



کنترل کیفیت در بخش هماتولوژی آزمایشگاه

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

فهرست

فصل اول.....	۵
کلیات.....	۶
اصول اولیه کاربرد دستگاه های خودکار شمارنده سلولی.....	۶
شناسنامه دستگاه های خودکار شمارنده سلولی.....	۷
نکته های مهم در انجام آزمایش CBC.....	۸
فصل دوم.....	۱۲
اساس کار دستگاه های خودکار شمارنده سلولی.....	۱۳
کالیبراسیون دستگاه های خودکار شمارنده سلولی.....	۱۹
کنترل کیفیت دستگاه های خودکار شمارنده سلولی.....	۲۳
خطاهای دستگاه های خودکار شمارنده سلولی.....	۴۲
فصل سوم.....	۴۹
اندازه گیری هموگلوبین به روش سیانومتهموگلوبین.....	۵۰
روش اندازه گیری حجم سلولهای متراکم شده به روش میکروهماتوکریت.....	۵۵

۶۰.....کنترل کیفیت و بررسی کالیبراسیون دستگاه میکروهماتوکریت

۶۳.....شمارش سلولهای خونی به روش دستی

۶۳.....شمارش گلبولهای سفید

۶۷.....شمارش پلاکت

۷۰.....منابع

فصل اول

کلیات

کلیات

اصول اولیه کار با دستگاه های خودکار شمارنده سلولی

تمام کاربران دستگاههای خودکار شمارنده سلولی باید اصولی را که به عملکرد بهتر دستگاه منجر شده و در زیر به برخی از آنها اشاره می شود، در نظر داشته باشند:

۱. رعایت مواردی مانند روشن و خاموش کردن دستگاه، بررسی درجات فشار (برحسب نوع دستگاه)، نحوه نگهداری و شستشو (روزانه، هفتگی، ماهانه)، تعمیرات لازم، تعویض محلول ها و سایر اقدام ها مطابق دستورالعمل شرکت سازنده.

۲. گذراندن دوره ی آموزشی نحوه کار با دستگاه و اصول نگهداری، زیر نظر کارشناسان شرکت های پشتیبان (در این رابطه، سوابق مربوطه شامل تاریخ و شرح آموزش یا گواهی دوره آموزشی باید در پرونده هر کاربر نگهداری شود و در صورت تعویض کاربر نیز آموزش های لازم در نظر گرفته شود).

۳. نگهداری مدارک دستگاه از قبیل شناسنامه، دستورالعمل فنی و سوابقی مانند سوابق خرید، کالیبراسیون، کنترل و نگهداری، تعویض محلول ها، تعمیرات و سرویس ها، و سایر اقدامات در صورت لزوم.

۴. آشنایی کامل با نحوه کالیبراسیون و کنترل کیفی دستگاه

نکاتی در رابطه با محلول های دستگاه های خودکار شمارنده سلولی (ایزوتون، لایز و)...

۱. محلول های دستگاه باید با داشتن تاریخ انقضا و سری ساخت مشخص، فقط از شرکت پشتیبان و یا شرکت های ثبت شده در سامانه IMED وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی تهیه شود.

۲. روی ظرف حاوی هر محلول باید برچسبی با حداقل اطلاعات مانند نام محلول، تاریخ انقضا و تاریخ تعویض الصاق شده باشد.

۳. هیچگاه ته مانده محلول قبلی به محلول جدید اضافه نشود.

نکته:

علاوه بر شناسنامه، موارد زیر نیز باید بصورت مکتوب برای هر دستگاه در آزمایشگاه موجود باشد:

مشخصات محلول ها و مواد مصرفی؛

سوابق کالیبراسیون و کنترل کیفی؛

سوابق تعمیر با ذکر قطعه تعویض شده؛

سوابق نگهداری، سرویس های دوره ای و خدمات پشتیبانی.

شناسنامه دستگاه های خودکار شمارنده سلولی

دستگاه های خودکار شمارنده سلولی مانند سایر تجهیزات آزمایشگاهی باید شناسنامه های با این اطلاعات داشته باشند:

۱. تاریخ خرید

۲. تاریخ نصب و کالیبراسیون و نام کارشناس شرکت پشتیبان که دستگاه را راه اندازی نموده است؛

۳. تاریخ شروع به کار دستگاه؛

۴. کارخانه و کشور سازنده؛

۵. مدل و شماره سریال دستگاه؛

۶. شرایط دستگاه هنگام خرید(نو، مستعمل و بازسازی شده)؛

۷. نام، شماره تلفن و نشانی شرکت پشتیبان؛

۸. نام کاربر یا کاربران دستگاه؛

۹. مشخصات و نحوه آموزش کاربر دستگاه توسط شرکت پشتیبان.

*توصیه می شود در این شناسنامه میزان عدم دقت و عدم صحت دستگاه هنگام نصب نیز قید شود.

نکته:

وجود ذرات اضافی و نامحلول در محلولهای مصرفی به ویژه ایزوتون، باعث تداخل در شمارش زمینه و خطا در شمارش سلولهای خونی به خصوص پلاکت ها می شود.

نکته های مهم در انجام آزمایش CBC

تمام کارکنان مرتبط در آزمایشگاه ها باید از روش صحیح انجام آزمایش شمارش سلولهای خونی (CBC) ، به عنوان یکی از شایعترین آزمایش های انجام گرفته در آزمایشگاه های پزشکی آگاه باشند. برای اطمینان از نتایج آزمایش CBC موارد زیر باید در مراحل مختلف آزمایش رعایت شود.

۱. (Pre Analytical Phase) مرحله پیش از آزمایش

- مراجعه کننده باید پیش از خونگیری حداقل ۵ دقیقه آرام بنشیند.
- نام، نام خانوادگی و شماره پذیرش مندرج روی برچسب ظرف با برگ درخواست یا برگ پذیرش مطابقت داده شود.
- تورنیکه بیش از یک دقیقه بر دست نمونه دهنده بسته نماند.
- از ضد انعقاد مناسب با رعایت نسبت لازم به مقدار خون استفاده شود (توجه به الزامات مورد نیاز دستگاه در این خصوص ضروری است).
- به محض گرفتن خون، نمونه با ضد انعقاد مخلوط شود (۲ دقیقه با همزن یا ۸ تا ۱۰ بار سروته نمودن ویال).
- نمونه با مشاهده دقیق یا با استفاده از اپلیکاتور از نظر نبود لخته و همولیز یا لیپمی بررسی شود.
- حداکثر فاصله زمانی بین نمونه گیری و انجام آزمایش حدود ۴ تا ۶ ساعت باشد.
- بلافاصله پیش از انجام آزمایش، نمونه خون با قرار دادن ویال به مدت ۳ تا ۵ دقیقه روی روتاتور و یا حداقل ۱۰ بار سروته نمودن کامل، هموژن و یکنواخت شود.

۲. (Analytical Phase) مرحله انجام آزمایش

- هرروز پیش از شروع آزمایش، شمارش زمینه دستگاه انجام شده و در صورت امکان سوابق آن نگهداری شود.

- بطور معمول، مقادیر مربوط به شمارش زمینه هر دستگاه (Back Ground) در دستورالعمل آن ارائه شده است.

در صورت زیاد بودن تعداد نمونه های مورد آزمایش در هر سری کاری، بهتر است در فواصل آزمایش ها دستور شستشوی دستگاه و بررسی شمارش زمینه مجدداً اجرا شود. برای اطمینان از صحت مرحله انجام آزمایش، آشنایی کامل کاربر با اصول کار با دستگاه، اجرای برنامه های کالیبراسیون و کنترل کیفیت و رفع خطاها الزامی است.

۳. (Post Analytical Phas) مرحله پس از آزمایش

هنگام بررسی نتایج و پیش از ارائه گزارش، موارد زیر باید در نظر گرفته شوند:

اثر مواد ضد انعقاد

ضد انعقاد مایع K3EDTA به دلیل ایجاد رقت در نمونه، مقدار هموگلوبین را تا ۱٪ کاهش می دهد.

استفاده از ضد انعقاد K3EDTA باعث چروکیدگی گلبول های قرمز و کاهش ۲٪ میزان هماتوکریت می شود. در صورتیکه آزمایشگاهی ضد انعقاد مورد استفاده خود را از K3EDTA به K2EDTA تغییر دهد، باید به این نکته توجه نماید که میانگین MCV ۲٪ افزایش و میانگین M CHC به همین میزان کاهش می یابد.

- خطاهای ناشی از ماهیت نمونه یا خطاهای کاذب ناشی از دستگاه
- تعداد گلبولهای سفید بیش از $30 \times 10^9/L$ مقدار هموگلوبین را به میزان $3g/L$ افزایش می دهد.

- مواردی مانند تعداد پلاکت بیش از $10^9/L \times 700$ ، مقدار زیاد هموگلوبین S، میکروسیتوز و هایپوکرومی میزان Hb را به طور کاذب بالا می برند.

- خطاهای کاذب ناشی از دستگاه به تفصیل در انتهای فصل دوم آمده است.

نکته:

مشاهده ی گسترش خون محیطی و بررسی وضعیت بالینی بیمار و مطابقت آنها با نتیجه دستگاه پیش از گزارش دهی ضروری است.

فصل دوم

اساس کار، کالیبراسیون، کنترل

کیفیت و خطاهای دستگاه های

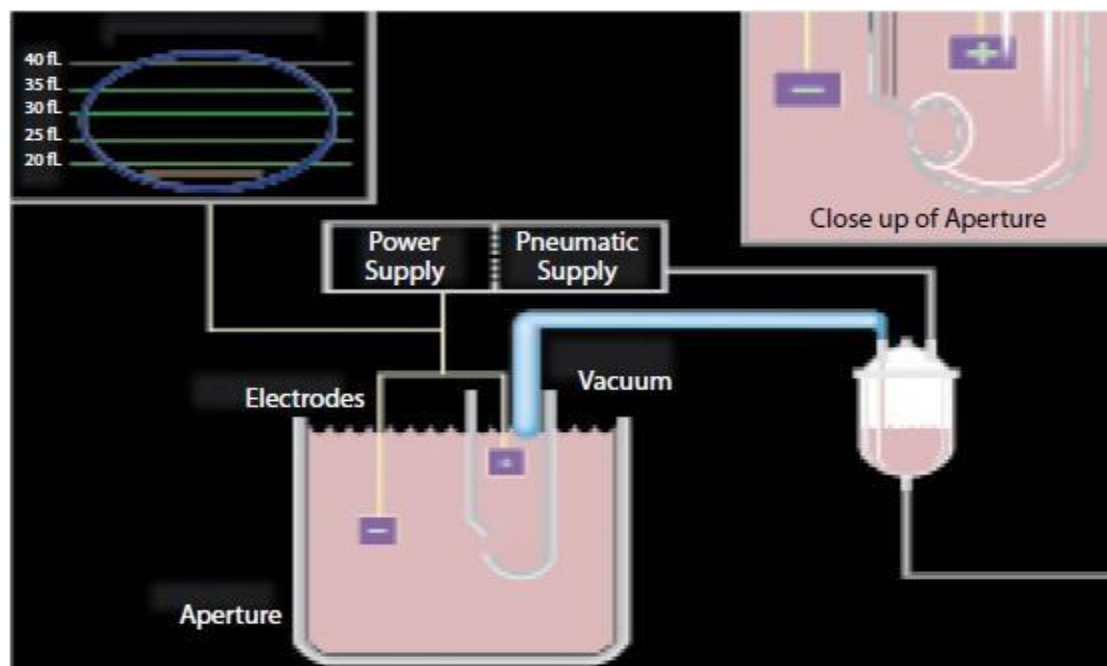
خودکار شمارنده سلولی

اساس کار دستگاه های خودکار شمارنده سلولی

اساس کار اکثریت دستگاه های خودکار شمارنده سلولی بر دو مکانیسم زیر استوار است:

۱. مقاومت الکتریکی (Electrical Impedance):

این روش اولین بار توسط والاس کولتر (Wallace Coulter) در سال ۱۹۵۶ مطرح شد و اساس کار دستگاه هایی نظیر کولتر (Coulter)، بکمن (Beckman)، سیسمکس (Sysmex)، ابوت (Abbott) و ... قرار گرفت. در این مکانیسم، خون در یک محلول بافری الکتریکی رقیق شده و از بین دو الکتروود حامل جریان الکتریکی مستقیم عبور می کند. با عبور هر سلول خونی از این مسیر، مقاومت الکتریکی و یک پالس الکتریکی ایجاد می شود. تغییر در پتانسیل بین الکتروودها متناسب با مدت زمانی است که گلبول از فضای بین دو الکتروود، که به اصطلاح دریچه (Aperture) نامیده می شود، عبور می کند. ارتفاع هر پالس نشان دهنده حجم سلول و تعداد پالس نشان دهنده تعداد سلول است.



تصویر شماره ۱. نمایی از فضای بین دو الکترود (Aperture)

۲. پراکندگی نور (Light Scattering): در این روش، سوسپانسیون رقیق شده سلولها به صورت یک ردیف سلولی از مقابل منبع نوری عبور می کند و باعث پراکندگی نور می شود. نور پراکنده از طریق یک فزاینده نوری (Photomultiplier) یا فوتودیود (Photodiode) به پالس های الکتریکی تبدیل می شود که در این حالت، تعداد پالس ها نمایانگر تعداد سلولها و ارتفاع پالس های الکتریکی، که متناسب با میزان پراکندگی نور بوده، نشان دهنده حجم سلولها است. منبع نوری برحسب نوع دستگاه، لیزر یا تنگستن است. هرچه قطر ردیف سلول های عبوری کوچک تر باشد (به اندازه قطر گلبولهای قرمز)، نور با دقت بیشتری بر جریان سلول ها تابیده و نتایج دقیق تری حاصل می شود.

در دستگاههای خودکار شمارنده سلولی حداقل دو مجرا طراحی شده است:

- در مجرای اول، با افزودن رقیق کننده به نمونه خون، اندازه و تعداد گلبولهای قرمز و پلاکتها مشخص میشود، که به منظور جداسازی پلاکتها از گلبولهای قرمز و شمارش آنها در دستگاه دو آستانه جداکننده بالا و پایین تعیین شده است.

- در مجرای دوم، با افزودن ماده لیز کننده به نمونه و با کمک رقیق کننده، گلبولهای قرمز لیز شده و گلبولهای سفید که دست نخورده مانده اند، شمارش می شوند. در این مجرا، علاوه بر شمارش گلبولهای سفید، مقدار هموگلوبین نیز به روش سیا نومتهموگلوبین اندازه گیری می شود.

* در دستگاه های جدیدتر برای شمارش افتراقی لکوسیت ها مجراهای دیگری در نظر گرفته شده است.

اندازه گیری MCV (Mean Corpuscular Volume) و PCV (Packed Cell Volume) در دستگاه های خودکار شمارنده سلول کاملاً به یکدیگر وابسته اند. در برخی دستگاه ها، با محاسبه میانگین ارتفاع پالس های حاصل از عبور مشخص می شود و بر اساس تعداد MCV گلبول های قرمز از دریچه، مقدار گلبول های قرمز شمارش شده، میزان هماتوکریت توسط دستگاه محاسبه می شود. در دستگاه های دیگر، از مجموع پالس های حاصل از عبور گلبول های قرمز، میزان PCV تعیین شده و با استفاده از تعداد گلبول های قرمز، مقدار MCV محاسبه می شود. تقریباً در تمام دستگاه ها سایر شاخص های گلبول های قرمز مانند MCH و $MCHC$ از طریق محاسبه و با استفاده از مقادیر هموگلوبین، PCV و تعداد گلبولهای قرمز مشخص می شوند. میزان پراکندگی اندازه گلبول های قرمز (RDW) در دستگاه ها، با استفاده از محاسبه میزان تغییرات ارتفاع پالس های ایجاد شده به دنبال عبور گلبول های قرمز تعیین و به صورت انحراف معیار SD (با واحد فمتولیتتر) یا ضریب انحراف معیار CV (درصد) ارائه می شود.

در بعضی دستگاه‌ها نظیر بایر تکنیکون^۱، میزان پراکندگی هموگلوبین داخل سلول (HDW)^۲ نیز مشخص می‌شود. این مقدار در واقع نشان دهنده پراکندگی (CV) غلظت هموگلوبین در هر سلول یا آنیزوکرومیا یا نمای دی مورفیک گلبولهای قرمز است.

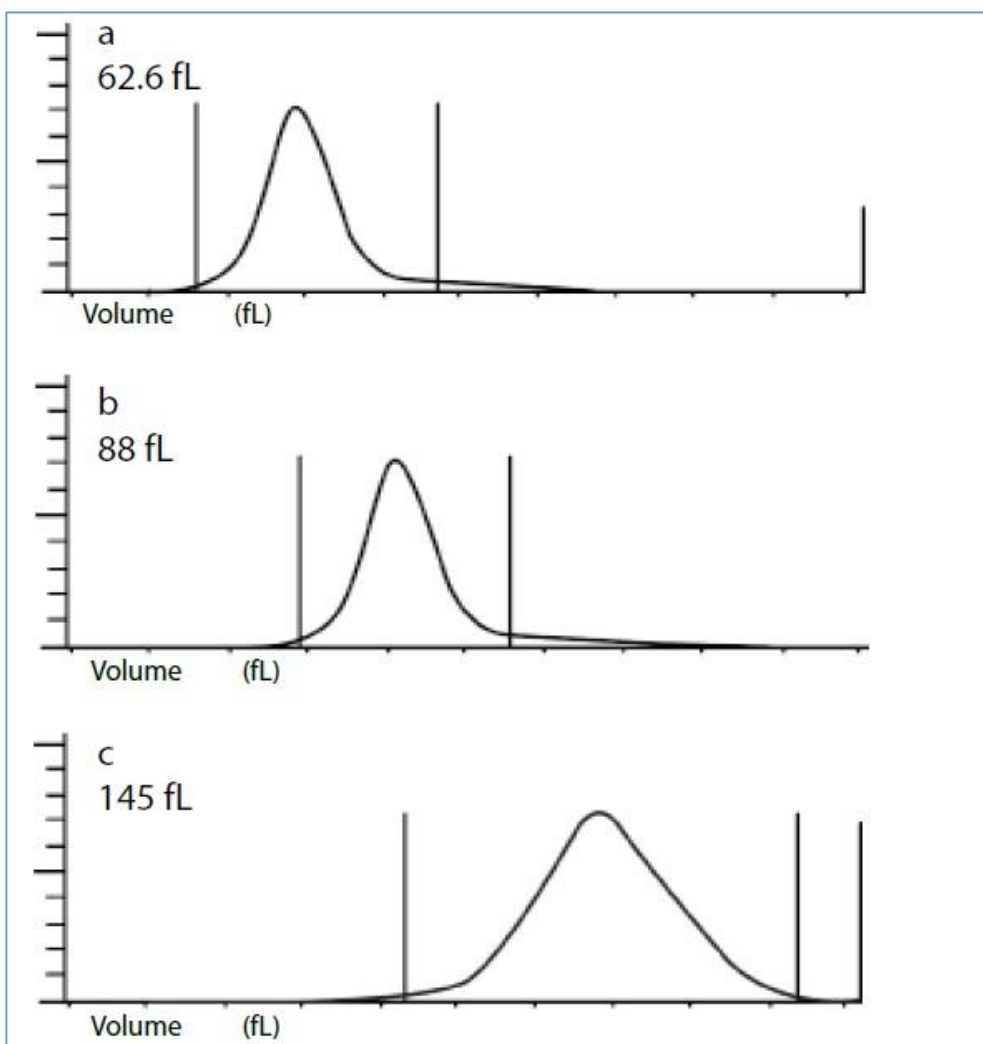
شمارش افتراقی گلبول سفید در دستگاه‌های مختلف، با استفاده از مکانیسم‌های مختلف مانند مقاومت الکتریکی و جریان‌های الکتریکی با تواترهای مختلف، تعیین اندازه هسته، پراکندگی و جذب نور، واکنش‌های شیمیایی ناشی از گرانول‌ها و... صورت گرفته و به صورت سه، پنج و هفت قسمتی گزارش می‌شود. در شمارش افتراقی سه قسمتی، سه گروه سلول بر اساس اندازه، شامل سلول‌های بزرگ یا گرانولوسیت‌ها، سلولهای کوچک یا لنفوسیتها و سلولهای متوسط شامل منوسیتها، بازوفیل‌ها، ائوزینوفیل‌ها و سلولهای مونونوکلئار شمارش می‌شوند. در شمارش افتراقی پنج قسمتی، رده‌های نوتروفیل، ائوزینوفیل، بازوفیل، لنفوسیتها و منوسیتها شمارش شده و در شمارش افتراقی هفت قسمتی علاوه بر رده‌های ذکر شده، سلولهای بزرگ نابالغ (بلاست و گرانولوسیت‌های نابالغ) و لنفوسیت‌های آتیپیکال (بلاست‌های کوچک) نیز جای می‌گیرند.

بسیاری دستگاه‌های تمام خودکار علاوه بر ارائه داده‌های عددی برای برخی از پارامترهای مورد اندازه‌گیری، نمودارهایی (هیستوگرام) نیز رسم می‌نمایند که مشاهده آنها به کاربر اطلاعات بیشتر و کامل‌تری می‌دهد. این هیستوگرام‌ها معمولاً نمایانگر پراکندگی اندازه گلبول‌های سفید و قرمز و پلاکتها بر اساس اندازه هستند. بعضی دستگاه‌ها علاوه بر این نمودارها، نمودار میزان پراکندگی غلظت هموگلوبین گلبولهای قرمز را در مقابل اندازه آنها نشان می‌دهد.

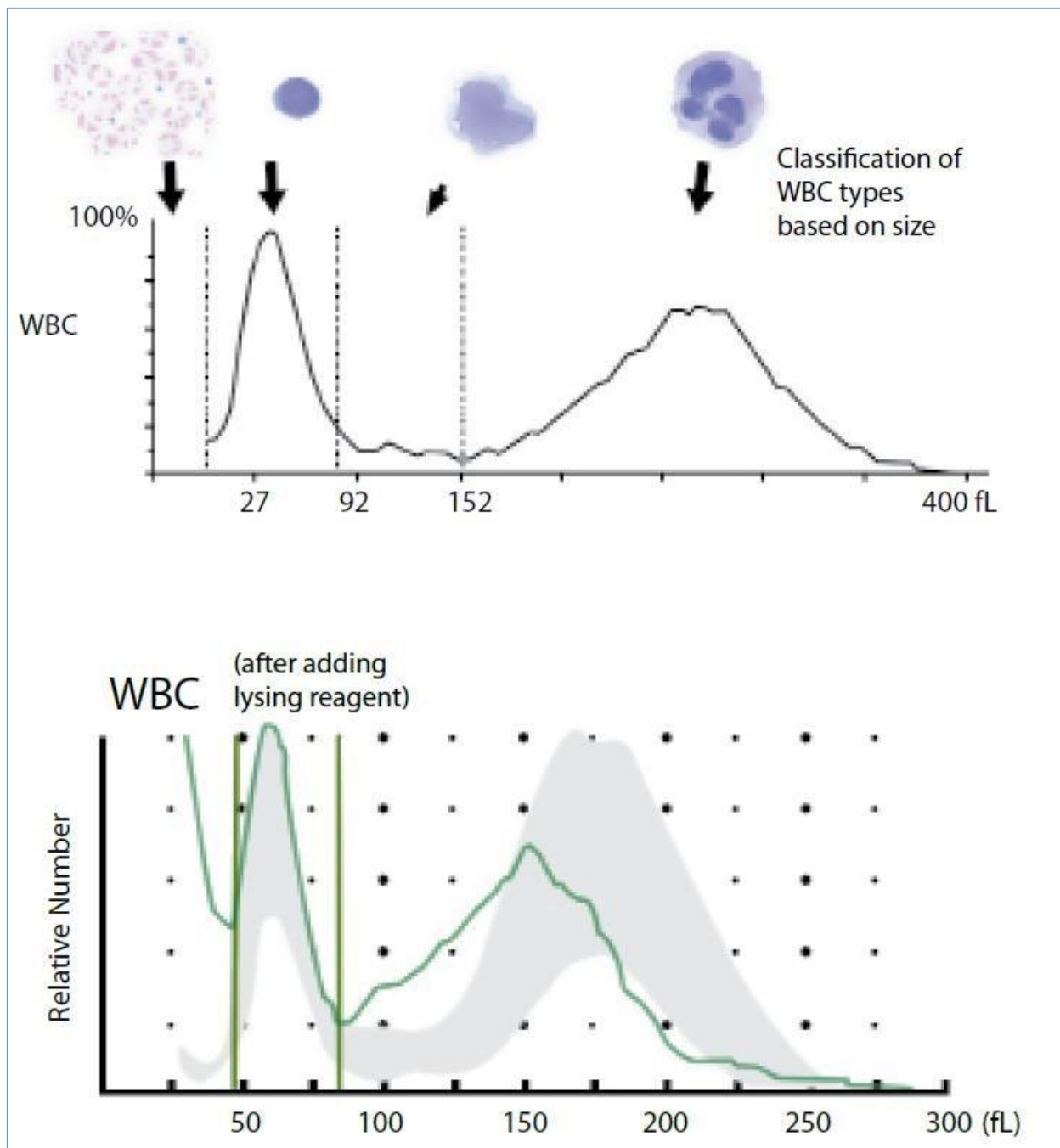
۱ Byertechnicon

۲ Hemoglobin Distribution Width

در این نمودارها، محور افقی نشان دهنده اندازه (حجم) سلول و محور عمودی نمایانگر تعداد سلول مورد نظر است.



تصویر شماره ۲ : هیستوگرام های گلبول های سفید



تصویر شماره ۳: هیستوگرام های نحوه پراکندگی گلبول های سفید بر حسب اندازه در دستگاه های با توانایی

شمارش افتراقی سه قسمتی

کالیبراسیون دستگاه های خودکار شمارنده سلولی

کالیبراسیون به مجموعه فعالیت هایی اطلاق می شود که ارتباط میان مقادیر اندازه گیری شده یک کمیت توسط یک دستگاه یا روش آزمایشگاهی را با مقادیر واقعی آن ماده، که با روش های مرجع اندازه گیری شده است، مشخص می نماید. کالیبراتور ماده ای است که برای کالیبراسیون روش آزمایشگاهی به کار می رود و مقدار مشخص دارد، درحالیکه مواد کنترلی باید برای کنترل کیفیت روش آزمایشگاهی به کار رود و اغلب محدوده غلظتی دارند؛ بنابراین، مواد کنترلی هیچگاه نمی توانند به عنوان جایگزین کالیبراتور استفاده شوند.

تمام دستگاه ها باید پس از نصب و پیش از شروع کار کالیبرشده و میزان عدم دقت آنها نیز بررسی شود. سوابق اجرایی این امر باید در آزمایشگاه نگهداری گردد. کالیبراسیون باید بطور کل سالی یک یا دو بار و نیز در موارد زیر انجام شود:

- هنگام نصب و راه اندازی،
- پس از هر بار تعمیر یا سرویس،
- قابل قبول نبودن نتایج کنترل کیفی روزانه (در صورت اطمینان از خراب نبودن نمونه کنترل)،
- تعویض محلولها (در صورت تغییر مشخص در نتایج خون کنترل یا نمونه بیماران)

دستورالعمل های کارخانه سازنده، برای کالیبراسیون دستگاه ها مناسب هستند. میتوان موفقیت روند کالیبراسیون را به وسیله آزمایش نمونه کنترل، مقایسه نتایج دستگاه با نتایج آزمایش شده روی چند نمونه خون با روش های مرجع و یا کنترل دقیق میانگین های متحرک درباره شاخص های گلبول های قرمز^۳ تأیید کرد.

در صورت دسترسی نداشتن به کالیبراتورهای تجاری یا داشتن تردید نسبت به اعتبار آن، استفاده از خون کامل برای کالیبراسیون ضروری است. برای کالیبراسیون باید از خون طبیعی و تازه استفاده کرد. برای این کار، پارامترهای حداقل سه نمونه خون کامل طبیعی، دو بار با روشهای مرجع دستی و دو بار با دستگاه شمارنده سلولی اندازه گیری می شود و پس از محاسبه میانگین نتایج هر پارامتر با روش دستی و دستگاهی، ضریب کالیبراسیون جدید با استفاده از فرمول زیر تعیین می شود. با افزایش تعداد نمونه ها، دقت کالیبراسیون بیشتر می شود.

$$\text{ضریب کالیبراسیون} = \frac{\text{میانگین روش دستگاهی} - \text{میانگین روش دستی}}{\text{میانگین روش دستگاهی}} \times 100$$

روش های مرجع اندازه گیری هموگلوبین، هماتوکریت و شمارش گلبولهای سفید به ترتیب سیانو متهموگلوبین، میکروهماتوکریت و استفاده از هماسیتومتر (با درجه بندی نئوبار اصلاح شده) هستند. در کتاب های مرجع، روش مرجع شمارش گلبولهای سفید، گلبولهای قرمز و پلاکتها، شمارنده های سلولی تک کاناله عنوان شده اند که در

Moving Average^۳

ایران، به علت در دسترس نبودن این تجهیزات، همچنان از هماسیتومتر استفاده می شود. به علت احتمال وجود خطای زیاد در شمارش سلولی با این روش، به ویژه در گلبولهای قرمز و پلاکتها، توصیه میشود که کالیبراسیون این پارامترها به وسیله شرکت پشتیبان صورت گیرد.

محاسبه ضریب کالیبراسیون:

اگر میانگین اندازه گیری هموگلوبین به روش دستی 140 g/L باشد، و با دستگاه خودکار شمارنده سلولی 145 g/L باشد، عامل تصحیح کالیبراسیون دستگاه با استفاده از فرمول زیر محاسبه می شود:

$$\text{ضریب کالیبراسیون} = \frac{140 - 145}{145} \times 100 = -3/44$$

طبق محاسبه بالا، ضریب کالیبراسیون دستگاه برای هموگلوبین باید به مقدار $3/44$ کاهش یابد. به عنوان مثال، اگر ضریب کالیبراسیون دستگاه پیش از این 100 بوده است، باید 3.44% کاهش یابد و روی $96/56$ تنظیم شود. در بعضی از انواع دستگاه های شمارنده مثل گروه سیسمکس، ضریب کالیبراسیون جدید با استفاده از فرمول کالیبراسیون که در دستورالعمل درج گردیده است، به ترتیب زیر محاسبه میشود:

$$\text{ضریب کالیبراسیون} = \frac{\text{میانگین روش دستی}}{\text{میانگین روش دستگاهی}} \times \text{ضریب کالیبراسیون قبلی}$$

نکته:

کالیبراسیون دستگاه باید در موارد خاصی که در بالا به آنها اشاره شد و با استفاده از روش ذکر شده، صورت گیرد، در غیر این صورت، تغییر مکرر ضریب کالیبراسیون به دنبال مشاهده هرگونه اختلال در نتایج، به هیچ وجه توصیه نمی شود.

کنترل کیفیت دستگاه های خودکار شمارنده سلولی

آزمایشگاه برای کنترل کیفیت دستگاه های شمارنده سلولی در بخش هماتولوژی باید دستورالعمل مکتوبی داشته باشد و سوابق انجام برنامه های کنترل کیفی نیز به نحو مقتضی نگهداری شود. توصیه مراجع معتبر بین المللی برای انجام این امر، استفاده از خون کنترل است که بسیاری از آزمایشگاه های کشور به دلایل مختلف از جمله دسترسی نداشتن به این نمونه، از روشهای دیگری برای کنترل کیفیت دستگاه شمارنده استفاده می کنند. در هر صورت، هر آزمایشگاه ملزم به استفاده از روشهای کنترل کیفی بوده که انواع خطاهای سیستماتیک و تصادفی را مشخص نماید.

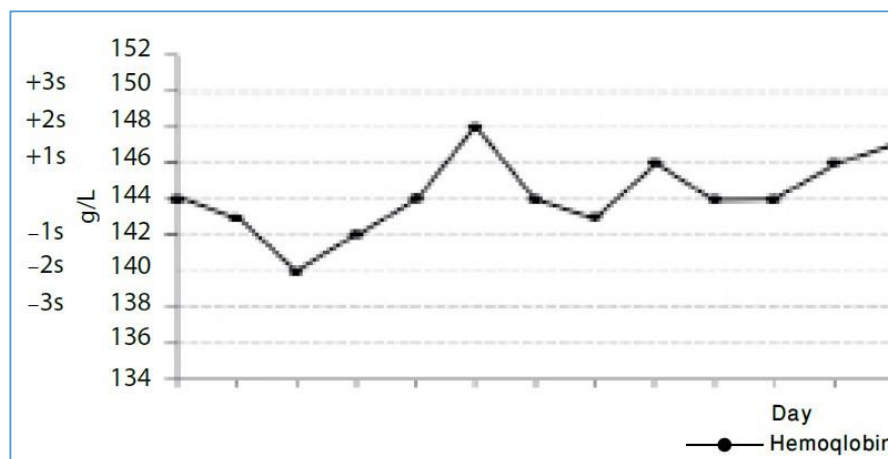
۳-۱. خون کنترل

طبق توصیه های منابع معتبر بین المللی خونشناسی، برای کنترل کیفیت دستگاه های شمارنده سلولی، باید در هر سری کاری، دستکم از دو نمونه خون کنترل در دامنه طبیعی و غیرطبیعی استفاده کرد. به این ترتیب، در ابتدای هر سری کاری، نمونه کنترل طبیعی و غیرطبیعی و در پایان، نمونه طبیعی با دستگاه شمارنده آزمایش و نتایج ثبت می شود. در ایران، دسترسی به خون کنترل در دامنه های مختلف برای تمام آزمایشگاه ها به راحتی امکان پذیر نیست؛ به همین دلیل، به طور معمول از خون کنترل در یک دامنه استفاده می شود.

نمونه خون کنترل هرروز صبح پیش از آزمایش نمونه های بیماران و در صورت نیاز، به فواصل در طی روز آزمایش و نتایج روی نمودار ثبت می شود. برای رسم نمودار، نمونه کنترل باید به دفعات و در فواصل زمانی مختلف با دستگاه آزمایش شود تا دستکم برای هر پارامتر ۲۰ خوانده حاصل شود. پس از محاسبه میانگین و انحراف معیارهای $\pm 1SD$ ، $\pm 2SD$ و $\pm 3SD$ برای هر پارامتر، مقادیر آنها روی محور عمودی و روزها روی محور افقی ثبت می شود.

کنترل کیفیت دستگاه صرفاً با منطبق بودن نتایج خون کنترل با دامنه ذکر شده در بروشور مربوطه قابل قبول نیست و همچنین استفاده از میانگین و دامنه مندرج در بروشور برای رسم نمودار توصیه نمی شود. هر آزمایشگاه باید خود با استفاده از روش ذکر شده در بالا، نسبت به تعیین میانگین و دامنه برای رسم نمودار اقدام نماید.

در زیر نمودار کنترل کیفیت هموگلوبین، با میانگین 144 g/L و انحراف معیارهای $\pm 1SD$ ، $\pm 2SD$ و $\pm 3SD$ به ترتیب 2 ، 4 و 6 مشاهده می شود. نقاط ثبت شده در نمودار نمایانگر میزان هموگلوبین خون کنترل در روزهای متوالی است. میتوان نمودار کنترل کیفیت را با استفاده از قوانین لوی جنینگ، وستگارد یا سازمان جهانی بهداشت تفسیر کرد. هر آزمایشگاه میتواند بر اساس اهداف کیفیتی که برای نتایج آزمایش های خود در نظر دارد، از یکی از این قوانین استفاده کند. با استفاده از نمودار کنترل کیفیت میتوان خطاهای تصادفی و سیستماتیک را در صورت بروز مشخص کرد.



تصویر شماره ۴ : نمودار کنترل کیفی هموگلوبین

جدول شماره ۱: تفسیر نمودار کنترل کیفیت براساس قوانین سازمان جهانی بهداشت

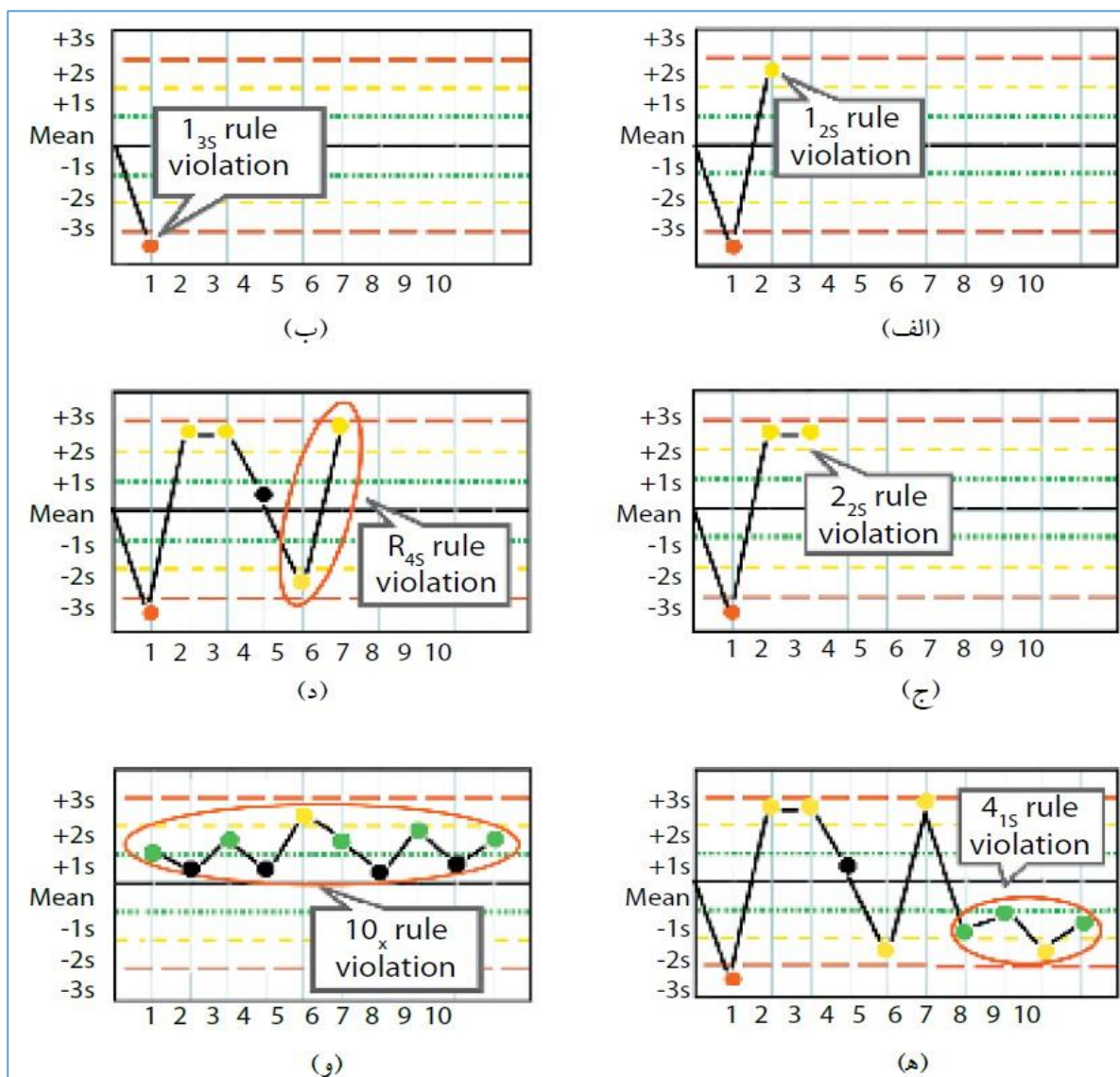
تفسیر	نتیجه خون کنترل
هشدار، نشان دهنده خطای تصادفی یا سیستماتیک	یک کنترل خارج از محدوده $\pm 2SD$
رد نتایج، نشان دهنده خطای تصادفی یا سیستماتیک	یک کنترل خارج از محدوده $\pm 3SD$
رد نتایج، نشان دهنده خطای سیستماتیک	دو خوانده متوالی هم سو و خارج از محدوده $\pm 2SD$
رد نتایج، نشان دهنده خطای سیستماتیک	چهار خوانده متوالی و هم سو و خارج از محدوده $+1SD$ یا $-1SD$
هشدار، نشان دهنده خطای سیستماتیک	شش خوانده متوالی در یک طرف میانگین

جدول شماره ۲: تفسیر نمودار کنترل کیفیت براساس قوانین وستگارد

تفسیر	نتایج خون کنترل
هشدار، لزوم بررسی سایر قوانین	1_{2s} یک کنترل خارج از محدوده $\pm 2SD$ (نمودار الف)
رد نتایج، نشان دهنده خطای تصادفی یا سیستماتیک	1_{3s} یک کنترل خارج از محدوده $\pm 3SD$ (نمودار ب)
رد نتایج، نشان دهنده خطای سیستماتیک	2_{2s} دو خوانده متوالی و هم سو، خارج از محدوده $\pm 2SD$ (نمودار ج)
رد نتایج، نشان دهنده خطای تصادفی	R_{4s} یک خوانده خارج از محدوده $+2SD$ و دیگری خارج از محدوده $-2SD$ (نمودار د)
رد نتایج، نشان دهنده خطای سیستماتیک	4_{1s} چهار خوانده متوالی و هم سو، خارج از محدوده $+1SD$ یا $-1SD$ (نمودار ه)
رد نتایج، نشان دهنده خطای سیستماتیک	$10_{\bar{x}}$ ده خوانده متوالی در یک طرف میانگین (بالا یا پایین میانگین و بدون توجه به اندازه انحراف) (نمودار و)

نکته:

قوانین چندگانه و ستگارد بین مجموعه های کاری مختلف و نیز بین دو غلظت نمونه کنترلی قابل استفاده هستند.



تصویر شماره ۵: نمودارهای کنترل کیفی با قوانین وستگارد

۳-۲. آزمون پایداری کالیبراسیون^۴

به منظور کامل شدن روند کنترل کیفیت دستگاه، علاوه بر استفاده از خون کنترل، میتوان از نمونه های خون تازه استفاده کرد. با توجه به پایداری پارامترهایی نظیر، Hb، WBC، RBC و HCT در نمونه خون حاوی ضد انعقاد، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ °C، میتوان در روز اول حداقل ۵ و ترجیحاً ۱۰ نمونه که دارای مقادیر طبیعی هستند را پس از آزمایش در یخچال نگهداری کرد و روز بعد، مجدداً مورد آزمایش قرارداد و وجود اختلاف معنی دار بین مقادیر نمونه های جفت را با استفاده از آزمون آماری پایداری کالیبراسیون محاسبه کرد.

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

n: تعداد جفت های مورد بررسی

d: اختلاف بین دو خواننده (روز به روز)

SD: نحراف معیار اختلافات

\bar{d} : میانگین اختلافات

مقدار t باید برای هر متغیر محاسبه شود. اگر مقدار آن برای ۵ نمونه از ۲.۷۸ و برای ۱۰ نمونه از ۲.۲۶ بیشتر باشد، با اطمینان ۹۵٪ می توان گفت که بین مقادیر شمارش شده در دو روز، اختلاف معنی دار وجود دارد. وجود اختلاف معنی دار برای یک متغیر، بیان کننده اشکال احتمالی است که در صورت تداوم، برای رفع آن باید اقدام مناسب صورت گیرد.

مثال:

در صورتی که نتایج اندازه گیری هموگلوبین ۵ نمونه خون با استفاده از یک دستگاه شمارنده سلولی در دو روز متوالی مطابق جدول زیر باشد، عملکرد دستگاه با کمک فرمول پایداری کالیبراسیون به صورت زیر بررسی می شود.

مقدار هموگلوبین روز اول (g/L)	مقدار هموگلوبین روز دوم (g/L)	d	d ²
۱۲۳	۱۲۰	۳	۹
۱۳۵	۱۳۳	۲	۴
۱۷۱	۱۷۰	۱	۱
۱۵۵	۱۵۰	۵	۲۵
۱۴۲	۱۳۸	۴	۱۶

$$\sum d = 15$$

$$(\sum d)^2 = 225$$

$$\sum d^2 = 55$$

$$\bar{d} = \frac{\sum d}{5} = \frac{15}{5} = 3$$

$$SD = \sqrt{\frac{55 - \frac{225}{5}}{4}} = 2/5$$

$$tn = \frac{3\sqrt{5}}{2/5} = 2/67$$

چون عدد t به دست آمده از ۲.۷۸ (مقدار t برای ۵ نمونه) کمتر است، نتایج هموگلوبین دستگاه قابل قبول است.

۳-۳. آزمایش دوتایی

در صورت نبود امکان انجام تمام آزمایش ها به صورت دوتایی، باید در هر سری کاری، حداقل ۲ تا ۳ نمونه به صورت دوتایی آزمایش شوند تا با بررسی اختلاف خوانده ها از طریق محاسبات آماری، از وجود خطاهای تصادفی آگاه شد. افزایش اختلاف بین دو خوانده بیش از $2SD$ محاسبه شده، احتمال وجود خطای تصادفی را مطرح می کند. فرمول زیر طریقه محاسبه SD نمونه های دوتایی را نشان می دهد:

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

مثال

مقدار هموگلوبین ۵ نمونه در دو بار اندازه گیری به شرح زیر است:

مقدار هموگلوبین (g/L)	مقدار هموگلوبین (g/L)	d	d ²
۱۲۰	۱۲۲	-۲	۴
۱۶۱	۱۶۳	-۲	۴
۱۱۰	۱۰۰	۱۰	۱۰۰
۱۴۰	۱۴۰	۰	۰
۱۳۴	۱۳۲	۲	۴
			۱۱۲

$$SD = \sqrt{\frac{\sum d^2}{2n}} = \sqrt{\frac{112}{10}} = 3.34$$

$$SD = 6.7$$

تفاوت بیشتر از $2SD$ بین دو نتیجه آزمایش در نمونه سوم ($d-10$)، نمایانگر بروز خطای تصادفی و لزوم تکرار آزمایش روی همان نمونه است.

۳-۴. آزمایش بازبینی^۵

یکی دیگر از روش های کنترل کیفیت، آزمایش بازبینی است که در صورت نگهداری نمونه ها در دمای مناسب (یخچال) اجراشده است. برای این کار باید ابتدای سری کاری یا صبح دو تا سه نمونه را پس از آزمایش بلافاصله با در بسته در یخچال قرارداد و در انتهای سری کاری یا بعدازظهر یا روز بعد، آنها را مجدداً مورد آزمایش قرارداد. پیش از آزمایش، نمونه ها باید به دمای اتاق رسیده و کاملاً مخلوط شوند. نتایج این دو آزمایش را می توان با استفاده از فرمول آزمایش دوتایی مقایسه نمود که اختلاف نتایج در محدوده $2SD$ قابل قبول است. در صورت نگهداری نمونه ها در شرایط مناسب، هرگونه تغییر در نتایج خارج از این محدوده، نشان دهنده اشکال در عملکرد دستگاه یا معرفیها است. این آزمایش برای بررسی تغییرات هموگلوبین و گلبولهای قرمز مناسب است و به میزان کمتر برای گلبولهای سفید و پلاکتها کاربرد دارد؛ ولی برای هماتوکریت، به ویژه اگر فاصله زمانی بین دو آزمایش ۶ ساعت یا بیشتر باشد، کارایی ندارد.

نکته:

بهبتر است نمونه هایی که برای آزمایش بازبینی و دوتایی
آزمایش می شوند، یکسان باشند.

Check Test ۵

مثال:

نتایج اندازه گیری هموگلوبین ۵ نمونه توسط دستگاه شمارنده در صبح و بعدازظهر به شرح زیر است:

مقدار هموگلوبین صبح (g/L)	مقدار هموگلوبین بعد از ظهر (g/L)	d	d ^۲
۱۲۰	۱۲۱	-۱	۱
۱۶۱	۱۵۹	۲	۴
۱۱۰	۱۱۲	-۲	۴
۱۴۰	۱۴۰	۰	۰
۱۳۴	۱۳۵	-۱	۱
			۱۰

$$SD = \sqrt{\frac{\sum d^2}{2n}} = \sqrt{\frac{10}{10}} = 1$$

$$2SD=2$$

با توجه به آنکه هیچ یک از اختلافات نتایج دو بار آزمایش روی یک نمونه، از $2SD$ بیشتر نیست، عملکرد دستگاه قابل قبول است.

۳-۵. آزمایش دلتا ۶

مقایسه مقادیر به دست آمده از یک نمونه با نتایج قبلی نمونه همان فرد به عنوان روشی برای کنترل کیفیت به کار می رود؛ با در نظر گرفتن این نکته که فاصله زمان بین دو آزمایش بیش از دو تا سه هفته نباشد. در صورت استفاده از این روش، باید به نکاتی نظیر تغییرات فیزیولوژیک طبیعی و روزانه پارامترهای خونی و همچنین، مواردی نظیر ابتلای فرد به بیماری و یا استفاده از دارو به دلایل مختلف که باعث تغییر شمارش سلولها، توجه داشت. با توجه به تغییرات روزانه طبیعی پارامترهای خونی در یک فرد، تنها وجود اختلافات واضح بین مقادیر به دست آمده، نشان دهنده بروز خطا است.

پارامتر مورد نظر	تفاوت بین دو نتیجه که می تواند نمایانگر خطا باشد
Hb	۲g/dL
PCV	۰/۰۵ L/L
MCV	> ۶fL
MCH	> ۵pg
WBC	از تعداد طبیعی به غیرطبیعی
Platelets	افزایش یا کاهش تعداد، بیش از ۵۰٪

۳-۶. استفاده از نتایج بیماران

به دلیل ثابت بودن مقادیر میانگین شاخص های گلبولی (MCH، MCV و MCHC) در فواصل روزها و هفته ها، میتوان از این شاخص ها به منظور ارزیابی کیفیت عملکرد دستگاه شمارنده در آزمایشگاه هایی که حداقل روزی ۱۰۰ نمونه CBC پذیرش می کنند، استفاده نمود. بررسی ها نشان می دهند، در صورتی که نمونه های CBC مورد آزمایش در روزهای مختلف از نظر میزان ایندکسهای خونی تفاوت مشخصی با یکدیگر نداشته باشند که به تأثیر بارز بر میانگین ها منجر شود، مانند پذیرش نمونه های افراد مبتلا به فقر آهن یا تالاسمی در یک روز خاص در هفته که باعث کاهش شاخص های گلبولی می شوند، هرگونه تغییر مشخص در میانگین ایندکس ها نشان دهنده تغییر در کالیبراسیون یا اختلال عملکرد دستگاه است. برای استفاده از این روش، ابتدا باید میانگین و $\pm 2SD$ ایندکس های MCH، MCV و MCHC حداقل ۳۰۰ تا نمونه را محاسبه و سپس، نمودار کنترل کیفیت را رسم نمود.

در صورت مراجعه بیمارانی که ایندکس های خونی طبیعی ندارند، مانند مبتلایان به بیماری های ذکر شده، نتایج ایندکس های گلبولی آنها نباید در محاسبه میانگین لحاظ شود. پس از رسم نمودار، نمونه های بیماران را روزانه به گروه های بیست تایی تقسیم کرده و پس از محاسبه میانگین شاخص های گلبولی آنها و ثبت این میانگین روی نمودار، هرگونه انحراف از مقادیر مجاز را میتوان نمایانگر عملکرد نامناسب دستگاه دانست. برای اطمینان از درست بودن این روش، انتخاب گروه های بیست تایی نمونه ها، باید به صورت تصادفی باشد و در هر دسته نیز بیش از ۷ نمونه دارای شرایط بالینی یکسان نباشند. این روش کنترل کیفی به صورت برنامه های نرم افزاری روی بعضی دستگاه ها نصب شده است.

۳-۷. بررسی عدم دقت (CV)

این بررسی به دو شکل انجام پذیر است. در صورت استفاده از خون کنترل، میتوان با استفاده از نتایج نمونه کنترل که طی روزهای متوالی با دستگاه آزمایش شده، عدم دقت هر پارامتر را محاسبه کرد و در صورت دسترسی نداشتن به خون کنترل، باید از نمونه های روزانه برای این امر استفاده کرد. به این ترتیب، هرماه دو نمونه یا بیشتر را حداقل ۱۰ بار به صورت متوالی با دستگاه آزمایش کرده و از نتایج به دست آمده، عدم دقت هر پارامتر را محاسبه کرد. توصیه می شود که عدم دقت دستگاه به ویژه هنگام نصب و راه اندازی، با استفاده از نمونه های با دامنه های طبیعی و غیرطبیعی بررسی شود. برای تهیه نمونه غیرطبیعی پایین، میتوان از نمونه رقیق شده استفاده کرد، به این ترتیب که پلاسمای نمونه را جدا کرده و سپس حجمی از نمونه را با این پلاسمای به دست آمده مخلوط کرد. نمونه خون با دامنه غیرطبیعی بالا را نیز میتوان با غلیظ کردن نمونه تهیه نمود. برای این کار باید ظرف نمونه را به مدت ۲ ساعت با زاویه ۴۵° نگهداری کرد و سپس با برداشتن نیمی از پلاسمای ایجاد شده و مخلوط کردن کامل، از آن به عنوان نمونه غیرطبیعی بالا استفاده نمود. در صورت مطابقت نداشتن عدم دقت هر پارامتر با ادعای سازنده که در بروشور درج شده است، ضروری است با شرکت پشتیبان تماس گرفته شود.

مثال:

میزان عدم دقت دستگاه برای شمارش گلبولهای سفید به روش زیر محاسبه میشود:

شمارش WBC	$x - \bar{x}$	$(x - \bar{x})^2$
۷/۶	-۰/۰۳	۰/۰۰۰۹
۷/۵	-۰/۱۳	۰/۰۱۷
۷/۸	۰/۱۷	۰/۰۲۹
۷/۶	-۰/۰۳	۰/۰۰۰۹
۷/۵	-۰/۱۳	۰/۰۱۷
۷/۹	۰/۲۷	۰/۰۷۳
۷/۵	-۰/۱۳	۰/۰۱۷
۷/۶	-۰/۰۳	۰/۰۰۰۹
۷/۵	-۰/۱۳	۰/۰۱۷
۷/۸	۰/۱۷	۰/۰۲۹
$\sum x = ۷۶/۳$		$\sum (x - \bar{x})^2 = ۰/۲۰۱$
$\bar{x} = ۷/۶۳$		

$SD = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$	$CV\% = \frac{SD \times 100}{\bar{x}}$
$SD = \sqrt{\frac{۰/۲۰۱}{۹}} = ۰/۱۴۸$	$CV\% = \frac{۰/۱۴۸ \times 100}{۷/۶۳} \quad CV\% = \%۱/۹$

۳-۸. بررسی صحت

روش های ذکرشده جزئی از برنامه های کنترل داخلی کیفیت هستند و به منظور بررسی تکرارپذیری مناسب آزمایش ها انجام می شوند، ولی تکرارپذیری مناسب همواره نشان دهنده صحت نتایج نیست. برای ارزیابی صحت عملکرد تجهیزات و روش های آزمایش، باید از روش های دیگری نظیر استفاده از استاندارد، کالیبراتور و یا شرکت در برنامه های کنترل خارجی کیفیت استفاده کرد. هدف برنامه کنترل خارجی کیفیت، ایجاد هماهنگی بین نتایج آزمایشگاه ها است. در این برنامه، نمونه های مجهول از مرکز اجرای برنامه به آزمایشگاه های شرکت کننده فرستاده می شود. آزمایشگاه ها پس از انجام آزمایش های لازم روی نمونه ها، نتایج را جهت پردازش به مرکز اجرای برنامه ارسال می نمایند. نتایج در مرکز ذکرشده به روش های مختلف بررسی می شود که یکی از آنها مقایسه نتایج هر آزمایشگاه با میانگین نتایج کل آزمایشگاه ها است که نتیجه آن به صورت (DI) به اطلاع آزمایشگاه رسانده می شود.

$$DI = \frac{x - \bar{x}}{SD}$$

\bar{x} : میانگین گروه

x : نتیجه هر آزمایشگاه

SD : نحراف معیار مجاز هر پارامتر

نحوه تفسیر:

$DI < 1$ = نتیجه مناسب

$DI = 1-2$ = قابل قبول اما بینابینی

$DI = 2-3$ = نیاز به بررسی روش آزمایش و یا کالیبراسیون

$DI < 3$ = نیاز به اقدام فوری

۳-۹. تطابق نتایج دستگاه با یافته های میکروسکوپی یا بالینی

به توصیه سازمان جهانی بهداشت، بررسی نتایج آزمایش های حاصل از دستگاه و مقایسه و مطابقت آنها با مشاهده میکروسکوپی گسترش های خونی مربوطه و یافته های بالینی بیمار، باید از برنامه های دائمی کنترل کیفیت آزمایشگاه باشد. به این ترتیب، هرگونه نتیجه غیرقابل انتظار حاصل از دستگاه نظیر لکوسیتوز، لکوپنی، ترومبوسیتوپنی، هموگلوبین خیلی پایین یا بالا و ایندکس های غیرطبیعی باید پیش از گزارش با مشاهده گسترش خون محیطی یا بررسی وضعیت بالینی و یا سابقه بیمار تأیید شود.

نکته:

اگر چه مقایسه روش دستی (مرجع) و دستگاهی در مراجع معتبر روش روزمره برای کنترل کیفیت عنوان نشده است، ولی در بسیاری از آزمایشگاه های کشور از این روش به عنوان یکی از راه های کنترل کیفیت استفاده می شود. در صورت استفاده از این روش، توجه به نکته های زیر الزامی است:

۱. آزمایش دستکم روی ۳ نمونه (بدیهی است آزمایش روی تعداد نمونه های بیشتر

امکان دستیابی به نتایج صحیح تر را فراهم می نماید)؛

۲. انجام آزمایش دوتایی به روش دستی و دستگاهی روی هر نمونه و محاسبه میانگین

نتایج برای هر پارامتر با هر دو روش؛

۳. استفاده از آزمون آماری Paired t test برای مقایسه همخوانی نتایج.

فرمولهای محاسبه t با استفاده از آزمون آماری paired t test به روش زیر است:

$$\text{Variance}(SD^2) = \frac{\sum(d - \bar{d})^2}{n-1}$$

$$\text{Standard error of difference in mean (SEdiff)} = \frac{\sqrt{SD^2}}{n}$$

$$t = \frac{\bar{d}}{\text{SEdiff}}$$

n: تعداد نمونه ها

d: اختلاف نتایج روش دستی و دستگاهی برای هر نمونه

d: میانگین اختلاف نتایج

SD^2 : واریانس اختلاف بین نتایج SE diff: تفاوت استاندارد میانگین دو گروه داده

مقادیر مجاز t با توجه به ضرایب اطمینان مختلف در جدول t test درج شده است. با استفاده از این جدول بر

اساس تعداد نمونه ها (n) و درجه آزادی (n-1) و در نظر داشتن ضریب اطمینان ۰.۹۵، میتوان عدد t مجاز را

مشخص کرد.

سطح درصد اطمینان

df	۵۰	۴۰	۳۰	۲۰	۱۰	۵	۱
۱	۱	۱/۳۷۶	۱/۹۶۳	۳/۰۷۸	۶/۳۱۴	۱۲/۷۰۶	۶۳/۶۵۷
۲	۰/۸۱۶	۱/۰۶۱	۱/۳۸۶	۱/۸۸۶	۲/۹۲۰	۴/۳۰۳	۹/۹۲۵
۳	۰/۷۶۵	۰/۹۷۸	۱/۲۵۰	۱/۶۳۸	۲/۳۵۳	۳/۱۸۲	۵/۸۴۱
۴	۰/۷۴۱	۰/۹۴۱	۱/۱۹۰	۱/۵۳۳	۲/۱۳۲	۲/۷۷۶	۴/۶۰۴
۵	۰/۷۲۷	۰/۹۲۰	۱/۱۵۶	۱/۴۷۶	۲/۰۱۵	۲/۵۷۱	۴/۰۳۲
۶	۰/۷۱۸	۰/۹۰۶	۱/۱۳۴	۱/۴۴۰	۱/۹۴۳	۲/۴۴۷	۳/۷۰۷
۷	۰/۷۱۱	۰/۸۹۸	۱/۱۱۹	۱/۴۱۵	۱/۸۹۵	۲/۳۶۵	۳/۴۹۹
۸	۰/۷۰۶	۰/۸۹۱	۱/۱۰۸	۱/۳۹۷	۱/۸۶۰	۲/۳۰۶	۳/۳۵۵
۹	۰/۷۰۳	۰/۸۸۳	۱/۱۰۰	۱/۳۸۳	۱/۸۳۳	۲/۲۶۲	۳/۲۵۰
۱۰	۰/۷	۰/۸۷۹	۱/۰۹۳	۱/۳۷۲	۱/۸۱۲	۲/۲۲۸	۳/۱۶۹
۱۱	۰/۶۹۷	۰/۸۷۶	۱/۰۸۸	۱/۳۶۳	۱/۷۹۶	۲/۲۰۱	۳/۱۰۶
۱۲	۰/۶۹۵	۰/۸۷۳	۱/۰۸۳	۱/۳۵۶	۱/۷۸۲	۲/۱۷۹	۳/۰۵۵
۱۳	۰/۶۹۴	۰/۸۷۰	۱/۰۷۹	۱/۳۵۰	۱/۷۷۱	۲/۱۶۰	۳/۰۱۲
۱۴	۰/۶۹۲	۰/۸۶۸	۱/۰۷۶	۱/۳۴۵	۱/۷۶۱	۲/۱۴۵	۲/۹۷۷
۱۵	۰/۶۹۱	۰/۸۶۶	۱/۰۷۴	۱/۳۴۱	۱/۷۵۳	۲/۱۳۱	۲/۹۴۷
۱۶	۰/۶۹۰	۰/۸۶۵	۱/۰۷۱	۱/۳۳۷	۱/۷۴۶	۲/۱۲۰	۲/۹۲۱
۱۷	۰/۶۸۹	۰/۸۶۳	۱/۰۶۹	۱/۳۳۳	۱/۷۴۰	۲/۱۱۰	۲/۸۹۹
۱۸	۰/۶۸۸	۰/۸۶۲	۱/۰۶۷	۱/۳۳۰	۱/۷۳۴	۲/۱۰۱	۲/۸۷۸
۱۹	۰/۶۸۸	۰/۸۶۱	۱/۰۶۶	۱/۳۲۸	۱/۷۲۹	۲/۰۹۳	۲/۸۶۱
۲۰	۰/۶۸۷	۰/۸۶۰	۱/۰۶۴	۱/۳۲۵	۱/۷۲۵	۲/۰۸۶	۲/۸۴۵
۲۱	۰/۶۸۶	۰/۸۵۹	۱/۰۶۳	۱/۳۲۳	۱/۷۲۱	۲/۰۸۰	۲/۸۳۱
۲۲	۰/۶۸۶	۰/۸۵۸	۱/۰۶۱	۱/۳۲۱	۱/۷۱۷	۲/۰۷۴	۲/۸۱۹
۲۳	۰/۶۸۵	۰/۸۵۸	۱/۰۶۱	۱/۳۲۱	۱/۷۱۷	۲/۰۷۴	۲/۸۱۹
۲۴	۰/۶۸۵	۰/۸۵۷	۱/۰۵۹	۱/۳۱۸	۱/۷۱۱	۲/۰۶۴	۲/۷۹۷
۲۵	۰/۶۸۴	۰/۸۵۶	۱/۰۵۸	۱/۳۱۶	۱/۷۰۸	۲/۰۶۰	۲/۷۸۷
۲۶	۰/۶۸۴	۰/۸۵۶	۱/۰۵۸	۱/۳۱۵	۱/۷۰۶	۲/۰۵۶	۲/۷۷۹
۲۷	۰/۶۸۴	۰/۸۵۵	۱/۰۵۷	۱/۳۱۴	۱/۷۰۳	۲/۰۵۲	۲/۷۷۱
۲۸	۰/۶۸۳	۰/۸۵۵	۱/۰۵۶	۱/۳۱۳	۱/۷۰۱	۲/۰۴۸	۲/۷۶۳
۲۹	۰/۶۸۳	۰/۸۵۴	۱/۰۵۵	۱/۳۱۱	۱/۶۹۹	۲/۰۴۵	۲/۷۵۶
۳۰	۰/۶۸۳	۰/۸۵۴	۱/۰۵۵	۱/۳۱۰	۱/۶۹۷	۲/۰۴۲	۲/۷۵۰
۴۰	۰/۶۸۱	۰/۸۵۱	۱/۰۵۰	۱/۳۰۳	۱/۶۸۴	۲/۰۲۱	۲/۷۰۴
۵۰	۰/۶۸۰	۰/۸۴۹	۱/۰۴۸	۱/۲۹۹	۱/۶۷۶	۲/۰۰۸	۲/۶۷۸
۶۰	۰/۶۷۹	۰/۸۴۸	۱/۰۴۶	۱/۲۹۶	۱/۶۷۱	۲	۲/۶۶۰
۱۲۰	۰/۶۷۷	۰/۸۴۵	۱/۰۴۱	۱/۲۸۹	۱/۶۵۸	۱/۹۸۰	۲/۶۱۷
∞	۰/۶۷۴	۰/۸۴۲	۱/۰۳۶	۱/۲۸۲	۱/۶۴۵	۱/۹۶۰	۲/۵۷۶

مثال:

میانگین هماتوکریت به روش دستی	میانگین هماتوکریت به روش دستگاهی	d	d-d̄	(d-d̄) ²
٪۴۵/۵	٪۴۵	۰/۵	۰/۴۳۷	۰/۱۹
۳۹	٪۳۸/۳	۰/۷	۰/۶۳۷	۰/۴
٪۴۱/۷	٪۴۱	۰/۷	۰/۶۳۷	۰/۴
		$\bar{d} = ۰/۰۶۳$	$\sum(d-\bar{d})^2 = ۰/۹۹$	

$$SD^2 = \frac{\sum(d-\bar{d})^2}{n-1} = \frac{۰/۹۹}{۲} = ۰/۵$$

$$SE\ diff = \frac{\sqrt{SD^2}}{n} = \frac{\sqrt{۰/۵}}{۳} = ۰/۴$$

$$t = \frac{\bar{d}}{SE\ diff} = \frac{۰/۰۶۳}{۰/۴} = ۰/۱۵$$

بر اساس جدول t با توجه به تعداد نمونه های مورد آزمایش (۳ نمونه) و درجه آزادی (۲) مقدار t مورد قبول با ضریب اطمینان ۹۵٪ برابر ۴/۳ است. کمتر بودن مقدار t محاسبه شده در این آزمایش (۰/۱۵) از مقدار t مجاز (۴/۳) نشان دهنده همخوانی و قابل قبول بودن نتایج است.

خطاهای دستگاه های خودکار شمارنده سلولی

اگرچه استفاده از دستگاه های شمارنده سلولی در آزمایشگاه ها در مقایسه با روشهای دستی، تکرارپذیری یا دقت نتایج حاصل را به میزان قابل توجهی بهبود بخشیده است، ولی صحت نتایج حاصل ممکن است به دلایل گوناگون همواره قابل اطمینان نباشد. بنابراین، کاربر دستگاه علاوه بر آشنایی با نحوه کار، نگهداری، کالیبراسیون و کنترل کیفی دستگاه، باید از تمام عللی که منجر به خطا در شمارش یا اندازه گیری پارامترهای خونی توسط دستگاه شمارنده می شود، نیز آگاه باشد. گروهی از این خطاها ناشی از نحوه طراحی دستگاه ها برای شمارش سلولها است، مثلاً عبور همزمان دو سلول از بین دو الکتروود که به ایجاد یک پالس و در نتیجه، شمارش یک سلول به جای دو سلول منجر می شود یا سلول هایی که پس از عبور از بین دو الکتروود و شمارش، دوباره به گردش بین الکتروودها وارد و مجدداً شمارش می شوند. در شرایطی نیز که بنا به دلایل مختلف آگلوتیناسیون گلبول های قرمز رخ می دهد، گلبولهای به هم چسبیده در دستگاه به عنوان یک سلول بزرگ شمارش می شوند. شمارش حباب های هوا، قطرات چربی، میکروارگانیسم ها یا ذرات خارجی به عنوان یک سلول نیز از موارد دیگر خطا در دستگاه ها هستند. در زیر به موارد دیگری که ممکن است بالقوه موجب اختلال در شمارش دستگاه شوند، اشاره می شود:

۱. افزایش شمارش گلبولهای سفید بیش از $10^3 \times 30$ معمولاً به دلیل ایجاد کدورت باعث افزایش کاذب، ولی جزئی در هموگلوبین و همچنین، افزایش کاذب هماتوکریت و MCV می شود.

۲. افزایش غلظت گلوکز بیش از 400 mg/dL و افزایش اسمولالیته خون ناشی از سایر علل ممکن است سبب افزایش کاذب MCV و هماتوکریت و کاهش MCHC شود.

برای رفع این خطا خون باید پیش از انجام آزمایش ده دقیقه با ایزوتون انکوبه شود.

۳. آگلوتینین های سرد با تیتراهای بالا، به طور کاذب باعث کاهش شمارش گلبولهای قرمز و افزایش MCV و MCHC می شوند که با گرم کردن خون یا محلول رقیق کننده این مشکل حل می شود.

۴. در بعضی از انواع لوسمی ها که گلبول های سفید شکننده هستند، شمارش آنها به طور کاذب کاهش نشان می دهد که در این موارد، شمارش با هماسیتومتر کمک کننده است.

۵. سطوح بسیار بالای چربی باعث کدرشدن پلاسما و در نتیجه افزایش کاذب مقدار هموگلوبین، MCH و MCHC می شود. برای حل این مشکل، اندازه گیری هموگلوبین باید به روش دستی و با افزودن حجم مناسبی از پلاسمای بیمار به بلانک و صفر کردن دستگاه اسپکتروفوتومتر با آن انجام شود.

در جدول های شماره ۴ تا ۱۰ ، به موارد بیشتری اشاره می شود که ممکن است به نادرست بودن نتایج دستگاه های شمارنده سلولی خودکار منجر شوند. کاربر دستگاه علاوه بر آشنایی با موارد مندرج در این جدول ها باید از نحوه رفع این خطاها نیز آگاه باشد.

جدول شماره ۴: برخی از دلایل خطا در شمارش‌های سلولی دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی

<ol style="list-style-type: none"> ۱. نمونه‌گیری از بیمار دیگر ۲. نمونه خون با برگه درخواست بیمار دیگر ۳. رقیق‌بودن نمونه ۴. استفاده از EDTA بسیار غلیظ ۵. غلیظ‌بودن نمونه به علت استفاده طولانی مدت از تورنیکه ۶. لخته‌شدن قسمتی از نمونه ۷. همولیز نمونه ۸. بیش از حد گرم یا منجمد کردن نمونه ۹. نمونه خون کهنه ۱۰. نمونه آلوده به چربی زیر جلد 	<p>خطا در جمع‌آوری یا ذخیره نمونه</p>
<ol style="list-style-type: none"> ۱. خطا در شست‌وشو و آماده‌سازی دستگاه ۲. مخلوط کردن ناکافی نمونه ۳. انسداد مسیر پروب دستگاه (به‌طور مثال، توسط لخته که از نمونه قبلی به جای مانده است) ۴. تداخل نمونه بسیار غیرطبیعی قبلی با نمونه فعلی (این مورد در دستگاه‌های جدید به حداقل رسیده است) 	<p>خطا در برداشت نمونه توسط دستگاه</p>
<p>استفاده از مواد کنترل به عنوان کالیبراتور یا خطا در تعیین دقیق مقادیر پارامترها برای روش کالیبراسیون</p>	<p>خطا در کالیبراسیون</p>
	<p>نگهداری نامناسب دستگاه، اختلال در عملکرد دستگاه به دلایل مختلف و اشکال در معرف‌ها</p>
<ol style="list-style-type: none"> ۱. تعیین میزان MCV کمتر از مقدار واقعی در صورت وجود گلبول‌های قرمز هیپوکروم در دستگاه‌های امپدانس ۲. ناتوانی شناسایی سلول‌ها در صورت کمبود آنزیم پراکسیداز 	<p>عدم صحت اندازه‌گیری دستگاه‌ها به دلیل ماهیت برخی روش‌های اندازه‌گیری که برای دستگاه طراحی شده</p>
<ol style="list-style-type: none"> ۱. خطا در تعیین میزان هموگلوبین و اندکس‌های گلبولی به دلیل وجود آگلوتینین‌های سرد یا افزایش چربی خون ۲. نوتروپنی کاذب در صورت کمبود آنزیم پراکسیداز 	<p>عدم صحت عملکرد دستگاه به دنبال وجود ویژگی‌های خاص در نمونه</p>

جدول شماره ۵: برخی از دلایل افزایش کاذب هموگلوبین

تعداد زیاد گلبول‌های سفید
افزایش چربی خون اندوژن یا به دلیل تغذیه از راه ورید
کرایوگلوبولینمی
پاراپروتئین یا هیپرگاماگلوبولینمی

جدول شماره ۶: برخی از دلایل ایجاد خطا در تعیین مقادیر MCH و MCHC

<p>۱. افزایش کاذب هموگلوبین</p> <p>۲. کاهش کاذب تعداد گلبول‌های قرمز</p> <p>۳. همولیز داخل عروقی با هموگلوبین آزاد در پلاسما</p>	افزایش کاذب MCH
<p>۱. افزایش کاذب هموگلوبین</p> <p>۲. همولیز داخل عروقی با هموگلوبین آزاد در پلاسما یا لیز گلبول‌های قرمز خارج بدن</p> <p>۳. کاهش کاذب هماتوکریت، MCV یا گلبول‌های قرمز</p> <p>۴. شرایط هیپواسمولار</p>	افزایش کاذب MCHC یا مشخص نشدن کاهش واقعی MCHC
<p>۱. افزایش کاذب MCV (غیر از مواردی که علت آن آگلوتینین‌های سرد باشد)</p> <p>۲. افزایش کاذب تعداد گلبول‌های قرمز به دلیل وجود تعداد زیاد پلاکت‌های ژانت</p> <p>۳. شرایط هیپراسمولار</p>	کاهش کاذب MCHC

جدول شماره ۷: برخی از دلایل ایجاد خطا در شمارش گلبول‌های قرمز، میزان هماتوکریت و MCV

<p>۱. وجود پلاکت‌های درشت به تعداد زیاد ۲. افزایش چربی خون (ناپایدار) ۳. کرایوگلوبولینمی ۴. کرایوفیبرینوژنمی</p>	<p>افزایش کاذب تعداد گلبول‌های قرمز</p>
<p>۱. پان‌آگلوتیناسیون ناشی از ایجاد آگلوتینین‌های سرد وابسته به EDTA ۲. لیز گلبول‌های قرمز خارج از بدن به دنبال نگهداری نامناسب نمونه یا وجود گلبول‌های قرمز غیرطبیعی ۳. میکروسیتوز بسیار شدید یا تکه‌تکه شدن گلبول‌های قرمز در بعضی بیماری‌ها</p>	<p>کاهش کاذب تعداد گلبول‌های قرمز</p>
<p>۱. نگهداری خون در دمای اتاق ۲. آگلوتینین‌های سرد و آگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز وابسته به EDTA ۳. تعداد زیاد گلبول‌های سفید ۴. شرایط هیپراسمولار ۵. EDTA₂ اضافی</p>	<p>افزایش کاذب MCV</p>
<p>۱. گلبول‌های قرمز هیپوکرومیک ۲. افزایش دمای اتاق ۳. شرایط هیپواسمولار ۴. مخلوط کردن مکرر نمونه که باعث افزایش اکسیژناسیون گلبول‌های قرمز می‌شود</p>	<p>کاهش کاذب MCV</p>
<p>۱. افزایش کاذب MCV (غیر از مواقعی که به دنبال آگلوتینین‌های سرد رخ می‌دهد) ۲. کاهش کاذب تعداد گلبول‌های قرمز</p>	<p>افزایش کاذب هماتوکریت</p>
<p>۱. کاهش کاذب میزان MCV ۲. کاهش کاذب گلبول‌های قرمز به دلیل میکروسیتوز بسیار شدید یا لیز گلبول‌های قرمز خارج بدن ۳. آگلوتینین سرد ۴. مخلوط کردن مکرر نمونه که باعث افزایش اکسیژناسیون گلبول‌های قرمز می‌شود</p>	<p>کاهش کاذب هماتوکریت</p>

جدول شماره ۸: برخی از دلایل ایجاد خطا در شمارش پلاکت

<ol style="list-style-type: none"> ۱. لخته شدن نسبی نمونه ۲. فعال شدن پلاکت‌ها در حین خون‌گیری و تجمع آنها ۳. تجمع پلاکتی ایجادشده توسط EDTA ۴. Platelet Satellitism ۵. پلاکت‌های ژانت که اندازه آنها از آستانه تعیین شده برای پلاکت‌ها بیشتر باشد 	<p>پایین بودن کاذب شمارش پلاکت‌ها</p>
<ol style="list-style-type: none"> ۱. گلبول‌های قرمز میکروسیت یا تکه‌تکه شده ۲. گلبول‌های سفید خرد شده ۳. بیماری هموگلوبین H ۴. کرایوگلوبولین ۵. هیپرتری گلیسریدمی یا هیپرلیپیدمی ۶. وجود میکروارگانیزم‌ها در نمونه خون ۷. گرم کردن ناخواسته خون 	<p>بالا بودن کاذب شمارش پلاکت‌ها</p>

جدول شماره ۹: برخی از دلایل کاهش کاذب تعداد گلبول‌های سفید

<p>لیز سلول‌ها به دلیل ماندن خون بیش از ۳ روز</p>
<p>نگهداری نمونه در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت</p>
<p>تجمع گلبول‌های سفید یا گلبول‌های سفید و پلاکت‌ها به دنبال وجود آنتی‌بادی یا تغییر در غشاء سلولی یا وجود سلول‌های نئوپلاستیک با ویژگی‌های غیرطبیعی (نظیر تجمع نوتروفیلی با واسطه آنتی‌بادی، تجمع سلول‌های لنغومی و یا سلول‌های نئوپلاستیک پلاسماسلی)</p>
<p>آگلوتینین‌های سرد قوی</p>

جدول شماره ۱۰: برخی از دلایل افزایش کاذب تعداد گلبول‌های سفید

وجود گلبول قرمز هسته‌دار
پلاکت‌های ژانت به تعداد زیاد
لیز شدن گلبول‌های قرمز
اورمی
نمونه از جنین یا نوزاد
هموگلوبین‌های غیرطبیعی (مثل AS, SS, AC, AE, AD, AO-Arab)
بیماری‌های کبدی
آگلوتینین‌های سرد
سندرم‌های میلودیسپلاستیک
آنمی مگالوبلاستیک
بعد از برداشتن طحال
تجمع پلاکتی
کرایوگلوبولینمی و کرایوفیبرینوژنمی
پاراپروتئینمی
وجود رشته‌های فیبرین
افزایش چربی خون
آلوده شدن نمونه به چربی زیرجلدی
وجود انگل مالاریا
هموگلوبین‌های ناپایدار

فصل سوم

روش های مرجع انجام آزمایش ها

اندازه گیری هموگلوبین به روش سیانو متهموگلوبین

روش شیمیایی اندازه گیری هموگلوبین در خون با روش سیانومتهموگلوبین، روش دستی اندازه گیری مرجع هموگلوبین است که برای کالیبراسیون دستگاه های شمارنده نیز کاربرد دارد. نکته های مهمی که هنگام انجام این آزمایش برای دستیابی به نتایج صحیح باید در نظر گرفته شوند:

- از ظرفهای شیشه ای استفاده شود که از نظر صحت در حد استاندارد (کلاس A) و از لحاظ شیمیایی تمیز باشند.
- از دقت و صحت عملکرد سمپلرها، اسپکتروفوتومتر و یا فتومتر با استفاده از برنامه های کنترل کیفیت اطمینان حاصل شود (تمام مستندات کنترل کیفیت ثبت شود).
- در صورت امکان، از درابکین با ترکیب توصیه شده CLSI (مؤسسه استاندارد آزمایشگاه بالینی)، که مقادیر لازم برای تهیه آن در زیر آمده است، استفاده شود.

KCN	0.05g
K3Fe (CN)	0.2g
KH2PO4 (Anhydrous)	0.140g
Nonionic Detergent	0.5-1ml
Clinical laboratory Reagent water(type I)	1000ml

- این معرف در مدت ۵ دقیقه تمام هموگلوبین ها را غیر از سولفوهموگلوبین به سیانومتهموگلوبین تبدیل میکند.
- کربوکسی هموگلوبین که در افراد سیگاری افزایش می یابد برای اکسید شدن به ۳۰ دقیقه زمان نیاز دارد.
- محلول درابکین را باید در ظرف های تیره در بسته از جنس بوروسیلیکات نگهداری نمود و در صورت مشاهده کدری دور ریخت.
 - هنگام استفاده از این محلول ها و دفع آنها، به علت سمی بودن، احتیاط های لازم باید از نظر ایمنی به کار رود.
 - از درابکین با ترکیبهای دیگر (غیر از فرمول بالا) نیز می توان استفاده نمود، ولی زمان کامل شدن واکنش طولانی تر و احتمال ایجاد کدری بیشتر است.
 - برای انجام آزمایش میتوان از نمونه خون مویرگی یا وریدی استفاده نمود، ولی استفاده از خون وریدی برتری دارد.
 - ضد انعقاد مناسب، نمکهای EDTA (دی سدیک یا دی پتاسیک) هستند که به مقدار $2/2 \text{ mg/ml}$ - $1/5$ به ازای هر میلیلیتر خون باید استفاده شوند.
 - پس از خونگیری، باید نمونه را بلافاصله با ضد انعقاد مخلوط نمود.
 - در صورت استفاده از $k3EDTA$ ، به دلیل ایجاد رقت در نمونه، میزان هموگلوبین تا ۱٪ کاهش نشان می دهد.

روش آزمایش

- در روش معمول اندازه گیری هموگلوبین به روش دستی 0.2 ml خون با 5 ml درابکین مخلوط و پس از طی مدت لازم برای کامل شدن واکنش، جذب نوری آن با فتومتر خوانده می شود.
- برای انجام آزمایش به منظور کالیبراسیون دستگاه شمارنده، از روش رقت زیاد استفاده می شود تا احتمال خطای ناشی از رقیق سازی کاهش یابد. برای اجرای این کار، میتوان از روشهای رقیق سازی زیر استفاده کرد:

- 0.4 ml خون با 10 ml درابکین یا

- 0.4 ml خون با 100 ml درابکین یا

- 0.1 ml خون با 25 ml درابکین.

نکته:

برای انجام آزمایش، به ویژه به منظور بررسی کالیبراسیون دستگاه شمارنده، استفاده از وسایل شیشه ای کلاس A و ابزار و تجهیزات کالیبره ضروری است.

در هر دو روش معمولی و با رقت زیاد، ابتدا نمونه خون توسط پیپت یا سمپلر با سرعت آهسته و ثابت کشیده می شود و پس از پاک کردن سطح خارجی پیپت یا سرسمپلر با پارچه بدون پرز، که با آب مقطر یا نرمال سالین مرطوب شده، داخل لوله آزمایش تخلیه می شود. نمونه باقیمانده در پیپت یا سرسمپلر، باید با ۸ تا ۱۰ بار برداشت

و تخلیه، با محتویات لوله کاملاً شسته شود. برای مخلوط شدن کامل خون و درابکین، پس از ۵ تا ۶ بار سروته نمودن لوله، باید محلول را برای کامل شدن واکنش پیش از خواندن جذب نوری، ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری نمود.

به منظور خواندن جذب نوری از فتومتر یا اسپکتروفوتومتر با طول موج ۵۴۰ nm استفاده می شود. در صورت استفاده از استاندارد هموگلوبین، جذب نوری این محلول نیز در طول موج ذکر شده خوانده شده و مقدار هموگلوبین برحسب گرم در لیتر از فرمول زیر محاسبه می شود:

$$\text{جذب نوری نمونه} \times \frac{\text{غلظت هموگلوبین استاندارد}}{\text{جذب نوری نمونه استاندارد}} = \text{غلظت هموگلوبین نمونه (g/L)}$$

برای رسم منحنی استاندارد هموگلوبین، ابتدا از محلول استاندارد، رقت های مختلف ۱/۲، ۱/۳ و ۱/۴ تهیه و جذب نوری آنها در طول موج ۵۴۰ nm مقابل بلانک (درابکین) خوانده می شود. پس از تعیین مقدار هموگلوبین هر رقت، روی کاغذ نمودار خطی مقادیر جذب نوری هر رقت روی محور عرضی (Y) و مقدار غلظت هموگلوبین هر رقت روی محور طولی (X) ثبت می شود. خطی که از مبدأ و نقاط تلاقی مقدار هموگلوبین و جذب نوری مربوط می گذرد، منحنی استاندارد نام دارد که می توان با استفاده از آن غلظت هموگلوبین نمونه ها را محاسبه کرد.

منابع خطا

- تکنیک نامناسب خونگیری وریدی که با تغلیظ نمونه سبب افزایش کاذب مقدار هموگلوبین و شمارش سلولی می شود؛
- استفاده از تجهیزات بدون سوابق کنترل کیفیت و کالیبراسیون؛
- آگاهی ناکافی کارکنان از نحوه صحیح انجام آزمایش و منابع خطا؛
- مخلوط نمودن ناکافی نمونه پیش از آزمایش؛
- وجود لخته در نمونه؛
- نگهداری در ابکین در مقابل نور یا یخ زدن؛
- استفاده از استاندارد خراب یا تاریخ مصرف گذشته (به ویژه اگر پس از باز شدن مدت طولانی در دمای اتاق بماند)؛
- کالیبراسیون نادرست اسپکتروفتومتر؛
- عملکرد نامناسب اسپکتروفتومتر ناشی از کافی نبودن زمان گرم شدن دستگاه یا بیش از حد گرم شدن دستگاه، اختلالات مربوط به منبع نوری، فتوسل، ولتاژ، خطی نبودن دستگاه، صحیح قرار نگرفتن کووت و یا استفاده از کووت کشیف یا خشدار.

روش اندازه گیری حجم سلولهای متراکم شده به روش میکروهماتوکریت

PCV نسبت حجم گلبول های قرمز متراکم شده به حجم خون کامل است. این نسبت پس از سانتریفوژ مناسب نمونه خون به دست آمده و ترجیحاً به صورت اعشاری گزارش میشود (مانند ۰/۴۲ به جای ۴۲٪). روش مرجع اندازه گیری حجم سلول های متراکم شده، روش میکروهماتوکریت است که برای کالیبراسیون دستگاههای شمارنده نیز استفاده می شود.

*نکته های مهم در آزمایش اندازه گیری حجم گلبولهای قرمز متراکم شده

- انجام آزمایش با استفاده از خون مویرگی، شریانی و وریدی امکان پذیر است.
- در جمع آوری نمونه به طریق مویرگی، از لوله های هپارینه حاوی حداکثر ۷ واحد هپارین به ازای هر لوله موئینه استفاده می شود.
- میتوان نمونه را پس از جمع آوری در دمای اتاق نگهداری و حداکثر در مدت ۶ ساعت پس از نمونه گیری آزمایش نمود.
- نمونه ها باید به روش دوتایی آزمایش شوند. مقدار هماتوکریت نمونه های دوتایی نباید بیش از ۰/۰۰۵ (۰/۰۵٪) با یکدیگر اختلاف داشته باشند.
- در صورت انجام این آزمایش، به منظور کالیبراسیون دستگاه شمارنده فقط باید از ضد انعقاد k2EDTA استفاده شود تا از چروکیدگی گلبولهای قرمز جلوگیری شود. استفاده از ضد انعقاد k3EDTA به علت ایجاد

چروکیدگی در گلبولهای قرمز میزان MCV را ۲٪ کاهش می دهد. در صورت استفاده از ضد انعقاد مایع، ضریب رقت باید محاسبه شود.

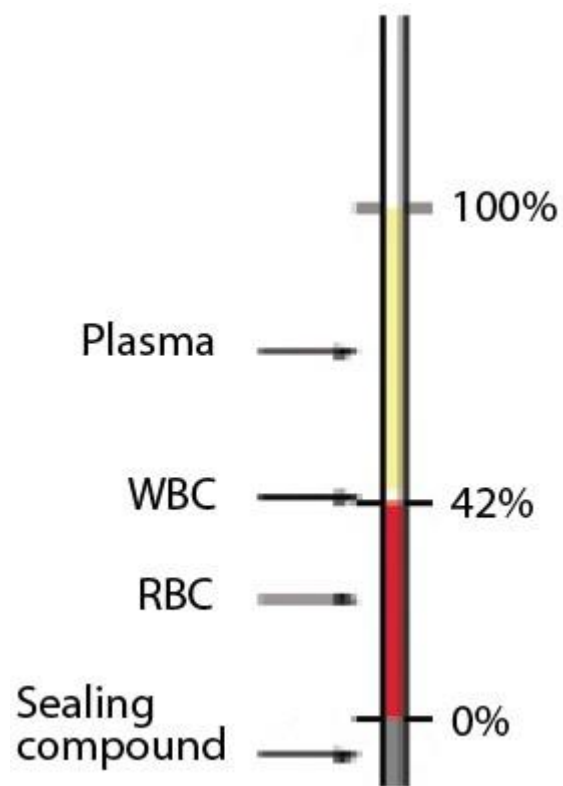
- توصیه میشود برای انجام آزمایش کالیبراسیون دستگاه شمارنده از لوله های مویینه با حلقه آبی (بدون ضد انعقاد) استفاده شود.

- هنگام خواندن نتیجه با خط کش مخصوص، مقدار بافی کوت در نظر گرفته نشود.

- خطای قابل قبول اندازه گیری حجم سلول های متراکم شده به روش میکروههماتوکریت ۱٪± است.

روش آزمایش

۲/۳ تا ۳/۴ طول لوله میکروههماتوکریت باید از خون کامل، که پیش از آن حداقل ۸ بار سروته شده است، پر و با خمیر مخصوص مسدود شود. طول خمیر نباید از ۴ mm کمتر و سطح آن نیز باید کاملاً صاف باشد. از هر نمونه خون باید دو لوله به این روش پر شده و روبه روی هم در دستگاه میکروههماتوکریت قرار گیرد. با تنظیم زمان سنج دستگاه سانتریفوژ نمونه ها انجام شده و پس از طی مدت تعیین شده نتیجه آزمایش حداکثر ۱۰ دقیقه پس از توقف دستگاه و با استفاده از خط کش هماتوکریت خوانده می شود. باگذشت زمان و باقی ماندن لوله ها به صورت افقی، حدفاصل پلاسما و سلول به تدریج شیبدار و خواندن نتیجه با مشکل مواجه می شود.



تصویر شماره ۶: نمای شماتیک از نمونه هماتوکریت پس از سانتریفوژ

منابع خطا

- توقف جریان خون به علت بستن طولانی تورنیکه که باعث افزایش غلظت خون می شود؛
- خونگیری های سخت و طولانی به دلیل ورود مایع بین بافتی به فضای داخل عروقی که باعث رقیق یا لخته شدن خون می شود؛
- همولیز در اثر استفاده از سرسوزن نازک؛
- مخلوط نشدن نمونه با ضد انعقاد؛

- پر یا مسدود کردن نادرست انتهای لوله هماتوکریت؛
- مسدود کردن انتهای لوله با حرارت؛
- خطای دید هنگام خواندن نتیجه آزمایش؛
- محاسبه بافی کوت به عنوان جزئی از ستون گلبولهای قرمز هنگام خواندن نتیجه آزمایش؛
- خطای به دام افتادن پلاسما که این مورد در آنمی های ماکروسیتیک کم و در اسفروسیتوز، تالاسمی و آنمی سیکل سل زیاد است. در حالت طبیعی، میزان پلاسمای به دام افتاده ۱٪ تا ۳٪ است که هنگام کالیبراسیون دستگاه شمارنده باید ۲٪ در نظر گرفته شود.

جدول شماره ۱۱: علل کاهش و افزایش کاذب هماتوکریت

علل کاهش کاذب میزان هماتوکریت	علل افزایش کاذب میزان هماتوکریت
EDTA اضافی	هیپوناترمی
همولیز	به دام افتادن پلاسما
هیپرناترمی	

ویژگیهای دستگاه میکروهما توکریت استاندارد

- شعاع چرخش بیشتر از 8cm
- توانایی رسیدن به حداکثر سرعت در 30 ثانیه؛
- توانایی ایجاد RCF حدود 10000 g تا 12000 g در محیط، حداقل به 5 دقیقه بدون افزایش دما از 45°C
- داشتن زمان سنج خودکار (با قابلیت تنظیم حداقل 30 ثانیه).

$$RCF = 1/118 \times 10^{-5} \times r \times RPM^2$$

RCF: میدان نسبی سانتریفوژ

RPM: دور در دقیقه

کنترل کیفیت و بررسی کالیبراسیون دستگاه میکروهماتوکریت

دستگاه میکروهماتوکریت باید توانایی ایجاد حداقل نیرویی برابر با ۱۰۰۰۰ g به مدت ۵ دقیقه را دارا باشد.

کنترل کیفیت دستگاه باید هر سه ماه انجام شود. برای انجام این کار بررسی موارد زیر ضروری است:

- سرعت سانتریفوژ،
- زمانسنج،
- حداکثر توان در تجمع سلول ها

سرعت سانتریفوژ (دور در دقیقه) و عملکرد زمانسنج دستگاه به ترتیب با تاکومتر کالیبره و کرومومتر ارزیابی می شوند. برای بررسی حداکثر توان دستگاه در تجمع سلولها از خون تازه استفاده می شود.

برای انجام این امر دو نمونه خون تازه حاوی ضد انعقاد EDTA دی پتاسیک که به خوبی مخلوط شده اند را به صورت دوتایی به مدت دو دقیقه سانتریفوژ کرده و مقادیر PCV آنها ثبت میشود. سپس، زمان سانتریفوژ را ۳۰ ثانیه به ۳۰ ثانیه افزوده تا زمانی که میزان دو هماتوکریت اندازه گیری شده پی در پی بدون تغییر بماند. این زمان به عنوان حداقل زمان لازم برای متراکم نمودن گلبول های قرمز در نظر گرفته می شود. این آزمایش بهتر است حداقل با یک نمونه دارای هماتوکریت ۰/۵ (۰/۵۰) یا بیشتر نیز انجام شود.

جدول شماره ۷۱ مثالی است از ارزیابی حداکثر توان یک دستگاه میکروهماتوکریت در تجمع سلولها.

این مورد پس از خرید و پیش از شروع به کار با دستگاه و حداقل هر ۶ ماه یکبار باید انجام شود^{۱۶}.

جدول شماره ۱۲: بررسی دستگاه از نظر حداکثر توان تجمع سلولی

زمان (دقیقه)	PCV	
	نمونه ۱	نمونه ۲
۲	۰/۴۹	۰/۵۹
۲/۵	۰/۳۹	۰/۵۸
۳	۰/۳۸	۰/۵۷
۳/۵	۰/۳۸ (حداقل زمان برای تجمع سلول‌ها)	۰/۵۶
۴	—	۰/۵۵
۴/۵	—	۰/۵۵ (حداقل زمان برای تجمع سلول‌ها)

داده های جدول بالا نشان می دهد که زمان متراکم نمودن گلبول های قرمز در دستگاه میکروهما توکریت مورد آزمایش، ۳/۵ دقیقه برای آزمایش نمونه های با میزان هماتوکریت کمتر از ۰/۵ و ۴/۵ دقیقه برای نمونه ای با هماتوکریت بیشتر از ۰/۵ است.

ارزیابی عملکرد دستگاه میکروهما توکریت به روش توصیه شده سازمان جهانی بهداشت به صورت زیر انجام می شود:

- چند نمونه خون با هماتوکریت کمتر از ۰/۵ و حاوی ضد انعقاد EDTA دی پتاسیک (۱/۵ mg برای هر میلی لیتر خون) را پس از بیست بار سروته نمودن ظرف نمونه، به صورت دوتایی به مدت ۳، ۵، ۷، ۹

و ۱۱ دقیقه سانتریفوژ کرده و سپس نتایج آنها ثبت می شود. در صورت مناسب بودن توان دستگاه) برحسب (g نتایج باید از دقیقه ۵ به بعد بدون تغییر بماند.

- برای بررسی ابزار خواندن هماتوکریت میتوان لوله هماتوکریتی که طول ستون سلول و پلاسما آن مجموعاً حدود ۵cm و PCV آن ۰/۵ بوده را انتخاب کرد و روی خط کش معمولی طوری قرارداد که ابتدای ستون گلبول قرمز روی نقطه صفر و انتهای ستون سلول و پلاسما روی ۵ cm باشد. قرار گرفتن انتهای بالایی ستون گلبولهای قرمز روی ۲/۵ cm نشان دهنده صحت خواندن توسط ابزار خواندن هماتوکریت مورد استفاده است.

شمارش سلولهای خونی به روش دستی

شمارش گلبولهای سفید و پلاکت ها به روش دستی، جایگزین قابل قبولی برای دستگاه های شمارنده سلولی است، ولی برای شمارش گلبول های قرمز کاربرد زیادی ندارد؛ زیرا در آزمایشگاه ها در شرایط معمول برای شمارش های دستی، حدود ۴۰۰ گلبول قرمز شمارش شده که موجب عدم دقت زیاد در شمارش این سلولها می شود.

برای شمارش سلولهای خونی به روش دستی از هماسیتومتر(نئوبار اصلاحشده) استفاده میشود که بر روی آن ۹ فضای خطکشی شده با مساحت $1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$ تعبیه شده است. پس از قرار گرفتن لامل سنگین (دارای سطح صیقلی) روی آن فضایی با حجم 4 mm^3 ایجاد می شود.

هماسیتومتر و لامل سنگین پس از هر بار استفاده باید بلافاصله با آب گرم شسته شده و با پارچه تمیز بدون پرز پاک و در هوا خشک شود. سطح این لام نباید با گاز یا پارچه زبر تماس داده شود؛ زیرا باعث خراشیدگی خطوط روی لام می شوند. نمونه مورد آزمایش پس از رقیق شدن، کاملاً مخلوط شده و به وسیله پیپت در فضای هماسیتومتر زیر لامل سنگین وارد می شود. پراکندگی سلول ها باید با عدسی $\times 10$ بررسی شده و سپس، با عدسی شیئی $\times 40$ و عدسی چشمی $\times 10$ یا $\times 6$ شمارش انجام شود. (به طور معمول، از عدسی شیئی $\times 10$ برای شمارش گلبولهای سفید و از عدسی شیئی $\times 40$ برای شمارش پلاکتها استفاده می شود).

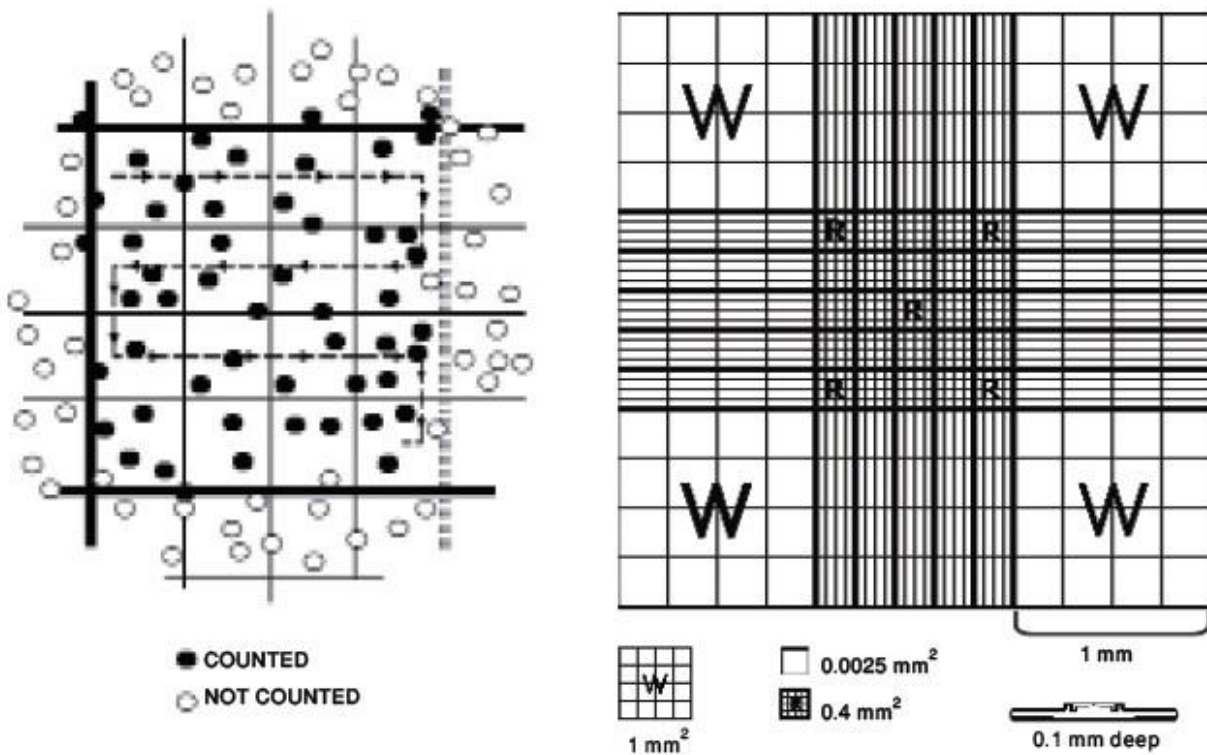
شمارش گلبولهای سفید

برای شمارش گلبولهای سفید، خون حاوی ضد انعقاد EDTA با محلول حاوی ماده رنگی مخلوط می شود که علاوه بر لیز گلبول های قرمز، هسته گلبول های سفید را نیز به رنگ بنفش سیاه درمی آورد. برای انجام این

آزمایش استفاده از ضد انعقاد هیپارین توصیه نمی شود. محلول رنگی با استفاده از اسید استیک ۲٪ (۲۰ ml/L) تهیه می شود که با اضافه نمودن چند قطره ویوله دوزانسیان به رنگ بنفش درآمده است.

روش آزمایش

برای انجام آزمایش، در لوله آزمایش پلاستیکی یا شیشه ای، ۱ ml از خونی که به خوبی مخلوط شده به ml ۱/۹ محلول رقیق کننده اضافه می شود تا رقت ۱/۲۰ ایجاد شود (مخلوط کردن ناکافی خون پیش از تهیه رقت، موجب خطای زیاد در نتیجه آزمایش میشود). پس از بستن دهانه لوله، با استفاده از مخلوط کننده های مکانیکی یا سروته نمودن آن با دست با زاویه ° ۱۲۰ و چرخاندن همزمان به مدت ۲ دقیقه، محتویات لوله کاملاً مخلوط می شود. با این کار، حباب های هوا نیز با محلول مخلوط می شوند. سپس، بلافاصله با استفاده از پیپت یا لوله موئینه، فضای زیر لامل ضخیم در هماسیتومتر در یک مرحله از این مخلوط پرمی شود. به منظور ته نشین شدن سلول ها، هماسیتومتر باید به مدت ۲ دقیقه روی سطحی صاف، بدون لرزش و دور از نور خورشید و حرارت نگهداری و سپس، شمارش سلول ها انجام شود. گلبول های سفید باید در چهار مربع کناری و در دو طرف محفظه شمارش شوند. در این مربع ها، علاوه بر شمارش گلبول های داخل این فضا، گلبول هایی که روی اضلاع بالایی و سمت چپ هستند نیز شمارش می شوند؛ ولی گلبول های روی اضلاع سمت راست و پایینی مربع در شمارش به حساب نمی آیند.



تصویر شماره ۱ : نمایی از فضا‌های هماسیتومتر به کاررفته برای شمارش گلبولهای سفید

در صورت ایجاد هر یک از مشکلات زیر هنگام پر کردن هماسیتومتر، شمارش باید با استفاده از لام خشک و تمیز دیگری انجام گیرد:

- پر کردن بیش از حد اسلاید و سرریز شدن آن؛
- پر نشدن کامل محفظه ها از محلول؛
- ایجاد حباب هوا در هر قسمت محفظه؛
- هرگونه ذره اضافی در محفظه ها.

طبق توصیه سازمان جهانی بهداشت، حداقل ۱۰۰ گلبول سفید باید شمارش شود، ولی برای دستیابی به عدم دقت (CV) ۵٪، شمارش ۴۰۰ سلول الزامی است. برای به حداقل رساندن خطای ناشی از پراکندگی نامناسب سلول ها، توصیه هم می شود که شمارش گلبول های سفید در کل فضای خط کشی شده هماسیتومتر (۹ فضای ۰/۱ میکرولیتر) انجام گیرد.

برای محاسبه تعداد گلبول های سفید می توان از فرمول زیر استفاده نمود:

$$WBC/L = \frac{10 \times 10^6 \times \text{ضریب رقت} \times \text{تعداد سلول های شمارش شده}}{\text{تعداد مربع های بزرگ شمارش شده}}$$

برای مثال، اگر در ۰/۹ میکرولیتر (۹ فضای خط کشی شده) ۴۲۰ گلبول سفید شمارش شود، تعداد کل گلبول های سفید به طریق زیر محاسبه می شود:

$$\frac{420 \times 20 \times 10^6 \times 10}{9} = 9.3 \times 10^9 /L$$

شمارش پلاکت

شمارش پلاکت ها روی خون وریدی حاوی ضد انعقاد EDTA انجام پذیر است. شمارش با استفاده از خون مویرگی نیز انجام می شود، ولی تعداد پلاکت ها نسبت به خون وریدی کمتر و شمارش آن نیز ناپایدارتر است؛ زیرا تعداد متفاوتی از پلاکتها در محل سوراخ کردن پوست باقی می ماند.

روش آزمایش

محلول رقیق کننده حاوی اکسلات آمونیوم آبی ۱٪ (۱۰ g/L) است که موجب لیز گلبول های قرمز می شود. پیش از تهیه رقت باید از نبود لخته در نمونه اطمینان حاصل کرد. در صورت وجود لخته، باید دوباره نمونه گیری انجام شود. برای تهیه رقت ۱/۲۰، ۰/۱ ml خون کاملاً مخلوط شده با ۱/۹ ml محلول رقیق کننده مخلوط می شود، این مخلوط باید به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه روی مخلوط کننده مکانیکی قرار گیرد. سپس، هماسیتومتر با روش ذکر شده برای شمارش گلبول های سفید از این مخلوط پر و برای ته نشین شدن پلاکت ها، حداقل ۲۰ دقیقه در ظرف پتری که کف آن کاغذ صافی مرطوب قرارداده شده نگهداری می شود. پس از گذشت مدت ذکر شده، پلاکت ها با میکروسکوپ شمارش می شوند. در صورت پایین بردن کندانسور میکروسکوپ، پلاکت ها به صورت ذرات کوچک درخشانی قابل رؤیت هستند. به طور معمول، پلاکت ها در مربع مرکزی هر محفظه شمارش می شوند، ولی شمارش پلاکت ها باید در یک یا بیشتر از فضاهای ۱ mm² (حجم ۰/۱ میکرولیتر) انجام شود. برای دستیابی به عدم دقت ۰/۸٪ تا ۱۰٪، شمارش حداقل ۲۰۰ پلاکت الزامی است.

$$PLT/L = \frac{10^6 \times 10 \times \text{تعداد سلول های شمارش شده}}{\text{تعداد مربع های بزرگ شمارش شده}}$$

منابع خطا

این خطاها به دو گروه تکنیکی (مربوط به روش آزمایش) و ذاتی تقسیم می شوند:

۱. خطاهای تکنیکی

- خطاهای جمع آوری نمونه؛
- مخلوط نکردن کامل نمونه؛
- پیپت کردن نادرست (استفاده از پیپت و هماسیتومتر غیر کالیبره و غیراستاندارد)؛
- استفاده از لامل عادی به جای ضخیم (سنگین)؛
- مخلوط نکردن کافی نمونه با رقیق کننده؛
- پر کردن نادرست اسلاید؛
- شمارش نادرست سلول ها.

۲. خطاهای ذاتی

این خطاها به پراکندگی غیریکنواخت سلولها در نواحی مختلف اسلاید مربوط است که با مخلوط نمودن کافی محلول پیش از پر کردن محفظه های اسلاید نیز برطرف نمی شود. فقط شمارش سلول ها به تعداد زیاد میتواند این خطا را کاهش دهد.

جدول زیر میزان پراکندگی نتایج شمارش دستی گلبولهای سفید را در مقایسه با تعداد سلولهای شمارش شده نشان می دهد. با افزایش تعداد سلول های شمارش شده، میزان پراکندگی نتایج کاهش می یابد.

جدول شماره ۱۶: میزان پراکندگی شمارش دستی در مقایسه با تعداد کل سلولهای شمارش شده

تعداد مربع های شمارش شده در هموسیئومتر	تعداد سلول های شمارش شده	قطعیت نداشتن تعداد سلول های شمارش شده	قطعیت نداشتن شمارش سلول ها در میکرولیتر
۱	۵۰	۶۴ - ۳۶	۱۲/۸ - ۲/۷
۲	۱۰۰	۱۲۰ - ۸۰	۱۲ - ۸
۴	۲۰۰	۲۲۸ - ۱۷۲	۱۱/۴ - ۸/۶
۶	۳۰۰	۳۳۴ - ۲۶۶	۱۱/۱ - ۸/۹
۸	۴۰۰	۴۴۰ - ۳۶۰	۱۱ - ۹
۱۰	۵۰۰	۵۴۴ - ۴۵۶	۱۰/۸ - ۹/۲
۱۶	۸۰۰	۸۵۶ - ۷۴۴	۱۰/۶ - ۹/۴
۲۰	۱۰۰۰	۱۰۶۴ - ۹۳۶	۱۰/۶ - ۹/۴
۳۰	۱۵۰۰	۱۵۷۸ - ۱۴۲۲	۱۰/۶ - ۹/۴
۲۰۰	۱۰۰۰۰	۱۰۲۰۰ - ۹۸۰۰	۱۰/۲ - ۹/۸

1. Clinical Laboratory Diagnosis and Management by Laboratory Method; Henry, M.D.; 21th edition; 2006.
2. Practical Hematology; Dacie & Lewis; 10th edition; Churchill-Livingston; .6002
3. Clinical Hematology Theory and Procedures; Mary Louise Turgeon; 4th edition; Lippincott Williams & Wilkins; 2004.
4. Blood Cells a Practical Guide; Barbara, J. Bain; 3th edition; Black Well Science; 2002.
5. Procedure for Determining Packed Cell Volume by Microhematocrit Method; Approved Standard; (CSLI) H7-A3-2006.
6. Guidelines on Standard Operating Procedures for Hematology-HTML Document ; Available from www.WHO.net; Chapter 6, 7 & 8.
7. Reference and Selected Procedures for Quantitative Determination of Hemoglobin in blood, (CLSI) H15-A3-2006.
8. Calibration and Quality Control of Automated Hematology Analyzers; Proposed Standard; (CLSI) H38-P-.6002
9. Quality Assurance in Hematology; WHO; 1998.
10. WHO/LAB/92.8. 11. WHO/LAB/98.3.

۱۱. داهیم پ، دستگاه های خودکار شمارنده سلولی (اساس کار، کالیبراسیون، کنترل کیفیت و خطاها)، اول،

مرکز نشر صدا، تهران، ۱۳۷۲،