای به حجم رسانیدن مواد کنترلی لیوفیلیزه از وسایل حجمی مناسب و طبق دستور سازنده استفاده کنید.

روش تهیه سرم کنترل (Pooled serum) در آزمایشگاه بیوشیمی

۱) سرم های اهدا کنندگانی را که ایکتریک، سپتیک و همولیز نبوده و آزمایشات HCV Ab و HBS Ag و HIV Ab انها منفی باشد در پایان هر روز در ظرف پلاستیکی استریل جمع آوری و در فریزر نگهداری می کنیم

۲) سرم های ذخیره شده روزانه را تا رسیدن به حجم مورد نظر را جمع آوری می کنیم. ایده ال ترین حجم برای نیاز یک سال و حداقل حجم برای نیاز ۶ ماه جمع آوری شود. به طور متوسط روزانه ۵.۲ میلی لیتر سرم کنترل برای بخش های مختلف آزمایشگاه مورد نیاز می باشد. این حجم برای یک هفته ۸۵ میلی لیتر، برای هر ماه ۶۶ میلی لیتر، برای شش ماه ۳۶۶ میلی لیتر و برای یک سال ۹۲۶ میلی لیتر می باشد.

۳) بعد از جمع اوری مقدار سرم مورد نظر سرم ها را از فریزر خارج و در دمای اتاق ذوب میکنیم و سپس سانتریفیوژ کرده و از صافی عبور می دهیم.

۴) سرم ها را خوب مخلوط کرده و حجم ان را مشخص کرده و مجددا به فریزر منتقل میکنیم. انجماد به مدت یک ماه در ۲۶- درجه انجام می شود.

۵) سرم پولد شده را از فریزر خارج کرده و در دمای اتاق ذوب می کنیم. در این مرحله سرم باید کاملا بی حرکت روی میز آزمایشگاه قرار بگیرد.

۶) ٪۸۵ از حجم روی سرم را برداشته (بدون اینکه تکان بدهیم یا مخلوط کنیم) و آن را دور می ریزیم و به جای حجم دور ریخته شده به همان حجم اتیلن گلیکول اضافه می کنیم.

۷) سرم را خوب مخلوط کرده و میتوان با اندازه گیری برخی پارامتر ها و افزودن مقادیر دلخواه تغییراتی را در غلظت برخی از آنالیت ها در آن ایجاد کرد.

خطای مجاز

تعیین خطای مجاز برای اجرای فرایند کنترل داخلی کیفیت در بخش آنالیتیک اولین قدم می باشد. با وجود تمامی تلاشها، وجود خطا در آزمایشگاه ها اجتناب ناپذیر می باشد. به طوریکه اگر در یک آزمایشگاه، یک کارشناس ،آزمایش ثابتی را با دستگاه و معرف مشخص بر روی نمونه واحد، به دفعات انجام دهد، اخذ نتایج مشابه و یکسان در تمامی موارد بعید به نظر می رسد. پس مسئول آزمایشگاه می بایست با در نظر گرفتن مجموع شرایط آزمایشگاه (نوع دستگاه یا معرف مورد استفاده ، تجربه کارکنان و ...) و نیز با توجه به سطح کیفیت مورد نیاز خود، میزان عدم دقت (بر حسب CV% یا SD) و عدم صحت (برحسب Bias یا Bias%) و یا در مجموع خطای کلی مجاز

خود را مشخص نماید.

به عنوان مثال عدم دقت مجاز برای کلسترول و برحسب CV% معادل ۲٪ در نظر گرفته شود، میزان پراکندگی نتایج برای غلظت ۲۰۰ mg/dl به شکل زیر محاسبه میگردد.

$$CV\% = \frac{SD*100}{mean} \qquad 2\% = \frac{SD*100}{200} \qquad SD = 4$$

از محاسبات بالا نتیجه میگیریم، به احتمال ۹۵٪ اگر کلسترول یک نمونه با غلظت واقعی ۲۰۰ mg/dl چند بار اندازه گیری شود، نتایج در محدوده ۲۰۰ ± ۸ mg/dl یعنی mean± ۲SD قرار خواهد گرفت.

خطای مجاز بایستی به صورت واقع بینانه و براساس شرایط آزمایشگاه طوری انتخاب شود که بتواند میزانی از خطا، که تشخیص و تصمیم گیری بالینی برای بیمار را تحت تاثیر قرار می دهد، شناسایی نماید و در عین حال آنقدر کوچک نباشد که باعث رد کاذب مکرر نتایج گردد.

به عنوان مثال اگر آزمایشگاهی میزان CV% مجاز خود را برای اندازه گیری گلوکز ۸٪ تعیین نماید و نمونه ای با غلظت واقعی ۱۲۶ mg/dl داشته باشد، در ۹۵٪ موارد احتمال دارد نتایجی در محدوده ۱۰۶ الی ۱۴۶ mg/dl ارائه دهد که این طیف غلظتی وسیع به طور واضح باعث اشتباه در تصمیم گیری پزشک خواهد شد. اگر این آزمایشگاه میزان CV% مجاز خود را برای اندازه گیری گلوکز به ۱٪ تغییر دهد، در غلظت ۱۲۶ mg/dl نتایجی بین ۱۲۳ الی۱۲۹ mg/dl خواهد داشت که اگرچه برای پزشک مطلوب است ولی باعث میشود سریهای کاری مکرراً و بهطور کاذب مردود (False rejection) شناخته شود. این موضوع خود باعث افزایش دفعات تکرار آزمایش ،صرف هزینه و خستگی کارکنان می گردد.

روشهای تعیین مقادیر خطای مجاز:

۱- استفاده از محدوده مرجع(Reference Interval): این فرضیه در سال ۱۹۶۳ توسط Tonks مطرح گردید. در این روش با استفاده از فرمول زیر میزان خطای کلی و CV محاسبه میگردد.

$$\text{Allowable error} = 2CV = \frac{1/4 \text{ reference interval}}{\text{Mean of interval}} \times 100$$

از آنجایی که محدوده مرجع تحت تاثیر عوامل مختلفی مثل گروه مورد بررسی، مشخصات روش آزمایشگاهی و غیره قرار دارد، این روش امروزه کمتر استفاده می شود.

۲- نظریه پزشکان: در اواسط دهه ۱۹۶۰ ، Barnett با نظر سنجی از پزشکان، خطای مجاز را تعیین نمود.

۳- شرایط موجود: در این روش از نتایج آزمون مهارت (Proficiency testing) و مقادیر عدم دقت و عدم صحت bias متدهای موجود برای تعیین خطای مجاز استفاده می شود.

در قوانین CLIA (Clinical Laboratory Improvments Amendments) با این روش مقادیر خطای مجاز برای حدود ۸۳ کمیت تعیین شده است.

٤ – نظریه افراد و گروههای کارشناسی: در مورد بعضی پارامترها، گروههای کارشناسی مقادیر CV و Bias مجاز را تعیین نمونند. مثال مشخص نمودن خطای مجاز HDL,TG,LDL,COL توسط National (NCEP)cholesterol education program میباشد. مقادیر حاصل از این روش برای تعداد محدودی از آزمایشها قابل دستیابی می باشد.

٥ – تغییرات بیولوژیکی: در این روش تغییرات یک پارامتر در مدت زمانی مشخص در بدن یک فرد و افراد مختلف اندازه گیری و بر اساس ضریب انحراف درون فردی within subject و بین افراد مختلف between subject مقادیر CV و Bias مجاز را تعیین می کند.

مقادیر خطای مجاز برای هر یک از پارامترها متفاوت بوده و آزمایشگاه بایستی قبل از اجرای کنترل کیفیت با استفاده از یکی از روش های فوق عدم صحت و عدم دقت مورد نیاز خودش را تعیین کند.

در جدول زیر عدم دقت مجاز برای لیپیدها بر حسب CV% نشان داده شده است.

Test	NCEP	Biologic variation
Chol	٣٪	٣٪
HDL	٤٪	٣,٦٪
LDL	٤٪	٤,٢٪
TG	٥٪	١٠,٥٪

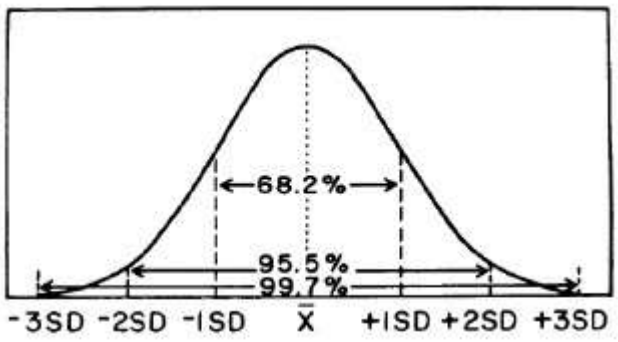
همانطور که در جدول نشان داده شده است حتی برای یک کمیت هم مقادیر خطای مجاز متفاوتی مطرح شده است. برای همین هر آزمایشگاه بایستی بر اساس نیازها و امکانات خود از آنها استفاده کند.

نمودار کنترلی

متداول ترین روش برای مقایسه نتایج آزمایش نمونههای کنترل استفاده از نمودارهای کنترلی می باشد. در نمودارهای کنترلی، غلظت بدست آمده از سرم کنترل روی نموداری با محدوده مشخص، علامت گذاری شده و بصورت تصویری و ساده نمایش داده می شود. اگر نتایج در داخل محدوده قرار داشته باشند، شرایط آزمایش تحت کنترل بوده و اطمینان داده می شود که سیستم درست کار می کند. ولی اگر نتایج در داخل محدوده قرار نگرفته باشد نشان دهنده مشکل دار بودن سیستم بوده و بایستی عملکرد سیستم بررسی شود.

برای محاسبه و به دست آوردن این محدوده ، نمونه کنترل بایستی به دفعات با این روش آزمایش، مورد بررسی قرار گیرد و سپس با استفاده از این اطلاعات میانگین و انحراف معیار محاسبه شده و توسط اطلاعات به دست آمده این محدوده تعیین می شود.

همانطوری که در شکل زیر مشاهده می شود، اگر یک نمونه به طور مکرر آزمایش شود ، توزیع نتایج به دست آمده به صورت نرمال (توزیع گوسین) خواهد بود .در توزیع های نرمال ۹۵٪ مقادیر در محدوده ۲SD ± و ۹۹/۷ ٪ مقادیر در محدوده ۳SD ± قرار می گیرند. سپس احتمال اینکه یک خوانده به طور اتفاقی خارج از محدوده ۲SD ± قرار گیرد حدود ۵٪ (۱ نتیجه بین ۲۰ خوانده) می باشد و در مورد محدوده ۳SD ± تنها ۰/۳٪ (۳ نتیجه بین ۱۰۰۰ خوانده) می باشد.



برای به دست آوردن نمودار کنترلی و محدوده مناسب می بایست تاثیر نتایج پرت(Outliers) را به حداقل ممکن برسانیم. زیرا وجود این خوانده های پرت باعث جابجایی شدید در مقدار میانگین می شود حتی اگر تعداد این خوانده

ها بسیار کم و حتی یک عدد باشد. برای اینکه این اثر نامطلوب را حذف نماییم نتایج خارج از محدوده mean±۳SD را حذف مینماییم

چون احتمال به دست آوردن یک نتیجه خارج از محدوده mean±۳SD فقط ۰/۰۰۳ (۳ نتیجه بین ۱۰۰۰ نتیجه) می باشد لذا حتی یک نتیجه پرت احتمال وجود مشکل را در پروسه مطرح می کند و اقدامات پیگیرانه را در این زمینه الزامی می کند.

اجرای کنترل داخلی کیفیت

۱) مشخص نمودن عدم دقت مجاز با توجه به شرایط آزمایشگاه بر حسب CV% .

۲) انتخاب نمونه کنترلی مناسب حتیالمکان در دو غلظت

۳) خوانش نمونه کنترلی به تعداد ۲۰ بار به یکی از طرق زیر:

- این تعداد خوانش بهتر است در مدت ۲۰ روز کاری و با تکرار آزمایش بدست آمده باشد (در مدت ۴ هفته).
- انجام آزمایش به صورت دوتایی در ۱۰ روزکاری
- در صورت عدم امکان روشهای فوق میتوان در ۵ روزکاری با ۴ بار تکرار در روز این مقادیر را به دست آورد.

محاسبه میانگین، انحراف معیار و ضریب انحراف بر اساس فرمولهای زیر

$$mean = \frac{\sum x_i}{n} \qquad SD = \sqrt{\frac{\sum (xi - mean)^2}{n-1}}$$

$$CV\% = \frac{SD * 100}{mean}$$

CV : ضریب انحراف (Coefficient of variation)

SD: انحراف معیار

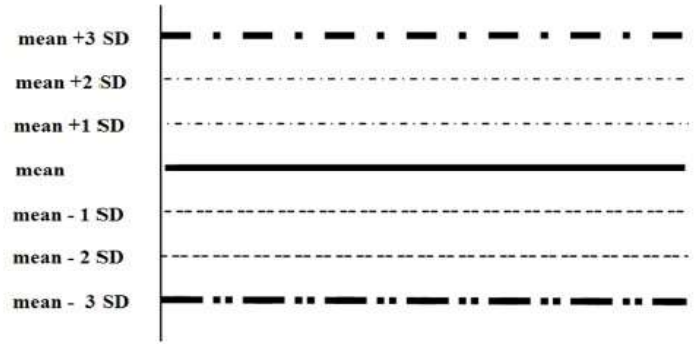
mean : میانگین

n : تعداد خواندهها

x_i: هر تک خوانده

۴) قابلیت تکرارپذیری (SD یا CV%) بدست آمده را با عدم دقت مجازی که قبلاً تعیین نموده اید، مقایسه نمایید. اگر نتایج در در محدوده خطای مجاز قرار داشت، کار را طبق بند ۶ ادامه داده می شود در غیر این صورت عامل ایجاد خطا بایستی شناسایی شده و پس از رفع مشکل، مجدداً مراحل ۱ تا ۴ اجرا خواهد شد در صورتیکه مشکل رفع نشد با تولیدکننده فراورده و یا دستگاه تماس گرفته میشود.

۵) برای هر غلظت از نمونه کنترلی با استفاده از میانگین و انحراف معیار ، چارت کنترلی مثل نمونه زیر رسم می شود.



۶) در هر سری کاری دو نمونه کنترلی در دو غلظت متفاوت آزمایش می شود و مقادیر آن در روی منحنی مربوطه علامت گذاری می شود.

بر طبق تعریف CLSI(NCCLS) سری کاری به مدت زمان یا تعداد نمونه ای گفته می شود که طی آن صحت و دقت سیستم اندازه گیری ثابت باشد.

تعداد دفعاتی که پارامترهای نمونه کنترل آزمایش می شود به عوامل مانند پایداری روش و سیستم مورد استفاده بستگی دارد. اگر یک سیستم برای مدت زمان مشخصی یا تعداد آزمایش معین پایدار است، در این فاصله یک بار آزمایش نمونه کنترلی کافی است.

نکته: برای ترسیم چارت کنترل کیفی نباید از محدودهای که در بروشور کیت ها نوشته شده استفاده نمود . این محدوده توسط آزمایش نمونه های کنترلی در آزمایشگاه های مختلف تهیه شده است و متغییر مختلفی مثل اختلاف دستگاه ها، شماره ساخت مختلف کیت و کالیبراتور روی آن تاثیر می گذارند. در نتیجه محدوده نوشته شده در کیتها بسیار بزرگتر از محدوده بدست آمده در یک آزمایشگاه می باشد. البته در شروع کار که هنوز تعداد نتایج حاصل از نمونه کنترلی کافی نیست، این محدوده قابل استفاده است. البته حتی در شروع کار هم فقط زمانی میتوان از محدوده نوشته شده در بروشور

کیت نمونه کنترلی استفاده نمود که کنترل با روش آزمایشگاهی مورد استفاده سازگار باشد و این موضوع را سازنده معرف یا دستگاه تایید کرده باشد.

بایستی توجه داشت که به کار بردن تعداد زیاد نمونه های کنترلی در هر سری کاری تاثیر مثبتی در روند کار ندارد بلکه باعث افزایش میزان رد کاذب و افزایش هزینه می گردد. لذا پیشنهاد می شود در هر سری کاری یک یا دو کنترل آزمایش شود.

مثال:

آزمایشگاهی برلی اندازه گیری کلسترول کیت جدیدی خریداری نموده و برای ترسیم چارت کنترل کیفیت CV% مجاز را بر اساس نظر NCEP ۳٪ انتخاب و دو سرم کنترل با غلظت های نزدیک به غلظت تصمیم گیری (Decision level) را طی ۵ روز کاری ،۲۰ بار آزمایش نموده است که نتایج آن به قرار زیر است.

	کنترل ۱			
روز اول	200	207	190	205
روز دوم	205	197	204	205
روز سوم	196	209	196	197
روز چهارم	202	200	204	196
روز پنجم	190	196	200	198

	کنترل ۲			
روز اول	247	263	261	257
روز دوم	250	251	254	258
روز سوم	255	260	239	256
روز چهارم	243	253	236	249
روز پنجم	254	244	250	257

میانگین و انحراف معیار را برای سهولت کار، کرد و CV% را بشرح زیر تعیین نموده است :

	mean (mg/dL)	SD(mg/dL)	CV%
کنترل ۱	200	5	2.5 %
کنترل ۲	252	7	2.8 %

چون CV% حاصله در محدوده خطای مجاز تعیین شده(۳٪) قرار دارد، میتوان چارت را ترسیم و نتایج کنترلها را روی آن مشخص نمود.

تفسیر نتایج

معیارها و قوانین مختلفی برای تفسیر نتایج چارت کنترل کیفیت توسط سازمانها یا کارشناسان وضع شده است که بر اساس آنها نتایج "تحت کنترل " یا "خارج از کنترل" در نظر گرفته می شود .Levey-Jenning ، وستگارد، WHO نمونه هایی هستند که در این مجموعه مورد بحث قرار خواهند گرفت.

انتخاب هر کدام از این قوانین توسط آزمایشگاه اختیاری می باشد.

چارت کنترلی Levey-Jenning

چارتهای کنترلی برای اولین بار در سال ۱۵۵۳ توسط Levey و Jenning به آزمایشگاه ها معرفی گردید. آنها نشان دادند که روشهایی که توسط Shewhart برای استفاده در صنعت مطرح شده بود، میتواند در آزمایشگاه ها نیز مفید باشد.

مراحل ترسیم و استفاده از چارت *Levey-Jenning*

۱) بعد از آزمایش نمونه های کنترلی حداقل به تعداد ۲۰ بار میانگین و انحراف معیار را محاسبه کنید (مطابق مراحل ۱ تا ۵ در بخش اجرای کنترل داخلی کیفیت) .

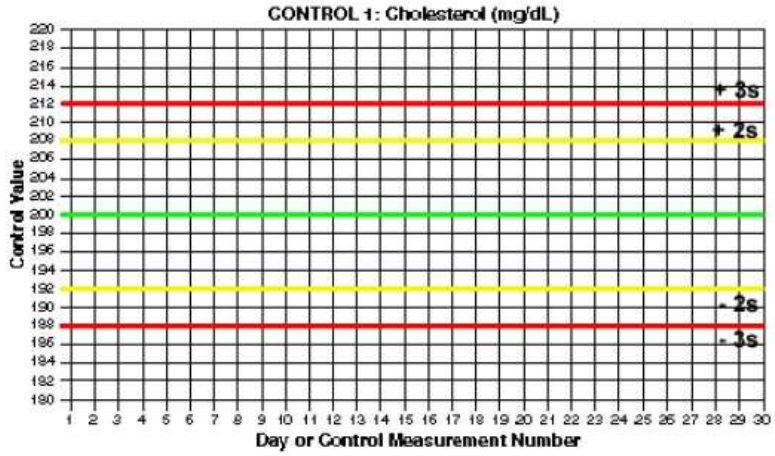
۲) به طور دستی یا نرم افزار یک چارت کنترل کیفی رسم نمایید بهطوری که محور yها مقادیر نمونه کنترلی بوده و محدوده mean± ۴SD را دربرگیرد.

۳) اگر تعداد کنترل هایی که در سری کاری استفاده می شود ۲ یا بیشتر باشد محدوده mean± ۳SD را به عنوان محدوده قابل قبول انتخاب نمایید اما اگر در سری کاری فقط یک نمونه آزمایش میشود محدوده mean± ۲SD را ملاک قرار دهید.

۴) میانگین و محدوده مورد قبول خود را به صورت خطوط افقی ترسیم نموده و خطوط عمودی را زمان انجام آزمایش در نظر بگیرید. در هر سری کاری کنترل ها را آزمایش نموده و نتایج را روی چارت علامت گذاری نمایید.

۵) تا زمانیکه نتایج مورد انتظار mean± ۳SD یا mean± ۲SD (با توجه به محدوده انتخاب شده) قرارداشته باشند، نتایج تحت کنترل بوده و اگر نتایج از این محدوده خارج شد نتایج خارج از کنترل در نظرگرفته می شود.

مثال چارت کنترلی Levey-Jenning در مورد کلسترول با میانگین ۲۰۰ و انحراف معیار ۴ میلیگرم در دسیلیتر



به علت اینکه استفاده از چارت Levey-Jenning ساده است در اکثر آزمایشگاه ها از این چارت استفاده می شود ولی استفاده از هر کدام از این محدودههای ۳SD ±mean یا ۲SD ±mean دارای معایبی می باشد اگر محدوده ۳SD ±mean انتخاب شود امکان تشخیص خطا کاهش می یابد. در حالیکه رد کاذب (False rejection) کمتر از ۵٪ است. اگر محدوده ۲SD ±mean انتخاب گردد، احتمال تشخیص خطا افزایش یافته ولی میزان رد کاذب (False rejection) افزایش می یابد.

با افزایش تعداد کنترل ها در هر سری کاری (n)، میزان رد کاذب افزایش می یابد. در صورت استفاده از یک کنترل (n=۱) رد کاذب ۵٪ است ولی این میزان برای دو کنترل (n=۲) به ۵٪ و برای ۴ کنترل (n=۴) به ۱۸٪ می رسد.

به عنوان مثال اگر آزمایشگاهی در هر سری کاری دو غلظت نمونه کنترلی را به صورت دوبل آزمایش نماید در واقع در هر سری کاری ۴ کنترل را آزمایش کرده و رد کاذب نتایج این آزمایشگاه به ۱۸٪ می رسد.

۲- تفسیر چارت کنترلی با قوانین چندگانه وستگارد

به منظور احتمال تشخیص خطا و کاهش دادن موارد رد کاذب نتایج، قوانین چندگانه توسط وستگارد و همکارانش مطرح گردید. این قوانین طوری طراحی شده است که ضمن حساس بودن به خطاهای تصادفی و سیستماتیک، میزان رد کاذب نتایج را به کمتر از ۳/۳۱ می رساند.

برای اینکه از این قوانین استفاده نماییم بایستی نمونه کنترلی را ۲۰ بار آزمایش نموده و میانگین و انحراف معیار را محاسبه کنیم (بر طبق مراحل ۱ تا ۵ اجرای کنترل داخلی کیفیت) سپس در هر سری کاری نمونه های کنترلی را آزمایش نمایید.

تا زمانیکه کنترلها در محدوده mean± ۲SD قرار دارند، نتایج بیماران قابل گزارش می باشد ولی به محض اینکه یکی از کنترلها از محدوده mean± ۲SD خارج گردید، کار را متوقف نموده و نتایج کنترل ها را از نظر وجود یکی از این قوانین مورد بررسی قرار دهید.

1_{2s} یک کنترل خارج از محدوده mean± ۲SD به معنی هشدار بوده و لازم است سایر قوانین بررسی گردند.

1_{3s} یک کنترل خارج از محدوده mean± ۲SD باعث رد نتایج شده و میتواند نشان دهنده خطای راندوم یا شروع خطای سیستماتیک باشد.

2_{2s} دو خوانده متوالی همسو و خارج از محدوده mean± ۲SD باعث رد نتایج شده و به خطای سیستماتیک حساس می باشد.

R_{4s} یک خوانده خارج از محدوده mean+ ۲SD و دیگری خارج از محدوده mean– ۲SD باعث رد نتایج شده و نشان دهنده خطای راندوم می باشد.

4_{1s} دو خوانده متوالی همسو و خارج از محدوده mean± ۱SD باعث رد نتایج شده و به خطای سیستماتیک حساس می باشد.

10_{x} ده خوانده متوالی در یک طرف میانگین (بالا یا پایین میانگین و بدون توجه به اندازه انحراف) باعث رد نتایج شده و به خطای سیستماتیک حساس می باشد.

لازم به توضیح است که قوانین چندگانه وستگارد بین سری های کاری مختلف و نیز بین دو غلظت نمونه کنترلی نیز قابل استفاده می باشد به طورمثال در مورد قانون 2_{2s} ممکن است یک خوانده در روز قبل و یک خوانده امروز، همسو و

خارج از محدوده mean+ ۲SD بوده و یا در یک سری کاری، یک خوانده در کنترل ۱ و خوانده دیگر در کنترل ۲ (نتایج هر دو کنترل) خارج از محدوده mean+ ۲SD قرائت گردند.

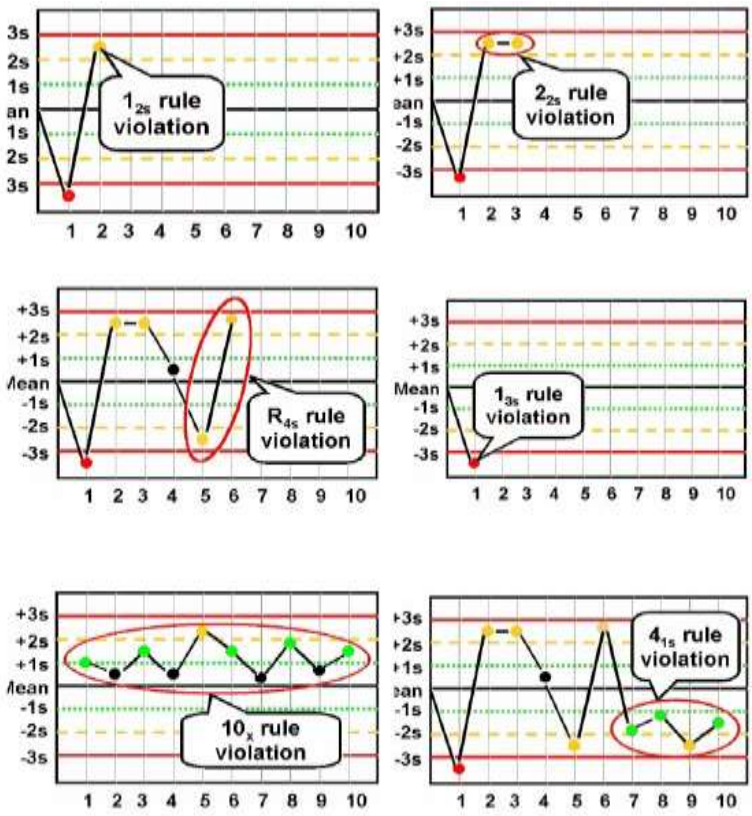
مورد استثنا قانون R_{4s} می باشد که باید در آن دو خوانده به دست آمده از یک سری کاری با یکدیگر ۴SD فاصله داشته باشند. اگر در دو سری کاری متفاوت، نتایج با هم ۴SD فاصله داشته باشند، در این مورد قانون R_{4s} کاربردی ندارد.

با توجه به پیشرفت های تجهیزات و نیز رایانه ای شدن بسیاری از برنامه ها، در قوانین وستگارد دو تغییر ایجاد شد. اول اینکه قانون 1_{2s} به عنوان هشدار حذف شد و پیشنهاد گردید قوانین ۱۰x و 4_{1s} حتی در شرایطی که نتایج در محدوده mean± ۲SD قرار دارند اعمال شود. این امر باعث شناسایی سریعتر خطا می شود ولی از طرف دیگر انجام آن در مواردی که چارت توسط روش دستی ترسیم شده است، بسیار مشکل است. همچنین با توجه به شرایط کنونی برخی آزمایشگاه ها، ممکن است استفاده و تفسیر به درستی انجام نشود و هزینه اجرای برنامه کنترل کیفی را بالا ببرد. برای همین هم توصیه شده است چنانچه چارت به روش دستی ترسیم شده است، مطابق با روش قبلی وستگارد ، قوانین وقتی بررسی شوند که حداقل یک نتیجه خارج از محدوده mean± ۲SD وجود داشته باشد.

تغییر دوم که در قوانین وستگارد ایجاد شده است این است که در صورت استفاده از ۳ یا ۶ کنترل در هر سری کاری (مضرب ۳) قوانین تفسیر قدری متفاوت می باشند.

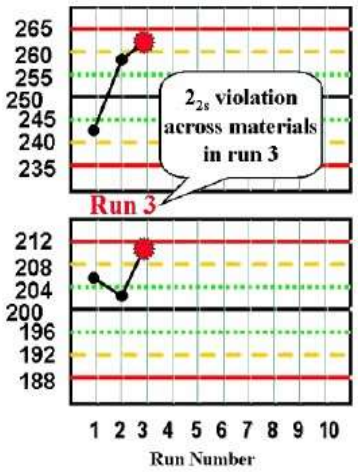
برای اینکه اطلاعات بیشتری در مورد این تغییرات به دست آورید میتوانید به سایت وستگارد مراجعه نمایید.

در نمودارهای زیر قوانین وستگارد با یک نمونه کنترلی در هر سری کاری نمایش داده شده است.



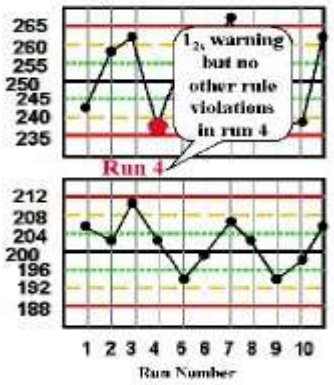
در چارتهای زیر قوانین وستگارد با دو نمونه کنترلی در هر سری کاری نمایش داده شده است.

در سری کاری سوم هر دو نمونه کنترلی خارج از محدوده mean± ۲SD هستند. پس براساس قانون ۲$_{2S}$ نتایج این سری کاری رد می شود و به احتمال زیاد یک خطای سیستماتیک در این محدوده غلظتی وجود دارد.

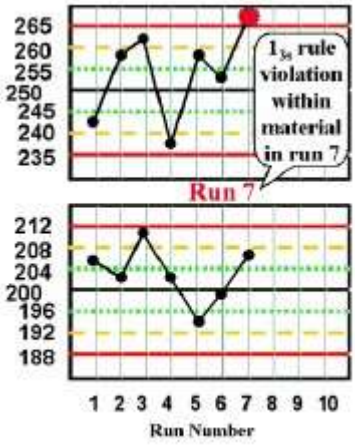


در سری کاری چهارم کنترل با غلظتهای بالا، خارج از محدوده 2SD– قرار گرفته است و احتمال خطا وجود دارد. از آنجایی که سری کاری قبلی (سری سوم) رد شده است فقط سری چهارم از نظر وجود قوانین 1_{3s} و

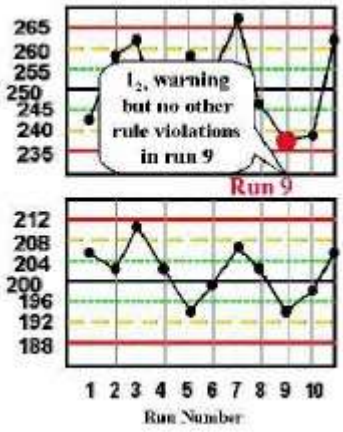
2_{2s} و R_{4s} بررسی می گردد. با توجه به به عدم وجود ۳ قانون نامبرده، این سری کاری قبول می شود ولی باید به هشدار توجه نمود.



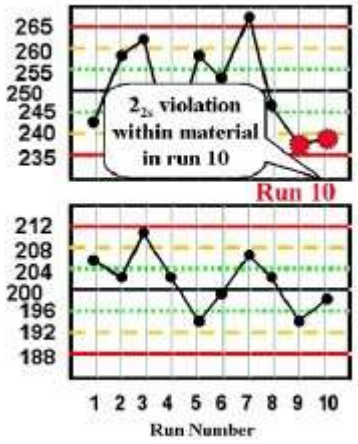
در سری کاری هفتم نتیجه کنترل با غلظت بالا خارج از محدوده ±3SD قرار گرفته که باعث رد این سری کاری می شود و به احتمال زیاد یک خطای راندوم وجود دارد.



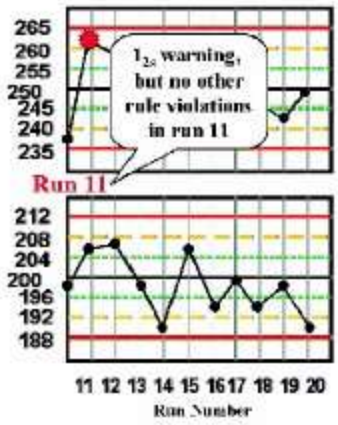
در سری کاری نهم کنترل با غلظت بالا خارج از محدوده 2SD– قرار گرفته است و احتمال خطا وجود دارد .چارت از نظر وجود قوانین 1_{3s} و 2_{2s} و R_{4s} بررسی میشود. با توجه به عدم وجود۳ قانون مذکور، این سری کاری قبول می شود ولی باید به هشدار توجه نمود.



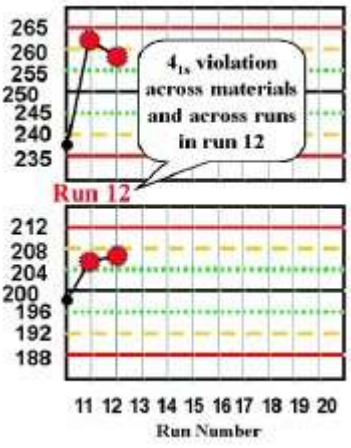
در سری کاری دهم در نمودار کنترل با غلظت بالا ، دو خوانده متوالی در دو سری کاری متوالی، خارج از محدوده ۲SD– قرار گرفته است که با توجه به قانون 2_{2s} باعث رد سری دهم می شود و به احتمال زیاد یک خطای سیستماتیک وجود دارد.



در سری کاری یازدهم کنترل با غلظت بالا ، خارج از محدوده ۲SD+ قرار دارد و احتمال خطا وجود دارد و بایستی نمودار را از نظر مطابقت با قوانین 1_{3s} و 2_{2s} و R_{4s} بررسی نمود. با توجه به عدم وجود ۳ مذکور، این سری کاری قبول می شود ولی باید به هشدار توجه نمود.

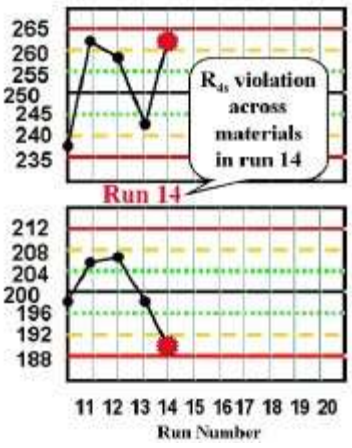


در سری کاری دوازدهم در نمودار هر دو کنترل، دو خوانده متوالی در دو سری کاری متوالی، خارج از محدوده ۱SD+ قرار گرفته با اعمال قانون در هر دو غلظت مشاهده می گردد که ۴ خوانده متوالی خارج از محدوده ۱SD+ وجود دارد. علیرغم وجود قانون 4_{1s} ، چون در سری کاری دوازدهم هیچ کدام از نتایج خارج از محدوده ۲SD± نبودند، سری کاری تایید می گردد اما باید احتمال وقوع یک خطای سیستماتیک را در نظر داشت.

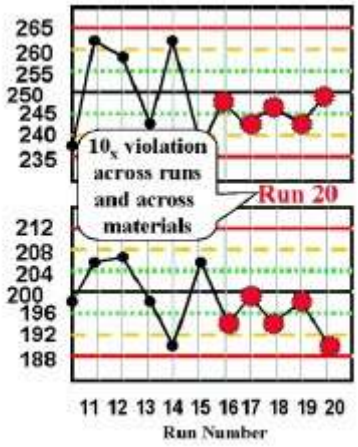


در سری کاری چهاردهم، کنترل با غلظت بالا، خارج از محدوده ۲SD+ و کنترل دیگر خارج از محدوده

۲SD قرار گرفته پس توسط قانون R_{4s} سری کاری رد می شود.



در سری کاری بیستم بررسی نتایج سری های کاری قبلی نشان می دهد که ۵ نتیجه در غلظت بالا و ۵ نتیجه در غلظت پایین در یک طرف میانگین قرار گرفته که با قانون ۱۰x باعث رد سری بیستم می گردد و به احتمال زیاد یک خطای راندم وجود دارد.



قوانین WHO

در مراجع رفرانس های مختلف که با موضوع تضمین کیفیت در آزمایشگاه توسط سازمان جهانی بهداشت چاپ گردیده است به روشهای مختلف تفسیر چارتهای کنترلی برخورد میکنیم که دو نمونه آن در ذیل آمده است.

- Basic Quality assurance for intermediate and peripheral Laboratories (۲۰۰۲)
- زمانیکه پراکندگی نتایج نزدیک به میانگین و در اطراف آن باشد، عملکرد سیستم قابل قبول است.

- وجود یک خوانده خارج از محدوده mean± ۲SD نشان دهنده این مطلب است که سیستم از کنترل خارج شده و برای شناسایی خطا بایستی اقدامات فوری انجام گیرد.
- هفت خوانده متوالی با سیر صعودی یا نزولی (حتی اگر از میانگین عبور کنند) نشانگر یک اتفاق تدریجی در سیستم میباشد که بایستی شناسایی و اصلاح گردد.
- پراکندگی زیاد نتایج در اطراف میانگین نشاندهنده دقت نامناسب اندازه گیری است که نیاز به اصلاح دارد.

Quality assurance in Hematology WHO/LAB/۱۹۹۸

یک خوانده خارج از محدوده mean$^{\pm}$ ۲SD	هشدار
یک خوانده خارج از محدوده mean$^{\pm}$ ۳SD	غیر قابل قبول (خطای سیستماتیک یا راندوم)
دو خوانده متوالی خارج از محدوده mean$^{\pm}$ ۲SD	غیر قابل قبول (خطای سیستماتیک)
یک خوانده متوالی خارج از محدوده ۱SD^{-} یا ۱SD+	غیر قابل قبول (خطای سیستماتیک)
شش خوانده متوالی در یک طرف میانگین	هشدار(خطای سیستماتیک)

هر آزمایشگاه میتواند بر اساس شرایط و سطح کیفیت مورد نیاز خود از هر یک از این روشهای تفسیر Levey-Jenning و Westgrad یا WHO را انتخاب کرده و استفاده نماید.

چارت های کنترل کیفی بصورت ماهانه بررسی شده و تمام مقادیر معتبر برای محاسبه میانگین و انحراف معیار ماه بعدی به کار می رود.

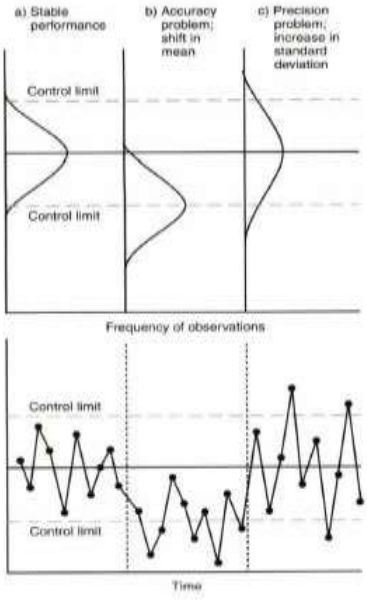
انواع خطا

در شرایط عادی با تکرار آزمایش انتظار می رود که نتایج در دو طرف میانگین، پخش شده و پراکندگی مناسب داشته باشند(a)

اگر نتایج بصورت ثابتی بیشتر یا کمتر از میانگین، قرائت شوند (b) خطای سیستماتیک رخ داده است که در نتیجه آن میانگین نتایج نیز تغییر می یابد.

اگر علیرغم ثابت ماندن میانگین، پراکندگی نتایج افزایش یابد، خطای راندم یا تصادفی اتفاق افتاده است .

این خطا با افزایش یافتن انحراف معیار مشخص شده و و منحنی به جای شکل زنگول های، نمای پهنی پیدا می کند.



اقدامات اصلاحی

بدون توجه به نوع روشی که برای تفسیر نتایج بکار می بریم ، برخورد با نتایجی که خارج از محدوده مورد انتظار هستند نشان دهنده این است که نتایج بیماران از کیفیت مناسبی برخوردار نیست و نباید گزارش شوند و قبل از هر چیزی بایستی مشکل را جستجو کرده و آنرا برطرف نماییم.

در بسیاری از رفرانس های علمی، اذعان شده است که در برخورد با نتایج خارج از محدوده مورد انتظار و احتمال خطا، عامل ایجاد کننده آنرا جستجو نموده و پس از رفع، اقدام به آزمایش مجدد کنترل نمود. با وجود این آزمایشگاه ها اولین کاری که انجام می دهند این است که یک کنترل تجاری را به حجم رسانیده و آزمایش با نمونه کنترلی را تکرار می نمایند. زیرا این احتمال وجود دارد که خطای موجود، در اثر مشکلاتی در خود کنترل تجاری ایجاد شده است مثل : افت غلظت، آلودگی، تبخیر یا مسائلی از این دست. در مراحل بعدی با توجه به نوع خطا

(راندوم یا سیستماتیک) سایر موارد ایجاد کننده خطا بررسی و جستجو میشود .

مثالهایی از عوامل ایجاد کننده خطا، در زیر آمده است.

خطای راندوم

- دمای ناپایدار
- نوسانات جریان الکتریکی دستگاه قرائت کننده
- وجود حباب هوا در زمان انتقال نمونه یا معرف
- عدم رعایت حجم برداشتی از نمونه یا معرف
- عدم رعایت زمان انکوباسیون
- ناپایداری معرف
- عدم رعایت شرایط نگهداری نمونه
- آلودگی ظروف شیشهای مورد استفاده ، نوک سمپلر و...
- آلودگی نمونه کنترلی، معرف و...

خطای سیستماتیک

- اشکال در کالیبراسیون مانند در نظر گرفتن مقادیر نادرست برای کالیبراتور، تهیه نامناسب، آلودگی، افت ،تغلیظ، تغییر شماره ساخت و...
- عوض کردن معرف بدون تغییر در کالیبراسیون
- تخریب تدریجی معرف
- عدم رعایت دستورالعمل سازنده برای تهیه معرف
- تغییر در دمای انکوباسیون
- خطای ثابت در وسایل انتقال دهنده نمونه یا معرف مانند سمپلر
- . . .

چارت کنترل تجمعی Cumulative Sum (Cusum) Control chart

Cusum روشی است که جمع جبری اختلاف نتایج آزمایش نمونه کنترلی را با میانگینی که در ابتدا تعیین شده است، بررسی می نماید و به خطای سیستماتیک حساس می باشد. در حالت عادی نتایج کنترل ها در اطراف میانگین (بالاتر و پایین تر) قرائت می شوند اما اگر نتایج سیر نزولی یا صعودی پیدا کنند، جمع جبری اختلافات نتایج با میانگین، افزایش یافته و احتمال بروز خطای سیستماتیک مطرح می گردد.

روشهای مختلف برای اجرای و تفسیر چارت $Cusum$:

۱. V-mask

۲. محدوده تصمیمگیری (decision limit)

چون روش محدوده تصمیم گیری ساده تر بوده و در کامپیوتر نیز قابل اجرا می باشد در اینجا در مورد این روش توضیح داده خواهد شد.

۱) کنترل را ۲۰ بار آزمایش نموده و میانگین و انحراف معیار آنرا محاسبه مینماییم (مطابق مراحل ۱ تا ۵ در بخش اجرای کنترل داخلی کیفیت).

۲) چارت کنترلی را رسم نموده و که در آن محور y نشان دهنده Cusum و خط مرکزی آن Cusum صفر باشد.

۳) برای تفسیر Cusum به روش محدوده تصمیم گیری باید دو محدوده را مشخص نمایید.

- K_1 و K_u که بطور معمول ۱SD ±mean در نظر گرفته میشود.
- h_1 و h_u که محدوده کنترل است و اغلب ۲,۷ SD ± برای آن در نظر گرفته می شود.

۴) در هر سری کاری یک نمونه کنترل آزمایش و نتیجه آن را با محدوده ۱SD±mean مقایسه کنید تا زمانی که نتیجه در این محدوده قرار داشته باشد Cusum را اجرا نکنید. در این مرحله علامت گذاری چارت انجام نمی شود.

۵) به محض اینکه کنترل از محدوده ۱SD ±mean خارج شد اختلاف نتیجه مشاهده شده را با (Kmean) -۱SD یا (K_u) mean+۱SD محاسبه نمایید (این اختلاف در مثال زیر d_i نشان داده شده است) .

Cusum در هر سری کاری از جمع جبری اختلاف جدید (d_i) با جمع جبری قبلی (Csi) بدست می آید .

عدد بدست آمده روی منحنی علامت گذاری می شود.

۶) Cusum بر اساس شیب منحنی پی گیری می شود تا وقتی که:

- جهت منحنی تغییر کند بدین معنی که علامت جمع جبری از مثبت به منفی یا برعکس از منفی به مثبت تغییر یابد، که در این جا شرایط تحت کنترل قرار گرفته است.
- مقدار جمع جبری از (h_1 ±۲,۷ SD) و hu بیشتر شود که در این شرایط از کنترل خارج شده است و Cusum تا زمانی که عوامل ایجاد کننده خطا شناسایی نشده اند متوقف می شود.

مثال:

آزمایشگاهی تری گلیسرید را در نمونه کنترلی اندازه گیری نموده و میانگین ۱۰۰ و انحراف معیار ۵ را بدست آورده است و مطابق موارد ذکر شده در بند ۳ محدودههای کاری خود را محاسبه نموده است.

K_l	mean – 1SD	100 – 5 = 95
K_u	mean+1SD	100 +5 = 105
h_l	-2.7SD	-2.7× 5 = - 13.5
h_u	+2.7SD	+2.7× 5 = + 13.5

سپس در هر سری کاری، نمونه کنترل را آزمایش و نتایج را در جدول زیر درج نموده است. اختلاف هر روز با K_l و K_u بصورت d_i و جمع جبری با (Csi) نمایش داده شده است.

Example Cusum Calculations and Tabular Record for Decision Limit Cusum (for Control Material with $\bar{x} = 100$, $s = 5.0$; for Control Chart with $k_u = 105$, $k_l = 95$, $h_u = 13.5$, $h_l = 13.5$)

Control Observation Number	Control Value	d_i	CS_i	Comment
1	110	+5	+5	Start cusum calculation
2	100	−5	0	
3	108	+3	+3	
4	105	0	+3	
5	105	0	+3	
6	101	−4	−1	End cusum calculation
7	96			
8	105			
9	101			
10	101			
11	111	+6	+6	Start cusum calculation
12	102	−3	+3	
13	110	+5	+8	
14	107	+2	+10	
15	107	+2	+12	
16	107	+2	+14	

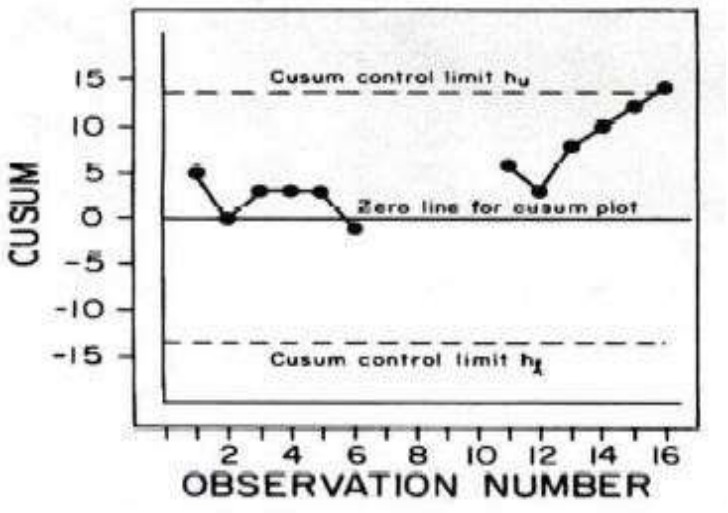
همانطور که مشاهده می شود در روز اول نتیجه کنترل ۱۱۰ قرائت شده است که ۵ واحد از K_u (۱۰۵) بیشتر است لذا Cusum شروع شده و اختلاف d_i بصورت ۵+ نشان داده شده است. روز دوم کنترل ۱۰۰ خوانده شده که ۵ واحد کمتر از K_u (۱۰۵) می باشد بنابراین مقدار d_i برابر ۵+ جمع جبری (دو عدد داخل بیضی) و (Csi) مساوی صفر می شود. هنوز علامت (Csi) عوض نشده است پس Cusum ادامه می یابد.

Cusum در دو حالت متوقف می شود:

وقتی علامت (Csi) تغییر یابد. در روز ششم مثال فوق، علامت (Csi) از مثبت به منفی تغییر یافته که نشان می دهد شرایط تحت کنترل درآمده است.

وقتی مقدار (Csi) از حد K_1 یا K_u خارج شود. مثال این مورد در روز ۱۶ که در آن (Csi) به ۱۴ رسیده است که بیش از K_u یعنی ۱۳/۵ است. در این حالت شرایط از کنترل خارج شده است. بنابراین باید خطا شناسایی شده و رفع گردد.

مثال فوق در منحنی زیر نشان داده شده است.



Cusum نسبت به چارت Levey-Jenning حساسیت بیشتری در مورد شناسایی خطای سیستماتیک دارد. این برتری در مورد قوانین چندگانه وستگارد، صادق نمی باشد زیرا قوانین مختلف وستگارد طوری طراحی شده اند که خطای سیستماتیک و راندوم را شناسایی می کنند.

کنترل کیفیت بر اساس نتایج آزمایش بیماران

روش های کنترل کیفی بر اساس نتایج بیماران اغلب به عنوان مکملی برای روش های معمول کنترل کیفیت، طراحی می شود اگر چه این روش ها زمان بر است و اهداف کنترل کیفی را بطور کامل تامین نمی نماید ولی گاهی موفق به شناسایی خطاهایی می شود که در روش های معمول کنترل کیفی قابل تشخیص نیستند.

برای این امر هر بیمار بطور انفرادی و نیز نتایج یک گروه از بیماران مورد بررسی قرار می گیرید.

نتایج هر بیمار بطور انفرادی

نتیجه آزمایش هر بیمار محصول نهایی عملکرد آزمایشگاه است ولی متاسفانه بررسی نتیجه تک تک بیماران شاخص حساسی برای شناسایی خطاها نمی باشد.

برای بررسی نتایج هر بیمار از روشهای زیر استفاده می شود.

هماهنگی با علائم بالینی

مقایسه نتایج آزمایشگاهی با علائم بالینی بیمار در آزمایشگاه هایی که تعداد زیادی از بیماران را پذیرش می کنند، تقریباً غیر ممکن است. مضاف براینکه افراد مختلف در زمان ابتلا به بیماری واحد، نتایج آزمایشگاهی یکسانی نداشته و الزاماً همیشه علائم بالینی با نتایج آزمایشگاهی هماهنگی کامل ندارد.

این عوامل ارزش این روش را محدود کرده و به موارد واضحی مثل کسب جواب بیلیروبین نرمال در افراد ایکتر محدود می کند.

چون پزشکان بطور مرتب با این مسائل مواجه هستند، باید ترتیبی اتخاذ شود که پزشکان با آزمایشگاه تعامل نزدیکی داشته و این موارد و مشکلات توسط پزشک به آزمایشگاه منتقل شود.

هماهنگی با سایر نتایج آزمایشگاهی

اگر یک گروه از آزمایش ها در زمان و مکان واحد انجام شود، مسئول آزمایشگاه می تواند ارتباط آنها را با هم بررسی نماید.

آزمایشهای مضاعف *(duplicate)* در آزمایشگاه

برای این کار بایستی نمونه ها در دو لوله ریخته شده و دو بار آزمایش شود. این روش در مواردی که کنترل های پایدار تجاری در دسترس نمی باشند و یا به عنوان مکمل روش های معمول کنترل کیفیت کاربرد دارد.

با انجام آزمایشهای مضاعف در یک آزمایشگاه می توان عدم دقت نتایج را بررسی نمود اما اگر این بررسی در دو آزمایشگاه مختلف انجام گردد، خطای سیستماتیک هم در آن تاثیر کرده و تفسیر آنرا مشکل می کند.

برای بررسی در یک آزمایشگاه، تعدادی نمونه بصورت دوبل آزمایش، اختلافات (d) آنها محاسبه و به توان دو رسانیده میشود$(d)^2$. سپس انحراف معیار اختلافات بر اساس فرمول زیر بدست می آید.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum of\ d^2}{2n}}$$

هر جفت جوابی که بیشتر از ۲SD با هم اختلاف داشته باشند غیر قابل قبول شناخته می شود .

دلتا چک با نتایج قبلی

در این روش نتایج جدید هر بیمار با نتایج قبلی همان بیمار مقایسه میشود. برخی خطاها مانند جابجایی نمونه یا جواب شناسایی می گردد. اساس این روش بر این موضوع استوار است که مقادیر پارامترها در بدن یک فرد در مدت زمانی مشخص، در محدوده مشخصی تغییر می کند .Ladenson دلتا چک را در مدت زمانی ۳ روز برای تعدادی از پارامترها بررسی نمود. که در جدول زیر آمده است.

Recommended Limits for Delta Checks	
Test	**Delta Check Limit**
Albumin	20%
Bilirubin, total	50%
Calcium, total	15%
Creatine kinase	99%
Creatinine	50%
Phosphorus	20%
Potassium	20%
Protein, total	20%
Sodium	5%
Thyroxine	25%
Urea nitrogen	50%
Uric acid	40%

From Ladenson JH. Patients as their own controls: Use of the computer to identify "laboratory error." Clin Chem 1975;21:1648-53.

Limit checks

در این روش آزمایشات مربوط به بیمارانی که مقادیر برخی پارامترهای آنها در محدودهای قرار دارد که در شرایط فیزیولوژیک امکان ندارد، دوباره انجام میگردد. مثل مواردی که در جدول زیر به آنها اشاره شده است.

Recommended Ranges for Limit Checks		
Test	**Low Warning**	**High Warning**
Acid phosphatase* (U/L)	0.1	10
Albumin (g/dL)	1.5	6
Alkaline phosphatase* (U/L)	5	300
Amylase* (U/L)	20	1000
Bilirubin (mg/dL)	0.2	10.0
Calcium (mg/dL)	6.5	13.0
Creatine kinase (U/L)	5	1500
Creatinine (mg/dL)	0.3	7.5
Phosphorus (mg/dL)	1.0	8.0
Potassium (mmol/L)	3.0	6.0
Sodium (mmol/L)	120	150
Urea nitrogen (mg/dL)	3	50
Uric acid (mg/dL)	1.0	12.0

Values are method dependent.
From Whitehurst P, DiSilvio TV, Benedian G. Evaluation of discrepancies in patients' results: An aspect of computer-assisted quality control. Clin Chem 1975;21:87-92.

۱-کنترل کیفیت بر اساس نتایج بیماران متعدد

بررسی آماری نتایج گروهی بیماران در تشخیص خطاهای سیستماتیک (shifts and drifts) مفید می باشد. ولی نمی تواند خطاهای راندوم را تشخیص دهد به همین دلیل نمی تواند جایگزین روش های معمول کنترل کیفی با مواد پایدار کنترلی شود. مقادیر حاصل از نتایج هر بیمار علاوه بر متغییرهای بخش آنالیتیک، تحت تاثیر متغییرهای متعددی مانند شرایط دموگرافیک، بیولوژیک، پاتولوژیک، پره آنالیتیک قرار می گیرد. این مسئله باعث می شود که کنترل کیفیت بر اساس نتایج بیماران متعدد و محاسبه میانگین نتایج آنها، نسبت به بررسی نتایج انفرادی هر بیمار ارجحیت داشته باشد.

اندازه تغییرات میانگین در یک گروه بیمار با شاخص آماری انحراف معیار از میانگین(Stsndard error of mean) یا به اختصار SEM بیان می شود که از تقسیم انحراف معیار نتایج یک گروه بیمار بر مجذور تعداد آنها بدست می آید .

استفاده از نتایج بیماران میتواند به عنوان مکملی مناسب برای سایر روشهای کنترلی استفاده گردد.

بررسی هماهنگی نتایج آزمایشگاه با تشخیص نهایی

این مطالعات اغلب بصورت گذشته نگر انجام گرفته و میزان موارد منفی و مثبت کاذب نتایج آزمایشگاهی را

بر اساس تشخیص نهایی بررسی می کند. این روش کنترل کیفیت نتایج آزمایشگاه را در دراز مدت، کنترل میکند.

تفسیر نتایج برنامه کنترل کیفی خارجی

آزمایشگاه ها همانند کارخانه های تولیدی هستند که مواد اولیه را به محصولات مورد نظر تبدیل میکنند. با این تفاوت که مواد اولیه در آزمایشگاه های بالینی، نمونه های بیماران بوده و محصول نتایج آزمایشها می باشند. کیفیت نتایج آزمایش، وابسته به عملکرد پرسنل، تجهیزات و معرف هایی است که در این فرایند مورد استفاده قرار می گیرد. علاوه بر اینها عوامل درون فردی نیز در کیفیت نمونه تهیه شده از بیمار تاثیر می گذارد. پس عوامل موثر در نتایج آزمایش را میتوان همانند متغییرهایی در نظر گرفت که به انواع مربوط به بیمار، پرسنل، تجهیزات و معرفها قابل تقسیم هستند. برای بدست آوردن نتاج آزمایش با کیفیت بالا، باید تمامی این عوامل تحت کنترل قرار داشته باشند.

اساس کنترل کیفیت روشهای آماری در آزمایشگاه های بالینی، بررسی دوره ای یک روش اندازه گیری در جهت تصدیق اجرای آن بر اساس مشخصات تعیین شده می باشد. برای این منظور معمولاً از نمونه کنترل کیفی (QC) و محاسبات آماری استفاده می شود. بر اساس منبع تهیه نمونه QC، روشهای کنترل کیفیت به دو دسته داخلی و خارجی تقسیم میشوند. کنترل کیفیت داخلی(IQC) برای پایش روزانه دقت و صحت روش اندازه گیری است. در حالیکه روشهای ارزیابی کنترل کیفیت خارجی (EQA) برای حفظ صحت طولانی مدت روشهای آزمایش مهم می باشد. در عمل IQC و EQA مکمل یکدیگر می باشند.

یکی از مسائلی که برای انتخاب یک سیستم کنترلی مناسب هم برای کنترل کیفیت داخلی و هم کنترل کیفیت خارجی باید مد نظر قرار داشته باشد تمایز سیگنال های مربوط به خطا در روش آنالیز و گزارش دهی از نویزهای مربوط به نوسانات ذاتی روش ها می باشد .وقتی یک خطا در سیستم رخ دهد بایستی زنگ خطر به صدا درآید (احتمال نزدیک به ۱۰۰٪ آشکارسازی خطا) و در مواقع وجود نداشتن خطا زنگی به صدا درنیاید (احتمال رد کاذب نزدیک به صفر). در غیر این صورت به دلیل کاهش احتمال آشکارسازی خطا و یا افزایش رد کاذب، بتدریج میزان اعتماد به سیستم کنترلی کاهش می یابد.

عوامل موثر در تمایز بین خطا و نوسانات ذاتی روش و در نتیجه تفسیر نتایج کنترل کیفیت را میتوان به سه دسته تقسیم نمود.

۱) تعیین میزان هدف نمونه
۲) تعیین دامنه قابل قبول نتایج
۳) تعیین قواعدی برای تفسیر نتایج

اساس توجه به عوامل فوق در IQC و EQA یکسان می باشد، ولی در جزئیات تفاوت های زیادی وجود دارد .از آنجایی که در مطالب فوق در مورد IQC به تفصیل توضیح داده شده است لذا در این بخش فقط در مورد EQA مطالبی ذکر خواهد شد.

۱) **تعیین میزان هدف نمونه** (برآوردی از میزان واقعی نمونه)

دو روش برای این کار وجود دارد

a) استفاده از میزان مشترک چندین آزمایشگاه

b) میزان مشترک شرکت کنندگان: که میزان میانگین شرکت کنندگان بعد از حذف بیرون افتاده ها میباشد که به آن میزان میانگین پیراسته یا میزان میانگین وزندار شده اطلاق میشود. تجربیات نشان میدهد که این مقدار به میزان واقعی نمونه بسیار نزدیک میباشد ولی برای این منظور بایستی دو خصوصیت را مورد توجه قرار دهیم.

i. تعداد اعضاء هر گروه یا همگروه کم نباشد تا آزمون آماری معتبر باشد. (حداقل ۱۰ و ترجیحاً ۲۰ آزمایشگاه) ii. درصد زیادی از شرکت کنندگان بایاس آنالیتیکال قابل توجه نداشته باشند.

یکی از مسائل مطرح در بحث EQA دسته بندی آزمایشگاه ها بر اساس روش آزمایشگاه می باشد. هیچ شکی وجود ندارد که برای رسیدن به اهداف EQA این دسته بندی ضروری است زیرا بر حسب استفاده از روشهای مختلف نتایج بدست آمده می تواند تفاوت قابل توجهی داشته باشند و این موضوع عدم دسته بندی، گاهی در مورد آنالیتهای غیر آنزیمی نظیر گلوکز و کلسترول مطرح می گردد که در این مورد هم دسته بندی کردن آزمایشگاه ها بر اساس روش آزمایش سبب رسیدن به میزان مشترکی می شود که برای آزمون آماری در هر گروه مناسبتر است.

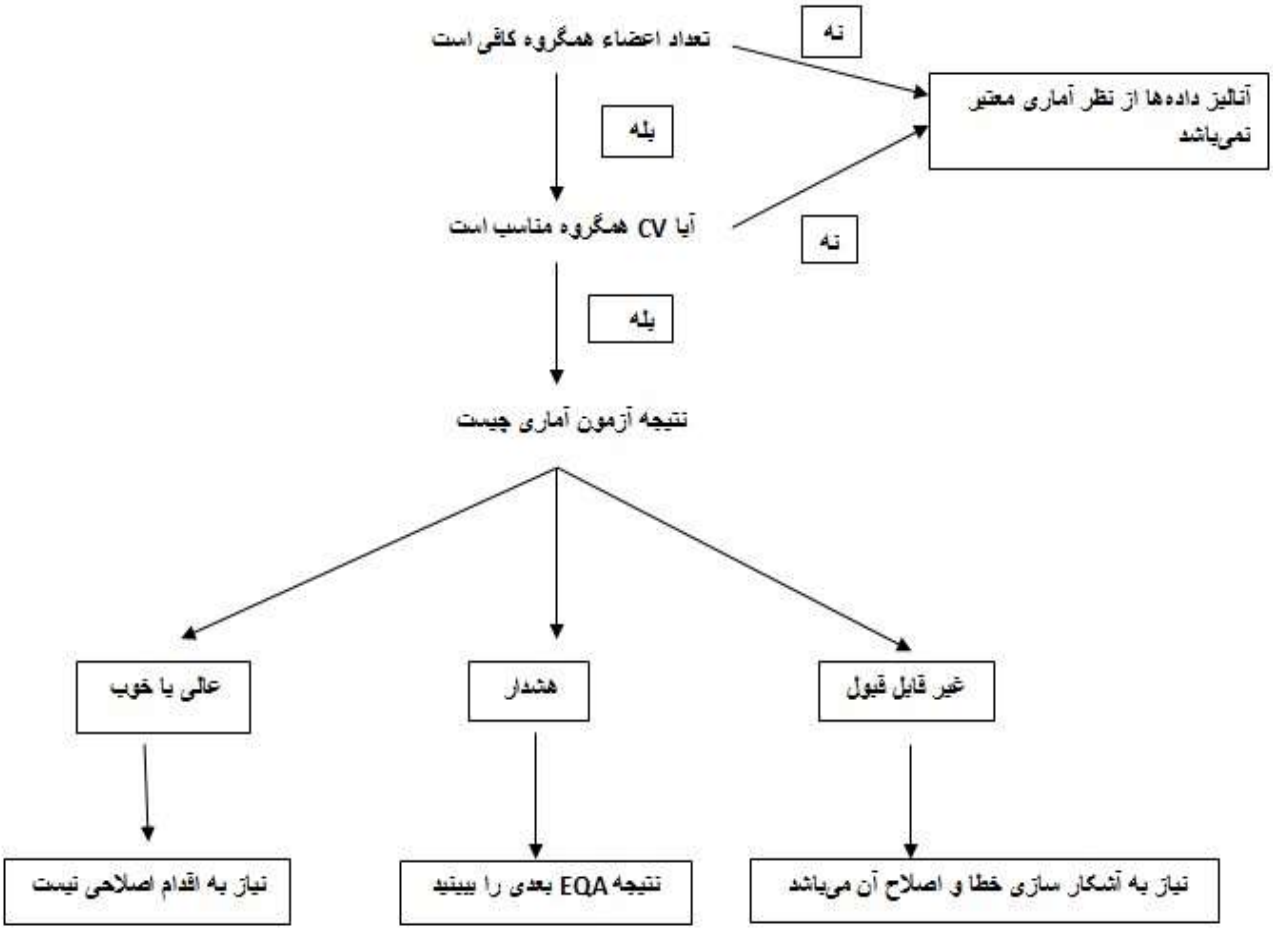
۲) تعیین دامنه قابل قبول

برای تعیین دامنه قابل قبول روش های مختلفی وجود دارد که هر کدام دارای محاسن و معایب خود می باشند. ولی دو روشی که در کشور ما بیشتر استفاده می شود استفاده از VIS و DI می باشد. اساس هر دو روش یکسان می باشد و اختلاف این دو روش فقط انتخاب میزان SD می باشد که در مورد VIS از قبل تعیین شده است ولی در مورد DI بر اساس SD هم گروه می باشد. عدم انتخاب SD مناسب سبب می شود که سیستم کنترلی نتواند سیگنال را از نویز تشخیص دهد. استفاده از یک دامنه ثابت مثل X±۵mg/dl یا X±۱۰٪ نیز توسط مراجع بین المللی مطرح گردیده است ولی هنوز در ایران مورد استفاده قرار نگرفته اند.

۳) تعیین قواعدی برای تفسیر نتایج

همانند قواعدی مثل وستگارد که در IQC مورد استفاده قرار می گیرد قواعدی برای تفسیر نتایج EQA وضع نشده است که مورد قبول اکثر صاحب نظران باشد.

سیستم امتیاز دهی VIS و DI راهکاری است که میتوان برای تفسیر نتایج EQA استفاده نمود. همچنین استفاده از الگوریتم زیر نیز پیشنهاد شده است.



مراحل کار تفسیر نتایج EQA :

- آزمایشگاههای شرکت کننده بر اساس نوع آنالیت مورد اندازه گیری گروه بندی می شوند.کل گروه ها شامل مجموع آزمایشگاه هایی می باشد که در اندازه گیری یک آنالیت خاص شرکت کرده اند و به آزمایشگاه ها اعضاء گفته می شود.

- اعضاء کل گروه بر اساس نوع کیت مصرفی به دو دسته دستی و دستگاهی تقسیم می شوند و اعضایی که برای اندازه گیری یک آنالیت از یک نوع کیت و از یک روش استفاده می کنند در یک گروه به نام هم گروه قرار داده می شوند.
- محاسبات آماری برای به دست آوردن مقادیر : میانگین و انحراف معیار انجام می شود. و بعد از تعیین SD، اگر نتیجه یا نتایجی در خارج از محدوده mean±۲,۵SD وجود داشته باشد این نتایج به عنوان نتایج پرت از محاسبه خارج می شود و دوباره میانگین محاسبه می گردد و این کار را تا وقتی که نتیجه یا نتایجی در خارج از محدوده mean±۲,۵SD وجود نداشته باشد ادامه می دهم و میانگین به دست آمده تحت عنوان میانگین وزن دار شده (Weighted Mean) نامیده می شود.

VIS پارامتری است که برای ارزیابی عملکرد عضو هر گروه مورد استفاده قرار می گیرد. هر چه میزان VIS کمتر باشد، عملکرد عضو بهتر می باشد. بر اساس میزان VIS اعضاء به گروه های زیر تقسیم می شوند.

- VIS<۵۰ نشاندهنده عملکرد عالی است.
- ۵۰<VIS<۱۰۰ نشاندهنده عملکرد مطلوب است.
- ۱۰۰<VIS<۱۵۰ نشاندهنده عملکرد قابل قبول است.
- ۱۵۰<VIS<۲۰۰ نشاندهنده عملکرد هشدار دهنده است.
- VIS>۲۰۰ نشاندهنده عملکرد غیرقابل قبول است.

اگر به دلایل ذکر شده در زیر امکان تشکیل یک هم گروه دیگر وجود نداشته باشد تنها به ذکر میانگین کل گروه و نتیجه عضو اکتفا می شود.

- تعداد اعضاء همگروه کمتر از ۱۰ باشد.

- نام کیت و روش دستی و دستگاهی ذکر نشده باشد و یا خوانا نباشد.

در صورتیکه نتیجه گزارش شده عضو خارج از محدوده X±۲,۵SD هم گروه یا کل گروه باشد، در محاسبات منظور نشده و عبارت »≤±۲,۵SD« در مقابل VIS نوشته می شود.

منابع

۱) کتاب کنترل کیفیت در آزمایشگاه های پزشکی، نوشته دکتر فریده رضی، دکتر پریسا داهیم و ...

۲) کتابچه برنامه ارزیابی خارجی کیفیت آزمایشاههای تشخیص طبی.

۳) اصول مدیریت کیفیت در آزمایشگاه بالینی دکتر درگاهی- انتشارات تهران.

۴) دستورالعمل فنی تهیه و کنترل کیفیت محیط های کشت آزمایشگاه رفرانس.