معاونت درمان

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج

کنترل کیفی خارجی

Table of Contents

اصول صحیح کنترل کیفی ۱

اتوآنالایزردر آزمایشگاه بیوشیمی ۳

انواع اتوآنالایزر ۳

کنترل متغییرها در بخش مرحله انجام آزمایش ٦

کنترل کیفیت آماری ٦

انتخاب مواد کنترلی ٦

خطای مجاز ۸

روشهای تعیین مقادیر خطای مجاز: ۹

نمودار کنترلی ۱۰

اجرای کنترل داخلی کیفیت ۱۱

تفسیر نتایج ۱٤

چارت کنترلی Levey-Jenning ۱٤

۲- تفسیر چارت کنترلی با قوانین چندگانه وستگارد ۱٦

قوانین WHO ۲۲

انواع خطا ۲٤

اقدامات اصلاحی ۲٤

خطای راندوم ۲٥

خطای سیستماتیک ۲٥

چارت کنترل تجمعی Cumulative Sum (Cusum) Control chart ۲٦

کنترل کیفیت بر اساس نتایج آزمایش بیماران ۲۹

روشهای آماری برای پایش میانگین نتایج بیماران ۳۲

بررسی هماهنگی نتایج آزمایشگاه با تشخیص نهایی ۳۲

اصول کنترل کیفی در آزمایشگاه خونشناسی ۳۳

برنامه‌های دائمی: ۳۳

برنامه‌های روزانه: ۳۳

اصول کار با دستگاه‌های سل‌کانتر ۳۳

محلول‌های سل‌کانتر ۳٤

کالیبراسیون و کنترل کیفیت سل‌کانتر ۳۵
کالیبراسیون ۳۵
کنترل کیفیت ۳۶
دستگاه میکرو هماتوکریت ۴۱
کنترل کیفی وبررسی کالیبراسیون دستگاه میکرو هماتوکریت ۴۲
کنترل کیفی آزمایشات انعقادی ۴۳
اصول صحیح کنترل کیفی در آزمایشگاه میکروب‌شناسی ۴۵
تهیه و کنترل کیفیت محیط های کشت ۴۵
نکات عمومی در مورد محیط های کشت: ۴۵
کنترل کیفی محیط های کشت میکروبی: ۵۰
اصطلاحات مربوط به سویه های میکروبی کنترل ۵۰
منبع سویه‌های کنترل: ۵۰
روش انجام آزمون کنترل کیفیت محیطهای کشت ۵۰
بررسی آزمایشهاي عملکردی محیط کشت (Performance testing) ۵۱
کنترل محیط های ساخته شده تجاری (آماده مصرف): ۵۲
بررسی آلودگی محیط های کشت (استریل بودن محیط های کشت): ۵۲
تفسیر نتایج: ۵۲
سایر معیارهای تضمین کیفیت: ۵۳
اصول صحیح کنترل کیفی در آزمایشات کیفی: ۵۶
تفسیر نتایج برنامه کنترل کیفی خارجی ۵۷
مراحل کار تفسیر نتایج EQA : ۵۹
منابع ۶۲

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 می‌باشد. 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 نشان‌دهنده 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 فعالیت‌ها را در بر می‌گیرد که اجرای آن‌ها در یک قالب منسجم برای رسیدن آزمایشگاه به کیفیت مطلوب لازم می‌باشد.

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

۱) تغییرات بیولوژیک / فیزیولوژیک در بدن فرد
۲) مواد مداخله‌گر مثل داروها
۳) متغییرهای پیش از انجام آزمایش (Preanalytic) مانند جمع‌آوری، انتقال، آماده‌سازی و نگهداری نمونه‌ها
۴) متغیرهای حین انجام آزمایش (Analytic)
۵) 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 آزمایشگاه‌ها 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 جمع‌آوری نمونه ادرار ۲۴ ساعته یا آزمایش خون مخفی در مدفوع به بیمار توصیه می‌شود)، نمونه‌گیری ناصحیح(ظرف یا نگهدارنه نامناسب، آلودگی در زمان نمونه‌گیری، بستن تورنیکه به مدت طولانی، اندازه سوزن، شرایط خوابیده و ایستاده و ...)، برچسب‌گذاری غلط، آماده‌سازی و نگهداری نامناسب (سانتریفیوژ یا دمای نامناسب نگهداری،...).

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

۱. کنترل پرسنل
۲. کنترل معرفها، کیت‌ها و مواد مصرفی
۳. کنترل دستگاه‌ها و وسائل
۴. کنترل روش کار(SOP)

کنترل کیفیت آماری 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 می-شوند.

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 می‌شوند.

برای این‌که از بروز این‌گونه خطاها جلوگیری نماییم بایستی دستورالعمل‌های پذیرش، نمونه‌گیری، 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 می‌شود در اختیار آن‌ها نیز قرار گیرد. ثبت غلط نتیجه آزمایش در برگه‌های جوابدهی و جابجایی نتایج از خطاهایی هستند که در بخش پس از انجام آزمایش (Postanalytic) رخ می‌دهند و با آموزش کارکنان و کنترل نتایج به حداقل رسانیده می‌شود.

خطاهایی که در قسمت حین انجام آزمایش (analytic) صورت می‌گیرد مواردی مانند کالیبراسیون نامناسب سیستم، اشکال در روش آزمایشگاهی مورد استفاده و ... می‌باشد.

موضوع اصلی که در این دستورالعمل‌ها مورد توجه قرار می‌گیرد روش‌های شناسایی و نحوه برخورد با این خطاها می‌باشد.

گام نخست برای اینکه از تجهیزات آزمایشگاه به نحو احسن استفاده نماییم، مطالعه کاتالوگ‌ها و انجام دستورالعمل‌های نگهداری و کنترل کیفیت مندرج در آن می‌باشد و مطالبی که در ذیل آورده می‌شود جنبه عمومی داشته و به هیچ عنوان جایگزین دستورالعمل سازنده آن تجهیز نمی‌شود.

اتوآنالایزردر آزمایشگاه بیوشیمی

اتوآنالایزر در بیوشیمی بالینی ابزارهایی هستند که در بررسی بیوشیمیایی کمیت‌ها را با حداقل دخالت اپراتور انجام می‌دهد.

انواع اتوآنالایزر

اتوآنالایزر بر اساس ماهیت معرف مورد استفاده به اتوآنالایزرهای با معرف مایع و بدون معرف مایع مانند سیستم‌های Kodak ,Ektachem, Vitros, Opus تقسیم‌بندی می‌شوند. سیستم‌های با معرف مایع در ایران رایج‌تر بوده و به همین علت در این دستورالعمل مورد بحث قرار گرفته‌اند.

ساختمان کلی اتوآنالایزرهای با معرف مایع، شامل قسمت‌های زیر می‌باشد:

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 سیستم‌های Discrete Analyzer نمونه توسط Probe به محفظه واکنش خاص انتقال می‌یابد.

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 کمیت‌ها باید به غلظت مناسب کالیبراتور نیز توجه داشت به‌طور مثال برای کالیبراسیون HDL بایستی از کالیبراتور مخصوص همین کیت استفاده نمود، نه از کالیبراتور کلسترول توتال.
- ✓ استفاده از کالیبراتور و کنترل‌های مورد توصیه سازنده کیت یا استفاده از کالیبراتور و کنترل‌های هماهنگ.
- ✓ عدم تغییر فاکتور اعلام شده سازنده کیت برای آنزیم، این عمل که ممکن است به منظورتصحیح 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 می‌گردد.

نگهدای و کنترل کیفیت اتوآنالیزر

برای حفظ کیفیت عملکرد اتوآنالیزر لازم است کلیه موارد یادشده 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 می‌شود.

سنجش عملکرد پروب‌ها:

تست‌هایی انجام می‌شود که برای انجام آن‌ها کمترین و بیشترین حجم نمونه لازم باشد(مانند تست پروتئین در سیستم‌های RA) سپس یک نمونه کنترل ۳۰ بار مورد اندازه‌گیری پروتئین قرار می‌گیرد و پرکندگی 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 می‌گیرد که به تغییرات دما حساس است مثل اندازه‌گیری تست ALT . سپس یک نمونه کنترل ۳۰ بار مورد اندازه‌گیری ALT قرار می‌گیرد 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 اندازه‌گیری می‌کنند استفاده نمود. به‌طور مثال LDH و ALT که یکی افزایش و دیگری کاهش NADH را اندازه‌گیری می‌کند.

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

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

میزان پراکندگی نتایج اندازه‌گیری LDH بر حسب CV اندازه‌گیری می‌شود.

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

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

انتقال ناخواسته نمونه با انجام آزمایش بر روی نمونه‌های با غلظت بالا و پایین کمیت‌های انتخابی، به‌طورمتوالی بررسی می‌شود. به‌طور مثال گلوکز با غلظت‌های ۵۰ و ۵۰۰ میلیگرم درصد و یا ALT در غلظت‌های بالا و پایین انتخاب شده به‌طور متناوب هر یک از نمونه‌های با غلظت‌های پایین (L) و بالا (H) سه بار مورد آزمایش قرار می‌گیرد.

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

پراکندگی نتایج غلظت‌های پایین مورد محاسبه قرار می‌گیرد.

سپس در یک‌سری کاری مجزا، نمونه با غلظت پایین به تنهایی و به دفعات اندازه‌گیری 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 کمیت‌هایی که اندازه‌گیری می‌شود با دستگاه جهت بررسی قابلیت تکرار و عضویت در برنامه ارزیابی خارجی کیفیت EQAS جهت بررسی صحت عملکرد دستگاه اتوآنالیزر الزامی می‌باشد.

برای بررسی کامل‌تر عملکرد دستگاه‌های اتوآنالیزر می‌توان به دستورالعمل‌های ECCLS و CLSI رجوع نمود.

کنترل متغییرها در بخش مرحله انجام آزمایش

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

۱) استفاده از نمونه کنترل و تعمیم نتایج آن به جواب آزمایش‌های بیماران.

۲) استفاده از نتایج بیماران (دلتا چک، آزمایش‌های مضاعف و ...).

کنترل کیفیت آماری

در کنترل کیفیت آماری نمونه کنترلی به‌عنوان نماینده‌ای از یک گروه از نمونه‌های بیماران مورد آزمایش قرار می‌گیرد و نتایج آن با مقادیر مورد انتظار که اغلب به‌صورت یک محدوده بیان می‌گردد، مقایسه می‌گردد. اگر نتایج آزمایش نمونه کنترل در این محدوده باشد نتایج آزمایش‌های بیماران نیز قابل قبول می‌باشد ولی اگر نتیجه نمونه کنترلی در این محدوده قرار نگیرد جواب‌های 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.

۱) 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 می‌دهد تا مواد کنترلی مورد نیاز خود را برای مدت مشخص، یک‌جا تهیه نماید(بهتر است مواد کنترلی برای مصرف یک‌سال، خریداری شود).

۲) مشابهت با نمونه انسانی مورد آزمایش: بهتر است کنترل با توجه به نمونه انسانی مورد آزمایش انتخاب شود. به‌عنوان مثال کنترل‌های با پایه سرم، ادرار، خون، CSF و ... .

۳) 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.

۴) یکنواختی: ویال‌های مختلف کنترل بایستی هموژن بوده و غلظت متغییرهای موجود در آن‌ها یکسان باشد.

۵) بسته‌بندی مناسب: ویال بدون نشتی بوده و به حجم رسانیدن و نگهداری کنترل با سهولت انجام شود.

۶) قیمت ارزن و تعداد زیاد مصرف‌کنندگان.

۷) 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 کنترل‌های لیوفیلیزه ممکن است منجر به بروز مشکلاتی شود درحالی‌که کنترل‌های مایع آماده مصرف هستند. در عین حال موادی که در کنترل‌های مایع وجود دارند ممکن است در برخی روش‌ها تداخل نموده و باعث خطا شود.

برای کنترل داخلی کیفیت، بهتر است حدالامکان دو غلظت مختلف از کنترل استفاده شود. انتخاب غلظت-های نزدیک به محدوده تصمیم‌گیری بالینی (Decision level) ارجح می‌باشد. مانند غلظت ۱۲۶ و ۲۰۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر برای گلوکز. برخی پیشنهاد می‌نمایند 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 اندازه‌گیری 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 نمی‌توان به‌عنوان کالیبراتور استفاده شود. کالیبراتور ماده‌ای است که برای کالیبراسیون روش‌های آزمایشگاهی به‌کار می‌رود و دارای مقدار مشخصی است درحالی که مواد کنترلی برای کنترل کیفیت روش‌های آزمایشگاهی به‌کار می‌رود و اغلب دارای محدوده غلظتی می‌باشد

نکته۲: در خرید کالیبراتور و مواد کنترلی به همخوانی معرف با کالیبراتور و کنترل تجاری توجه داشته باشید. این موضوع را می‌توانید 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.

خطای مجاز

تعیین خطای مجاز برای اجرای فرایند کنترل داخلی کیفیت در بخش آنالیتیک اولین قدم می‌باشد. با وجود تمامی تلاش‌ها، وجود خطا در آزمایشگاه‌ها اجتناب ناپذیر می‌باشد. به‌طوری‌که 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 می‌رسد. پس مسئول آزمایشگاه می‌بایست 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.

به‌عنوان مثال عدم دقت مجاز برای کلسترول و برحسب CV% معادل ۲٪ در نظر گرفته شود، میزان پراکندگی نتایج برای غلظت ۲۰۰mg/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 ۲۰۰mg/dl چند بار اندازه‌گیری شود، نتایج در محدوده ۲۰۰±۸mg/dl یعنی mean± 2SD قرار خواهد گرفت.

خطای مجاز بایستی به‌صورت واقع‌بینانه و براساس شرایط آزمایشگاه طوری انتخاب شود که بتواند میزانی از خطا، که تشخیص و تصمیم‌گیری بالینی برای بیمار را تحت تاثیر قرار می‌دهد، 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 اندازه‌گیری گلوکز ۸٪ تعیین نماید و نمونه‌ای با غلظت واقعی ۱۲۶mg/dl داشته باشد، در ۹۵٪ موارد احتمال دارد نتایجی در محدوده ۱۴۶mg/dl – ۱۰۶ ارائه دهد که این طیف غلظتی وسیع به‌طور واضح باعث اشتباه در تصمیم‌گیری پزشک خواهد شد. اگر این

آزمایشگاه میزان CV% مجاز خود را برای اندازه‌گیری گلوکز به ۱٪ تغییر دهد، در غلظت ۱۲۶mg/dl نتایجی بین ۱۲۹mg/dl – ۱۲۳ 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 می‌گردد.

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 آنجایی‌که محدوده مرجع تحت تاثیر عوامل مختلفی مثل گروه مورد بررسی، مشخصات روش آزمایشگاهی و غیره قرار دارد، این روش امروزه کمتر استفاده می‌شود.

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 می‌شود.

در قوانین CLIA (Clinical Laboratory Improvments Amendments) با این روش مقادیر خطای مجاز برای حدود ۸۰ کمیت تعیین شده است.

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

۵- تغییرات بیولوژیکی: در این روش تغییرات یک پارامتر در مدت زمانی مشخص در بدن یک فرد و افراد مختلف اندازه‌گیری و بر اساس ضریب انحراف درون فردی within subject و بین افراد مختلف between subject مقادیر CV و Bias مجاز را تعیین می‌کند.

مقادیر خطای مجاز برای هر یک از پارامترها متفاوت بوده و آزمایشگاه بایستی قبل از اجرای کنترل کیفیت با استفاده از یکی از روش‌های 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	3%	3%
HDL	4%	3.6%
LDL	4%	4.2%
TG	5%	10.5%

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.

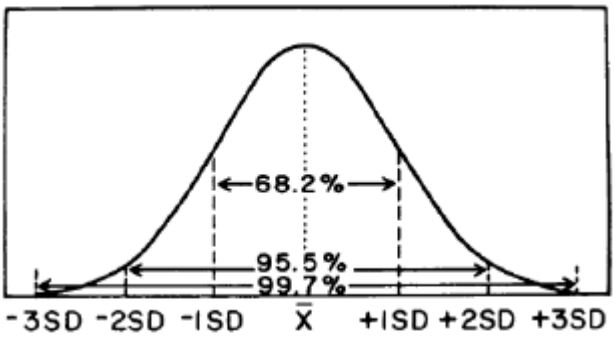
نمودار کنترلی

متداول‌ترین روش برای مقایسه نتایج آزمایش نمونه‌های کنترل استفاده از نمودارهای کنترلی می‌باشد. در نمودارهای کنترلی، غلظت بدست آمده از سرم کنترل روی نموداری با محدوده مشخص، علامت‌گذاری شده و بصورت تصویری و ساده نمایش داده می‌شود. اگر نتایج در داخل محدوده قرار داشته باشند، شرایط آزمایش تحت کنترل بوده و اطمینان داده می‌شود که سیستم درست کار می‌کند. ولی اگر نتایج در داخل محدوده قرار نگرفته باشد نشان‌دهنده مشکل‌دار بودن سیستم بوده و بایستی عملکرد سیستم بررسی شود.

برای محاسبه و به‌دست 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 به‌دست آمده این محدوده تعیین می‌شود.

همان‌طوری‌که در شکل زیر مشاهده می‌شود، اگر یک نمونه به‌طور مکرر آزمایش شود، توزیع نتایج به‌دست آمده به‌صورت نرمال (توزیع گوسین) خواهد بود. در توزیع‌های نرمال ۹۵٪ مقادیر در محدوده 2SD ± و ۹۹/۷ ٪ مقادیر در محدوده 3SD ± قرار می‌گیرند. سپس احتمال اینکه یک خوانده به‌طور اتفاقی خارج از محدوده 2SD ±

قرار گیرد حدود ۵٪ (۱ نتیجه بین ۲۰ خوانده) می‌باشد و در مورد محدوده 3SD ± تنها ۰/۳٪ (۳ نتیجه بین ۱۰۰۰ خوانده) می‌باشد.



برای به‌دست آوردن نمودار کنترلی و محدوده مناسب می‌بایست تاثیر نتایج پرت (Outliers) را به حداقل ممکن برسانیم. زیرا وجود این خوانده‌های پرت باعث جابجایی شدید در مقدار میانگین می‌شود حتی اگر تعداد این خوانده‌ها بسیار کم و حتی یک عدد باشد.

برای اینکه این اثر نامطلوب را حذف نماییم نتایج خارج از محدوده mean±3SD را حذف می‌نماییم(این محدوده بستگی به تعداد خوانده‌ها داشته و با افزایش تعداد خوانده‌ها افزایش می‌یابد به‌طوری‌که برای تعداد ۳۰ خوانده محدوده mean±3.14 SD و برای ۴۰۰ خوانده محدوده mean±3.83 SD به عنوان محدوده قابل قبول شناخته می‌شود و نتایج خارج از این محدوده به عنوان نتایج پرت در نظر گرفته می‌شود).

چون احتمال به‌دست آوردن یک نتیجه خارج از محدوده mean±3SD فقط ۰/۰۰۳ (۳ نتیجه بین ۱۰۰۰ نتیجه) می‌باشد لذا حتی یک نتیجه پرت احتمال وجود مشکل را در پروسه مطرح می‌کند و اقدامات پیگیرانه را در این زمینه الزامی می‌کند.

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:

a) این تعداد خوانش بهتر است در مدت ۲۰ روز کاری و با تکرار آزمایش بدست آمده باشد(در مدت ۴ هفته).

b) انجام آزمایش به‌صورت دوتایی در ۱۰ روزکاری

c) در صورت عدم امکان روش‌های فوق می‌توان در ۵ روزکاری با ۴ بار تکرار در روز این مقادیر را به‌دست آورد.

۴- 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

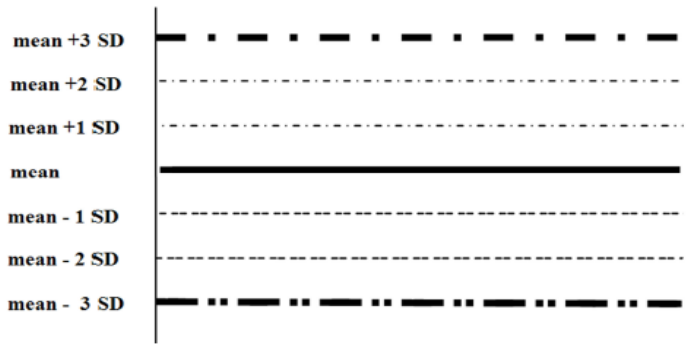
mean : میانگین

n : تعداد خوانده‌ها

x_i : هر تک خوانده

۵- قابلیت تکرارپذیری (SD یا CV%) بدست آمده را با عدم دقت مجازی که قبلاً تعیین نموده‌اید، مقایسه نمایید. اگر نتایج در در محدوده خطای مجاز قرار داشت، کار را طبق بند ۶ ادامه داده می‌شود 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.

۶- برای هر غلظت از نمونه کنترلی با استفاده از میانگین و انحراف معیار ، چارت کنترلی مثل نمونه زیر رسم می‌شود.



۷- در هر سری‌کاری دو نمونه کنترلی در دو غلظت متفاوت آزمایش می‌شود و مقادیر آن در روی منحنی مربوطه علامت‌گذاری می‌شود.

بر طبق تعریف CLSI(NCCLS) سری‌کاری به مدت زمان یا تعداد نمونه‌ای گفته می‌شود که طی آن صحت و دقت سیستم اندازه‌گیری ثابت باشد.

تعداد دفعاتی که پارامترهای نمونه کنترل آزمایش می‌شود 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 یک‌بار آزمایش نمونه کنترلی کافی است.

نکته: برای ترسیم چارت کنترل کیفی نباید از محدودهای که در بروشور کیت‌ها نوشته شده استفاده نمود. این محدوده توسط آزمایش نمونه‌های کنترلی در آزمایشگاه‌های مختلف تهیه شده است و متغییر مختلفی مثل اختلاف دستگاه‌ها، شماره ساخت مختلف کیت و کالیبراتور روی آن تاثیر می‌گذارند. در نتیجه محدوده نوشته شده در کیت‌ها بسیار بزرگتر از محدوده بدست آمده در یک آزمایشگاه می‌باشد. 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 به‌کار بردن تعداد زیاد نمونه‌های کنترلی در هر سری‌کاری تاثیر مثبتی در روند کار ندارد بلکه باعث افزایش میزان رد کاذب و افزایش هزینه می‌گردد. لذا پیشنهاد می‌شود در هر سری‌کاری یک یا دو کنترل آزمایش شود.

مثال:

آزمایشگاهی برلی اندازه‌گیری 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 غلظت‌های نزدیک به غلظت تصمیم‌گیری (Decision level) را طی ۵ روز کاری، ۲۰ بار آزمایش نموده است که نتایج آن به‌قرار 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، گرد 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 شده‌است که بر اساس آن‌ها نتایج "تحت کنترل " یا "خارج از کنترل" در نظر گرفته می‌شود. Levey-Jenning ، وستگارد، WHO نمونه‌هایی هستند که در این مجموعه مورد بحث قرار خواهند گرفت.

انتخاب هر کدام از این قوانین توسط آزمایشگاه اختیاری می‌باشد.

چارت کنترلی Levey-Jenning

چارت‌های کنترلی برای اولین بار در سال ۱۹۵۰ توسط Levey و Jenning به آزمایشگاه‌ها معرفی گردید. آن‌ها نشان دادند که روش‌هایی که توسط Shewhart برای استفاده در صنعت مطرح شده بود، می‌تواند در آزمایشگاه‌ها نیز مفید باشد.

مراحل ترسیم و استفاده از چارت Levey-Jenning

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

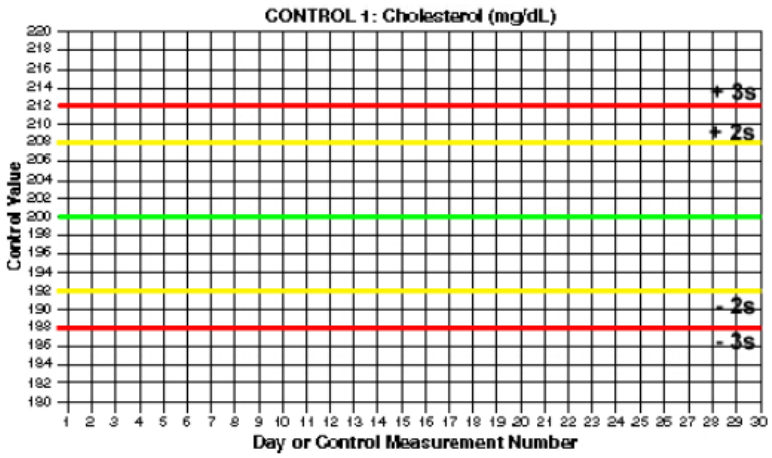
۲- به‌طور دستی یا نرم‌افزار یک چارت کنترل کیفی رسم نمایید به‌طوری‌که محور yها مقادیر نمونه کنترلی بوده و محدوده mean± 4SD را دربرگیرد.

۳- اگر تعداد کنترل‌هایی که در سری‌کاری استفاده می‌شود ۲ یا بیشتر باشد محدوده mean± 3SD را به‌عنوان محدوده قابل قبول انتخاب نمایید اما اگر در سری کاری فقط یک نمونه آزمایش می‌شود محدوده mean± 2SD را ملاک قرار دهید.

۴- میانگین و محدوده مورد قبول خود را به‌صورت خطوط افقی ترسیم نموده و خطوط عمودی را زمان انجام آزمایش در نظر بگیرید. در هر سری‌کاری کنترل‌ها را آزمایش نموده و نتایج را روی چارت علامت‌گذاری نمایید.

۵- تا زمانی‌که نتایج مورد انتظار mean± 3SD یا mean± 2SD (با توجه به محدوده انتخاب شده) قرار داشته باشند، نتایج تحت کنترل بوده و اگر نتایج از این محدوده جارج شد نتایج خارج از کنترل در نظر گرفته می‌شود.

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 اکثر آزمایشگاه‌ها از این چارت استفاده می‌شود ولی استفاده از هر کدام از این محدوده‌های mean± 3SD یا mean± 2SD دارای معایبی می‌باشد اگر محدوده mean± 3SD انتخاب شود امکان تشخیص خطا کاهش می‌یابد. در حالی‌که رد کاذب (False rejection) کمتر از ۵٪ است. اگر محدوده mean± 2SD انتخاب گردد، احتمال تشخیص خطا افزایش یافته ولی میزان رد کاذب (False rejection) افزایش می‌یابد.

با افزایش تعداد کنترل‌ها در هر سری‌کاری (n)، میزان رد کاذب افزایش می‌یابد. در صورت استفاده از یک کنترل (n=1) رد کاذب ۵٪ است ولی این میزان برای دو کنترل (n=2) به ۹٪ و برای ۴ کنترل (n=4) به ۱۸٪ می‌رسد.

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

۲ـ 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 ۰/۰۱ می‌رساند.

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 سری‌کاری نمونه‌های کنترلی را آزمایش نمایید.

تا زمانی‌که کنترل‌ها در محدوده mean± 2SD قرار دارند، نتایج بیماران قابل گزارش می‌باشد ولی به محض این‌که یکی از کنترل‌ها از محدوده mean± 2SD خارج گردید، کار را متوقف نموده و نتایج کنترل‌ها را از نظر وجود یکی از این قوانین مورد بررسی قرار دهید.

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

1_{3s} یک کنترل خارج از محدوده mean± 2SD باعث رد نتایج شده و می‌تواند نشان‌دهنده خطای راندوم یا شروع خطای سیستماتیک باشد.

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

R_{4s} یک خوانده خارج از محدوده mean+ 2SD و دیگری خارج از محدوده mean– 2SD باعث رد نتایج شده و نشان‌دهنده خطای راندوم می‌باشد.

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

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 می‌باشد.

لازم به توضیح است که قوانین چندگانه وستگارد بین سری‌های کاری مختلف و نیز بین دو غلظت نمونه کنترلی نیز قابل استفاده می‌باشد به‌طورمثال در مورد قانون 2_{2s} ممکن است یک خوانده در روز قبل و یک خوانده امروز، همسو و خارج از محدوده mean+ 2SD 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+ 2SD قرائت گردند.

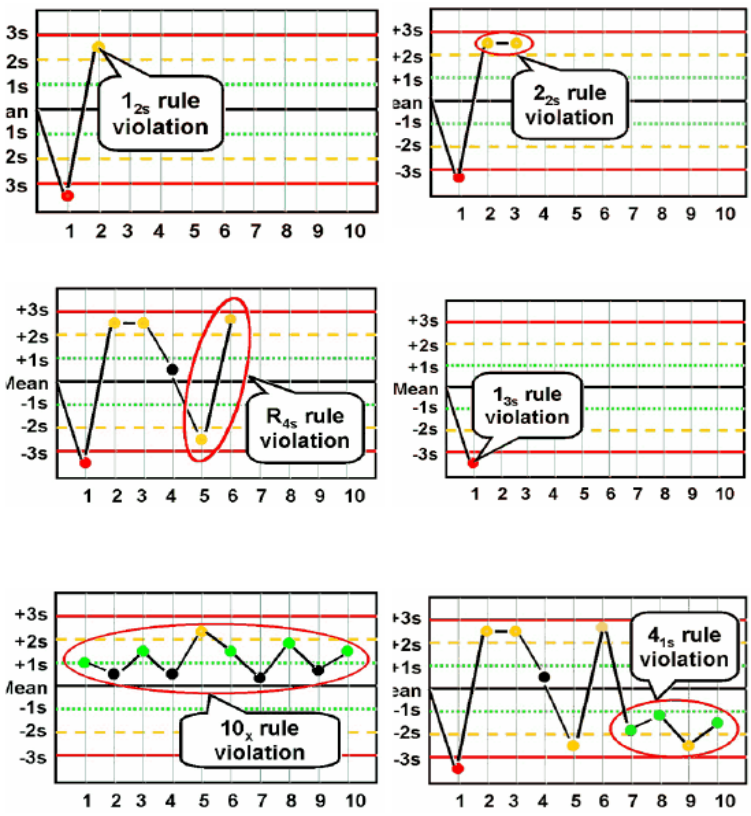
مورد استثنا قانون R_{4s} می‌باشد که باید در آن دو خوانده به دست آمده از یک سری‌کاری با یکدیگر 4SD فاصله داشته باشند. اگر در دو سری کاری متفاوت، نتایج با هم 4SD فاصله داشته باشند، در این مورد قانون R_{4s} کاربردی ندارد.

در سال ۲۰۰۶ با توجه به پیشرفت‌های تجهیزات و نیز رایانه‌ای شدن بسیاری از برنامه‌ها، در قوانین وستگارد دو تغییر ایجاد شد. اول اینکه قانون 1_{2s} به‌عنوان هشدار حذف شد و پیشنهاد گردید قوانین 10_x و 4_{1s} حتی در شرایطی که نتایج در محدوده mean± 2SD قرار دارند اعمال شود. این امر باعث شناسایی سریع‌تر خطا می‌شود ولی از طرف دیگر انجام آن در مواردی که چارت توسط روش دستی ترسیم شده‌است، بسیار مشکل است. همچنین با توجه به شرایط کنونی برخی آزمایشگاه‌ها، ممکن است استفاده و تفسیر به‌درستی 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 2SD mean± 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 سری‌کاری (مضرب ۳) قوانین تفسیر قدری متفاوت می‌باشند.

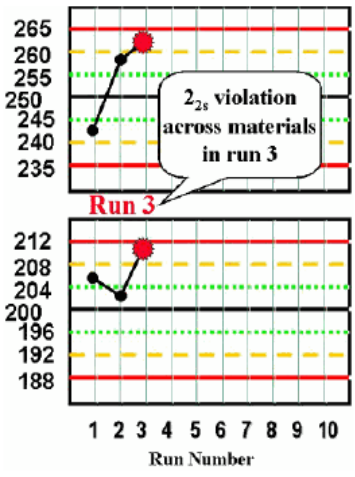
برای اینکه اطلاعات بیشتری در مورد این تغییرات به‌دست آورید می‌توانید به سایت وستگارد مراجعه نمایید.

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



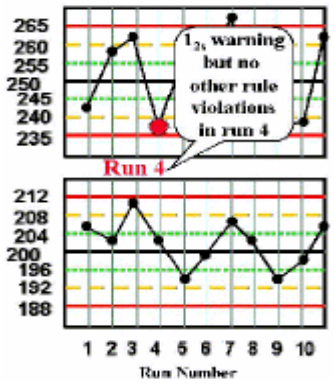
در چارت‌های زیر قوانین وستگارد با دو نمونه کنترلی در هر سری کاری نمایش داده شده است.

در سری‌کاری سوم هر دو نمونه کنترلی خارج از محدوده mean± 2SD هستند. پس براساس قانون 2_{2s} نتایج این سری‌کاری رد می‌شود و به احتمال زیاد یک خطای سیستماتیک در این محدوده غلظتی وجود دارد.

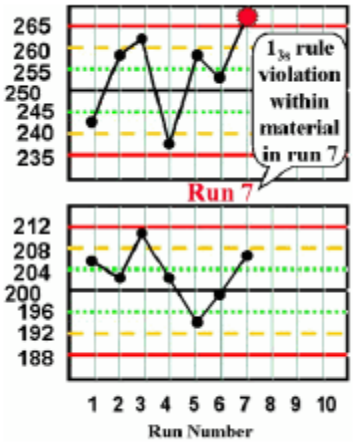


در سری‌کاری چهارم کنترل با غلظت‌های بالا، خارج از محدوده 2SD– قرار گرفته است و احتمال خطا وجود دارد. از آنجایی که سری‌کاری قبلی (سری سوم) رد شده است فقط سری چهارم از نظر وجود قوانین 1_{3s} و

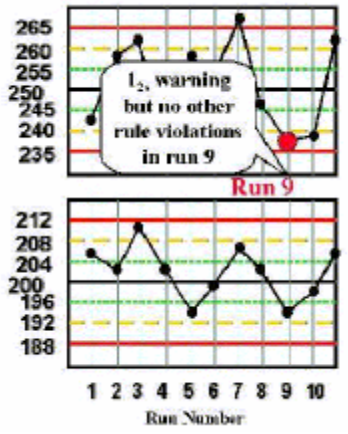
2_{2s} و R_{4s} بررسی می‌گردد. با توجه به به عدم وجود ۳ قانون نامبرده، این سری‌کاری قبول می‌شود ولی باید به هشدار توجه نمود.



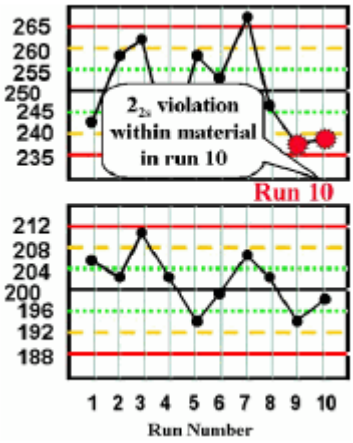
در سری‌کاری هفتم نتیجه کنترل با غلظت بالا خارج از محدوده ±3SD قرار گرفته که باعث رد این سری-کاری می‌شود و به احتمال زیاد یک خطای راندوم وجود دارد.



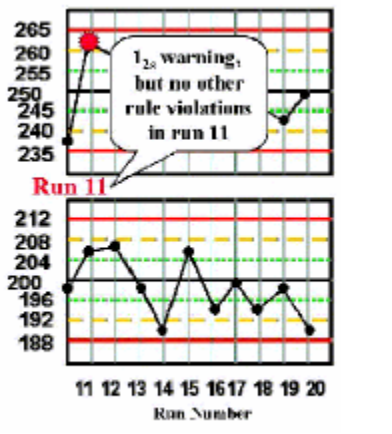
در سری‌کاری نهم کنترل با غلظت بالا خارج از محدوده 2SD– قرار گرفته است و احتمال خطا وجود دارد. چارت از نظر وجود قوانین 1_{3s} و 2_{2s} و R_{4s} بررسی می‌شود. با توجه به عدم وجود۳ قانون مذکور، این سری‌کاری قبول می‌شود ولی باید به هشدار توجه نمود.



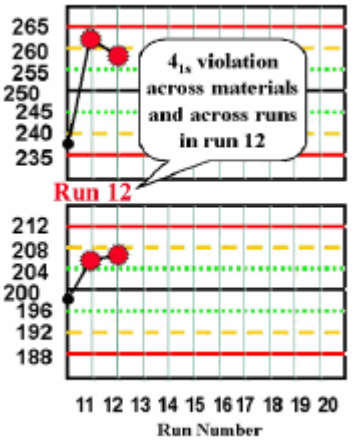
در سری‌کاری دهم در نمودار کنترل با غلظت بالا ، دو خوانده متوالی در دو سری‌کاری متوالی، خارج از محدوده 2SD– قرار گرفته است که با توجه به قانون 2_{2s} باعث رد سری دهم می‌شود و به احتمال زیاد یک خطای سیستماتیک وجود دارد.



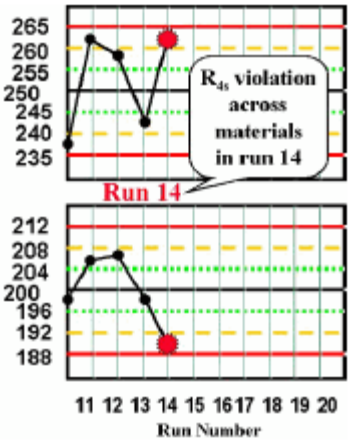
در سری‌کاری یازدهم کنترل با غلظت بالا ، خارج از محدوده 2SD+ قرار دارد و احتمال خطا وجود دارد و بایستی نمودار را از نظر مطابقت با قوانین 1_{3s} و 2_{2s} و R_{4s} بررسی نمود. با توجه به عدم وجود ۳ مذکور، این سری‌کاری قبول می‌شود ولی باید به هشدار توجه نمود.



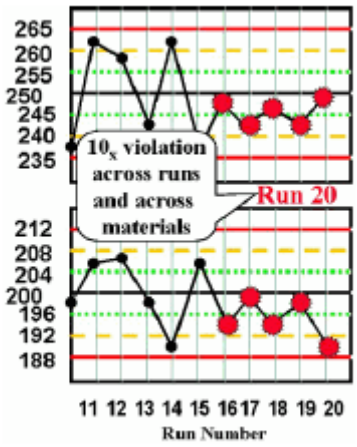
در سری‌کاری دوازدهم در نمودار هر دو کنترل، دو خوانده متوالی در دو سری‌کاری متوالی، خارج از محدوده 1SD+ قرار گرفته با اعمال قانون در هر دو غلظت مشاهده می‌گردد که ۴ خوانده متوالی خارج از محدوده 1SD+ وجود دارد. علیرغم وجود قانون 4_{1s} ، چون در سری‌کاری دوازدهم هیچ‌کدام از نتایج خارج از محدوده 2SD± نبودند، سری‌کاری تایید می‌گردد اما باید احتمال وقوع یک خطای سیستماتیک را در نظر داشت.



در سری‌کاری چهاردهم، کنترل با غلظت بالا، خارج از محدوده 2SD+ و کنترل دیگر خارج از محدوده -2SD قرار گرفته پس توسط قانون R_{4s} سری‌کاری رد می‌شود.



در سری‌کاری بیستم بررسی نتایج سری‌های کاری قبلی نشان می‌دهد که ۵ نتیجه در غلظت بالا و ۵ نتیجه در غلظت پایین در یک طرف میانگین قرار گرفته که با قانون 10_x باعث رد سری بیستم می‌گردد و به احتمال زیاد یک خطای راندم وجود دارد.



قوانین WHO

در مراجع رفرانس‌های 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 (2002)

- ✓ زمانی‌که پراکندگی نتایج نزدیک به میانگین و در اطراف آن باشد، عملکرد سیستم قابل قبول است.

- ✓ وجود یک خوانده خارج از محدوده mean± 2SD نشان‌دهنده 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 اندازه‌گیری است که نیاز به اصلاح دارد.

Quality assurance in Hematology WHO/LAB/1998

یک خوانده خارج از محدوده mean± 2SD	هشدار
یک خوانده خارج از محدوده mean± 3SD	غیر قابل قبول (خطای سیستماتیک یا راندوم)
دو خوانده متوالی خارج از محدوده mean± 2SD	غیر قابل قبول (خطای سیستماتیک)
یک خوانده متوالی خارج از محدوده 1SD– یا 1SD+	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.

چارت‌های کنترل کیفی بصورت ماهانه بررسی شده و تمام مقادیر[1] معتبر برای محاسبه میانگین و انحراف معیار ماه بعدی به‌کار می‌رود.

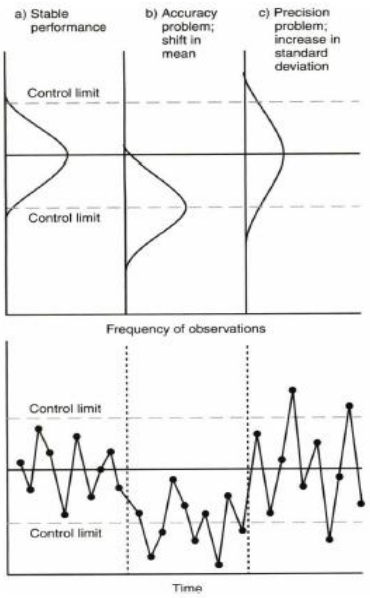
۱ مقادیر معتبر: مقادیری از کنترل می‌باشد که بر اساس روش تفسیر بکار رفته، قابل قبول بوده و بر اساس آن نتایج بیماران گزارش شده است.

انواع خطا

در شرایط عادی با تکرار آزمایش انتظار می‌رود 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 می‌یابد.

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 زنگوله‌ای، نمای پهنی پیدا می-کند(c).[۲]



اقدامات اصلاحی

بدون توجه به نوع روشی که برای تفسیر نتایج بکار می‌بریم ، برخورد با نتایجی که خارج از محدوده مورد انتظار هستند نشان‌دهنده 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 رفرانس‌های 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

[۲] خطاهای ذکر شده در طول زمان روی منحنی پایینی هم نشان داده شده است.

آزمایشگاه‌ها اولین کاری که انجام می‌دهند این است که یک کنترل تجاری را به حجم رسانیده و آزمایش با نمونه کنترلی را تکرار می‌نمایند. 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 می‌نماید و به خطای سیستماتیک حساس می‌باشد. در حالت عادی نتایج کنترل‌ها در اطراف میانگین (بالاتر و پایین‌تر) قرائت می‌شوند اما اگر نتایج سیر نزولی یا صعودی پیدا کنند، جمع جبری اختلافات نتایج با میانگین، افزایش یافته و احتمال بروز خطای سیستماتیک مطرح می‌گردد.

روش‌های مختلف برای اجرای و تفسیر چارت Cusum :

۱. V-mask
۲. محدوده تصمیم‌گیری (decision limit)

چون روش محدوده تصمیم‌گیری ساده‌تر بوده و در کامپیوتر نیز قابل اجرا می‌باشد 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 نشان‌دهنده 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 mean± 1SD در نظر گرفته می‌شود.
- h_1 و h_u که محدوده کنترل است و اغلب ± 2.7 SD برای آن در نظر گرفته می‌شود.

۴- در هر سری‌کاری یک نمونه کنترل آزمایش و نتیجه آن را با محدوده mean±1SD مقایسه کنید تا زمانی‌که نتیجه در این محدوده قرار داشته باشد Cusum را اجرا نکنید. در این مرحله علامت‌گذاری چارت انجام نمی‌شود.

۵- به محض اینکه کنترل از محدوده mean± 1SD خارج شد اختلاف نتیجه مشاهده شده را با 1SD- (K_1) mean یا mean+1SD (K_u) محاسبه نمایید (این اختلاف در مثال زیر d_i نشان داده شده است).

Cusum در هر سری‌کاری از جمع جبری اختلاف جدید (d_i) با جمع جبری قبلی (Csi) بدست می‌آید. عدد بدست آمده روی منحنی علامت‌گذاری می‌شود.

۶- Cusum بر اساس شیب منحنی پیگیری می‌شود 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 h1 (±2.7 SD) و hu بیشتر شود که در این شرایط از کنترل خارج شده است و Cusum تا زمانی‌که عوامل ایجاد کننده خطا شناسایی نشده‌اند متوقف می‌شود.

مثال:

آزمایشگاهی تری گلیسرید را در نمونه کنترلی اندازه‌گیری 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 سری‌کاری، نمونه کنترل را آزمایش و نتایج را در جدول زیر درج نموده است. اختلاف هر روز با K_1 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	

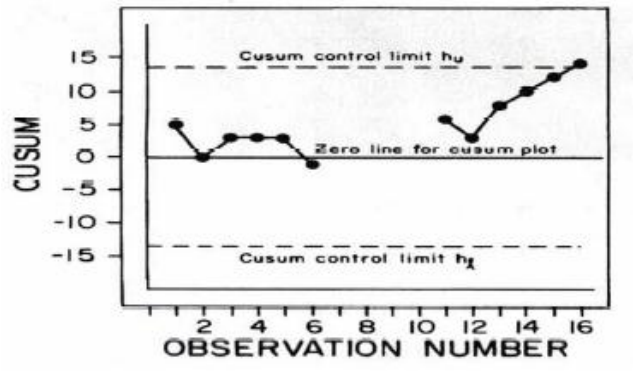
همانطور که مشاهده می‌شود در روز اول نتیجه کنترل ۱۱۰ قرائت شده است که ۵ واحد از K_u (۱۰۵) بیشتر است لذا Cusum شروع شده و اختلاف d_i بصورت ۵+ نشان داده شده است. روز دوم کنترل ۱۰۰ خوانده شده که ۵ واحد کمتر از K_u (۱۰۵) می‌باشد بنابراین مقدار d_i برابر ۵+ جمع جبری (دو عدد داخل بیضی) و (Csi) مساوی صفر می‌شود.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

Cusum در دو حالت متوقف می‌شود:

وقتی علامت (Csi) تغییر یابد. در روز ششم مثال فوق، علامت (Csi) از مثبت به منفی تغییر یافته که نشان می‌دهد 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 نمی‌باشد زیرا قوانین مختلف وستگارد طوری طراحی شده-اند که خطای سیستماتیک و راندوم را شناسایی می‌کنند.

کنترل کیفیت بر اساس نتایج آزمایش بیماران

روش‌های کنترل کیفی بر اساس نتایج بیماران اغلب به عنوان مکملی برای روش‌های معمول کنترل کیفیت، طراحی می‌شود اگر چه این روش‌ها زمان‌بر است و اهداف کنترل کیفی را بطور کامل تامین نمی‌نماید ولی گاهی موفق به شناسایی خطاهایی می‌شود که در روش‌های معمول کنترل کیفی قابل تشخیص نیستند.

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

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 نمی‌باشد.

برای بررسی نتایج هر بیمار از روش‌های زیر استفاده می‌شود.

هماهنگی با علائم بالینی

مقایسه نتایج آزمایشگاهی با علائم بالینی بیمار در آزمایشگاه‌هایی که تعداد زیادی از بیماران را پذیرش می‌کنند، 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 می‌کند.

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 آزمایش‌ها در زمان و مکان واحد انجام شود، مسئول آزمایشگاه می‌تواند ارتباط آن‌ها را با هم بررسی نماید. مانند ارتباط میزان TSH و ، T4 .

آزمایش‌های مضاعف (duplicate) در آزمایشگاه

برای این کار بایستی نمونه‌ها در دو لوله ریخته شده و دو بار آزمایش شود. این روش در مواردی که کنترل-های پایدار تجاری در دسترس نمی‌باشند و یا به عنوان مکمل روش‌های معمول کنترل کیفیت کاربرد دارد.

با انجام آزمایش‌های مضاعف در یک آزمایشگاه می‌توان 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 می‌کند.

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 می‌آید.

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

هر جفت جوابی که بیشتر از 2SD با هم اختلاف داشته باشند غیر قابل قبول شناخته می‌شود.

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 می‌گردد. اساس این روش بر این موضوع استوار است که مقادیر پارامترها در بدن یک فرد در مدت زمانی مشخص، در محدوده مشخصی تغییر می‌کند. 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, Boyadjian 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 نمی‌تواند خطاهای راندوم را تشخیص دهد به همین دلیل نمی‌تواند جایگزین روش‌های 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، پره‌آنالیتیک قرار می‌گیرد. این مسئله باعث می‌شود 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 می‌شود که از تقسیم انحراف معیار نتایج یک گروه بیمار بر مجذور تعداد آنها بدست می‌آید.

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

روش‌های آماری برای پایش میانگین نتایج بیماران

یکی از راه‌های استفاده از نتایج بیماران، محاسبه میانگین نرمال average of normal(AON) یا mean of normal است و از میانگین نتایج نرمال بدست می‌آید پس باید ابتدا نتایج غیر طبیعی را بر اساس محدوده مرجع حذف و سپس میانگین را محاسبه نمود.

اگر این میانگین بعد از گروه‌بندی افراد بر اساس شرایط ، انجام شد weighted mean نامیده می‌شود.

الگوریتم Bulls که امروزه جهت پایش دستگاه‌های سل‌کانتر استفاده می‌شود، از میانگین متحرک (moving average) برای ارزیابی اندکس‌های خونی استفاده می‌نمایند.

بررسی میانگین نتایج بیماران در فواصل زمانی مشخص و مقایسه آن با نتایج قبلی در تشخیص خطاهای سیستمیک به آزمایشگاه کمک می‌کند.

بررسی هماهنگی نتایج آزمایشگاه با تشخیص نهایی

این مطالعات اغلب بصورت گذشته‌نگر انجام گرفته و میزان موارد منفی و مثبت کاذب نتایج آزمایشگاهی را بر اساس تشخیص نهایی بررسی می‌کند. این روش کنترل کیفیت نتایج آزمایشگاه را در دراز مدت، کنترل می‌کند.

اصول کنترل کیفی در آزمایشگاه خون‌شناسی

آزمایش‌های هماتولوژی نیز مثل سایر تست‌های آزمایشگاهی نیاز دارند برنامه‌های تضمین کیفیت برایشان در نظر گرفته شود و چون اکثر آزمایش‌های هماتولوژی، کمی quvantitative می‌باشند، می‌توان از موارد ذکر شده در قسمت‌های قبلی برای کنترل کیفیت آن‌ها استفاده نمود.

بر اساس توصیه WHO هر آزمایشگاه هماتولوژی با توجه به شرایط موجود مثل تعداد پرسنل، تعداد نمونه-ها، تجهیزات بکار رفته، تنوع آزمایش‌ها و ... بایستی جهت اجرای برنامه تضمین کیفیت از تعدادی از روش‌های زیر استفاده نماید.

برنامه‌های دائمی:

- مقایسه نتایج دستگاه سل کانتر با گسترش خون محیطی
- مقایسه نتایج دستگاه سل کانتر با وضعیت بالینی بیمار

برنامه‌های روزانه:

- ✓ استفاده از نمونه کنترل در هر سری‌کاری
- ✓ رسم نمودار کنترل با استفاده از نمونه کنترل
- ✓ انجام آزمایش‌های مضاعف یا دوتایی duplicate بر روی تعدادی از نمونه‌های بیماران(معمولاً ۳-۴ نمونه در هر سری‌کاری)
- ✓ انجام آزمایش بازبینی (Check test) بر روی تعدادی از نمونه‌های بیماران (آزمایش ۳-۴ نمونه ازسری-کاری قبلی)
- ✓ بررسی تفاوت نتایج یک بیمار با آزمایش قبلی خودش(Delta check)
- ✓ محایبه میانگین اندکس‌های خونی MCV، MCH، MCHC در صورت استفاده از سل‌کانتر
- ✓ محاسبه میانگین MCHC در صورت استفاده از روش‌های دستی

اصول کار با دستگاه‌های سل‌کانتر

۱- نحوه کار با دستگاه سل‌کانتر مثل روشن کردن ، توجه به gaugeهای فشار(بر حسب نوع دستگاه و در صورت نیاز)، نگهداری دستگاه(شستشوی روزانه، هفتگی، ماهانه و سایر موارد لازم)، خاموش کردن آن و ...

می‌بایست بطور کامل مطابق کاتالوگ دستگاه یا آموزش کارشناسان شرکت پشتیبان صورت گیرد. تاریخ و شرح آموزشی که کارشناسان شرکت پشتیبان این آموزش‌ها را ارائه داده‌اند بایستی بطور مستند موجود باشد.

درصورتی‌که کاربر دستگاه عوض شود، بایستی آموزش‌های مذکور در مورد روش کار با دستگاه، نحوه نگهداری و اصول کنترل کیفی به کاربر جدید هم داده شود.

۲- کلیه موارد مربوط به نگهداری دستگاه، مانند تاریخ شستشوهای لازم، تعمیر، سرویس و یا تعویض محلول‌ها باید ثبت و نگهداری گردد.

۳- هر روز شمارش زمینه یا Back ground دستگاه ارزیابی و در صورت امکان ثبت و نگهداری شود.

۴- درصورتی‌که نمونه در آزمایشگاه زیاد باشد بهتر است در فواصل کاری و بین آزمایش‌ها، دستور شستشو انجام گیرد.

۵- هر شش ماه یک‌بار دستگاه‌های سل‌کانتر احتیاج به کالیبراسیون دارند ولی در ابتدای راه‌اندازی، پس از هر بار تعمیر یا سرویس، قابل قبول نبودن نتایج کنترل کیفی روزانه، تعویض محلول‌ها(در صورتی‌که باعث تغییر محسوس در نتایج خون کنترل و یا نمونه بیماران شده باشد) نیز ضروری است.

۶- هر روز قبل از شروع کار بر روی نمونه‌ها، بایستی نمونه خون کنترل با تاریخ انقضاء معتبر با دستگاه انجام گردد و پس از اطمینان از قابل قبول بودن نتایج آن با استفاده از نمودار کنترل، نسبت به آزمایش نمونه مراجعین اقدام شود.

۷- در صورت عدم وجود خون کنترل و یا برای کامل شدن ارزیابی عملکرد دستگاه، باید روزانه از آزمون آماری T-Brittin استفاده شود.

۸- بررسی میزان عدم دقت و عدم صحت دستگاه بطور منظم انجام شود.

جهت رعایت اصول ایمنی و جلوگیری از ایجاد مشکلات مربوط به نوسانات برق، استفاده از سیم اتصال به زمین و تثبیت کننده نوسانات برق ضروری می‌باشد.

محلول‌های سل‌کانتر

۱- محلول‌ها بایستی سری ساخت مشخص از شرکت پشتیبان و یا سایر شرکت‌های معتبر خریداری شود.

۲- وجود ذرات اضافی و نامحلول در این محلول‌ها باعث تداخل در شمارش سلول‌های خونی به ویژه پلاکت می‌شود.

۳- هنگام تعویض هر محلول تاریخ شروع استفاده، روی آنها ثبت شود.

۴- هیچ‌گاه ته‌مانده محلول قبلی را روی محلول جدید اضافه ننمایید.

کالیبراسیون و کنترل کیفیت سل‌کانتر

کالیبراسیون

جهت کالیبراسیون سل‌کانترها کالیبراتورهای تجاری موجود است که مقادیر مورد نظر در آن‌ها با روش‌های مرجع کالیبره شده‌اند که در صورت داشتن تاریخ انقضاء معتبر و تاییدیه‌های لازم و با رعایت دستورالعمل‌های کارخانه سازنده برای کالیبراسیون دستگاه‌ها مناسب می‌باشند. صحت انجام کالیبراسیون را می‌توان با آزمایش نمونه کنترل، مقایسه نتایج دستگاه‌ها با انجام روش‌های مرجع بر روی چند نمونه خون و کنترل دقیق میانگین‌های متحرک در مورد اندکس‌های گلبولهای قرمز تایید نمود.

در صورتی که کالیبراتورهای تجاری مناسب در اختیار نبود و یا نسبت به اعتبار آنها شکی وجود داشت می‌توان از خون کامل طبیعی تازه برای این منظور استفاده نمود. برای انجام این‌کار بایستی پارامترهای حداقل ۳ نمونه را دو بار با روش‌های مرجع دستی و دو بار با سل‌کانتر اندازه گیری نموده و پس از محاسبه میانگین هر پارامتر با روش دستی و دستگاهی، با استفاده از فرمول زیر فاکتور کالیبراسیون دستگاهها را در صورت نیاز تصحیح نمود. برای بالا رفتن دقت این کار از نمونه‌های بیشتری می‌توان استفاده کرد.

$$(\text{Calibration Factor}) = \frac{\text{میانگین روش دستگاهی} _ \text{میانگین روش دستی}}{\text{میانگین روش دستگاهی}} \times 100$$

پارامتر	روش مرجع
هموگلوبین	سیانمت هموگلوبین

هماتوکریت	میکرو هماتوکریت
تعداد گلبولهای سفید	هماسیتومتر با درجه‌بندی اصلاح شده

اخیراً در برخی کتب رفرانس کولترهای تک کاناله به‌عنوان روش مرجع برای شمارش RBC،WBC ، PLT، قید شده است که به دلیل عدم دسترسی به این وسایل در کشور ما هنوز از روش هماسیتومتر با درجه‌بندی اصلاح شده استفاده می‌شود ولی به علت میزان خطای بالا در مورد پارامترهای RBC و PLT بهتر است کالیبراسیون این موارد توسط شرکت پشتیبان انجام گیرد.

مثال: اگر میانگین اندازه‌گیری هموگلوبین به روش دستی ۱۴۰ gr/L و با سل‌کانتر ۱۴۵gr/L باشد، فاکتور تصحیح کالیبراسیون بدین صورت محاسبه می‌شود.

$$\frac{140-145}{140}\times 100 = -3.44\,\%$$

پس طبق نتیجه فوق ضریب کالیبراسیون بایستی ۳/۴۴٪ کاهش یابد. برای مثال اگر ضریب کالیبراسیون قبلی ۱۰۰ بوده، می‌بایست ۳/۴۴٪ کاهش یابد و روی ۹۶/۵۶ تنظیم گردد.

در برخی سل‌کانترها مثل سیسمکس ضریب کالیبراسیون جدید با استفاده از فرمول زیر محاسبه میگردد.

$$\text{(Calibration Factor)} = \frac{\text{میانگین روش دستی}}{\text{میانگین روش دستگاهی}} \times \text{فاکتور کالیبراسیون قبلی}$$

کنترل کیفیت

۱- برای این‌کار می‌توان از نمونه کنترل خون‌های تجاری که در بازار موجود می‌باشد استفاده نمود و هر روز صبح و به فواصل در طول روزکاری استفاده کرده و نتایج حاصله را در روی نمودار ثبت نمود. برای رسم نمودار بایستی نمونه خون کنترل به فواصل آزمایش گردد تا حداقل ۲۰ خوانده برای هر متغییر بدست آید. پس از محاسبه میانگین و انحراف معیارهای ±1SD و ±2SD و ±3SD برای هر متغییر، مقادیر آن‌ها را بر

روی محور عمودی و روزها را بر روی محور افقی ثبت می‌گردد و تفسیر این نمودار همانطور که قبلاً اشاره شد توسط قوانین لوی‌جنینگ، وستگارد یا WHO صورت می‌گیرد.

تفسیر نمودار کنترل توسط سازمان بهداشت جهانیWHO/LAB/1998	
نتیجه یک کنترل خارج از 2SD ±	هشدار
نتیجه یک کنترل خارج از 3SD ±	رد نتایج بیماران(خطای سیستماتیک یا راندوم)
دو نتیجه متوالی و همسو خارج از 2SD ±	رد نتایج بیماران(خطای سیستماتیک)
چهار نتیجه متوالی و همسو خارج از 1SD - یا 1SD +	رد نتایج بیماران(خطای سیستماتیک)
شش نتیجه نمونه کنترل در یک طرف میانگین	هشدار(خطای سیستماتیک)

۲- در صورتی‌که نمونه خون کنترل در دسترس نباشد و یا برای کامل شدن روند کنترل کیفیت سل‌کانتر می‌توان از نمونه خون بیماران استفاده نمود. با توجه به اینکه پارامترهایی مثل WBC، RBC، Hb، HCT و اندکس‌های خونی در نمونه خون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ ردجه سانتیگراد، می‌توان در روز اول حداقل ۵ و ترجیحاً ۱۰ نمونه با مقادیر نرمال را بعد از انجام آزمایش در یخچال نگهداری نمود و در روز بعد مجدداً مورد آزمایش قرار داد و وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر نمونه‌های جفت را با استفاده از آزمون آماری T-Brittin محاسبه نمود.

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

$$tn = \frac{\overline{d}\sqrt{n}}{SD}$$

n	تعداد جفتهای مورد بررسی
d	اختلاف بین دو خوانده (روز به روز)
SD	انحراف معیار اختلافات

مقدار t برای هر متغییر محاسبه شده و اگر مقادیر آن برای ۵ نمونه از ۲/۷۸ و برای ۱۰ نمونه ۲/۲۶ بیشتر باشد، با اطمینان ۹۵٪ می‌توان بیان نمود که بین مقادیر بدست آمده در دو روز اختلاف معنی‌دار وجود دارد و بیانگر این است که در روند کار احتمال وجود یک مشکل است که بایستی شناسایی و رفع گردد.

مثال: اگر نتایج حاتصل از اندازه‌گیری Hb ۵ نمونه خون با استفاده از یک دستگاه سل‌کانتر در دو روز متوالی مطابق جدول زیر باشد عملکرد دستگاه با کمک فرمول T-Brittin به صورت زیر بررسی می‌گردد.

مقدار هموگلوبین روز اول g/L	مقدار هموگلوبین روز دوم g/L	d	d^2
123	120	-3	9
135	139	4	16
176	181	5	25
155	150	-5	25
142	138	-4	16
$\Sigma d = -3$	$(\Sigma d)^2 = 9$		
$\Sigma(d^2) = 91$	$\overline{d} = \Sigma d / 5 = 3/5 = 0.6$		

$$SD = \sqrt{\frac{91 - \frac{9}{5}}{4}} = 4.72 \qquad tn = \frac{0.6\sqrt{5}}{4.72} = 0.28$$

در مثال بالا چون عدد t بدست آمده از ۲/۷۸ (مقدار t برای ۵ نمونه) کمتر است لذا نتایج Hb دستگاه قابل قبول است.

۳- بررسی عدم دقت دستگاه به دو روش انجام می‌شود.

a) با استفاده از نمونه کنترل: با استفاده از نمونه کنترل در روزهای متوالی که توسط دستگاه آزمایش شده است، CV هر پارامتر را محاسبه می‌نمایند.

b) بدون استفاده از نمونه کنترل: در این روش از نمونه‌های خون روزانه برای این‌کار استفاده می‌شود. بدین صورت که در هر ماه حدود دو نمونه را حداقل ۱۰ بار با سل‌کانتر آزمایش نموده و از نتایج حاصل CV هر

پارامتر را محاسبه نموده و با CV ادعا شده توسط شرکت سازنده که در کاتالوگ دستگاه وجود دارد مقایسه نموده و در صورت عدم تطابق با آن با شرکت پشتیبان کننده تماس گرفته می‌شود.

بررسی عدم دقت دستگاه خصوصاً هنگاه نصب و راه‌اندازی با استفاده از نمونه‌های طبیعی و غیر طبیعی ضروری است.

مثال: اگر نتایج شمارش WBC یک نمونه توسط دستگاه سل‌کانتر به قرار زیر باشد، میزان عدم دقت دستگاه برای شمارش پارامتر مذکور به روش زیر محاسبه میشود.

WBC $\times 10^3/L$	$(x-\bar{x})$	$(x-\bar{x})^2$
7.6	-0.03	0.0009
7.5	-0.13	0.017
7.8	0.17	0.029
7.6	-0.03	0.0009
7.5	-0.13	0.017
7.9	0.27	0.073
7.5	-0.13	0.017
7.6	-0.03	0.0009
7.5	-0.13	0.017
7.8	0.17	0.029
$\Sigma x=76.3$ $\bar{x}=7.63$		$\Sigma(x-\bar{x})= 0.201$

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

$SD=\sqrt{0.201/9}=0.148$

$$CV\%=\frac{SD\times 100}{\bar{x}}$$

$0.148/7.63\times 100=1.9\%$

۴- درصورتی‌که امکان انجام تمامی آزمایش‌ها بصورت دوتایی وجود نداشت بایستی در هر سری‌کاری حداقل ۲ تا ۳ نمونه بصورت دوتایی (Duplicate) انجام گیرد تا با بررسی اختلاف خوانده‌ها از طریق آماری، خطاهای تصادفی قابل شناسایی باشد. افزایش اختلاف بین دو خوانده بیش از 2SD ، احتمال وجود خطای تصادفی را مطرح می‌سازد. فرمول زیر روش محاسبه SD نمونه‌های دوتایی را نشان می‌دهد.

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

مثال : مقدار هموگلوبین ۵ نمونه در دو بار اندازه گیری (Duplicate) به شرح زیر می باشد :

اندازه گیری اول (g/L)	اندازه گیری دوم (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

$$SD=\sqrt{\frac{\sum d^2}{2n}}=\sqrt{\frac{112}{10}}=3.34 \qquad 2SD=6.7$$

اختلاف بیشتر از 2SD بین دو نتیجه آزمایش در نمونه سوم، نشان‌دهنده ایجاد خطای تصادفی و لزوم تکرار آزمایش بر روی همان نمونه می‌باشد.

۵- روش دیگر در اجرایی کردن کنترل کیفیت، آزمایش بازبینی(Check test) است که در صورت نگهداری صحیح نمونه‌ها در یخچال قابل انجام می‌باشد. بدین‌صورت که در ابتدای سری‌کاری حداقل ۲ – ۳ نمونه پس از انجام آزمایش بصورت دربسته در یخچال نگهداری شود و در انتهای سری‌کاری مجدداً مورد آزمایش قرار گیرد و نتایج حاصل از این دو نوبت آزمایش با استفاده از فرمول Duplicate test مورد بررسی قرار گرفته تا اختلاف نتایج در محدوده 2SD± قابل قبول است. در صورت نگهداری صحیح نمونه‌ها، مشاهده اختلاف نتایج خارج از محدوده 2SD± ، نشان‌دهنده اشکال در عملکرد دستگاه و یا معرف‌ها می‌باشد. این روش برای بررسی Hb مناسب بوده و در مورد WBC و RBC کاربرد کمتری دارد ولی برای Hct اگر فاصله زمانی بین نمونه‌گیری و انجام آزمایش بیشتر از ۶ ساعت باشد کاربردی ندارد.

۶- در مراکزی که تعداد بیماران زیاد است (حداقل روزانه ۱۰۰ بیمار) می-توان از میانگین اندکس‌های گلبولی (MCV,MCH,MCHC) جهت ارزیابی کیفیت عملکرد دستگاه‌ها استفاده نمود چون در جمعیت میزان میانگین اندکس‌های گلبولی ثابت می‌باشد.

در این روش میانگین و 2SD± اندکس‌های گلبولی (MCV,MCH,MCHC) حداقل ۳۰۰ – ۵۰۰ بیمار توسط سل‌کانتر محاسبه و نمودار رسم می‌گردد و در روزهای بعد نمونه‌های بیماران بصورت تصادفی به گروه‌های ۲۰ تایی تقسیم شده و هر گونه اختلاف بین انحراف از مقادیر مجاز، به سهولت شناسایی می‌شود. فقط بایستی به خاطر داشت که انتخاب نمونه‌ها لازم است بصورت تصادفی بوده و بیشتر از ۷ نمونه در یک گروه در شرایط کلینیکی یکسانی نباشند. این روش در حال حاضر بصورت برنامه‌های نرم افزاری بر روی بسیاری از سل‌کانترها نصب شده است.

۷- روشی دیگر برای کنترل کیفیت، مقایسه کردن نتایج آزمایش یک فرد با نتایج قبلی همان فرد (Delta check) مشروط به اینکه تغییرات فیزیولوژیکی و روزانه پارامترهای خونی، درمان شدن بیماربه هر دلیل و تغییرات بالینی که باعث تغییر شمارش سلول‌ها می‌گردد را در نظر داشته باشیم. لازم به توضیح است که استفاده از این روش در صورتی‌که فاصله دو آزمایش بیشتر از ۲ تا ۳۲ هفته باشد توصیه نمی‌شود.

مقادیر زیر مقدار مجاز تغییرات پارامترها در این روش به عنوان مثال آورده شده است.

Hb	2	g/dL
PCV	0.05	
MCV	>6	fL
MCH	> 5	Pg
WBC	Normal to abnormal	
Platelets	Reduced or increased by more than 50%	

۸- مقایسه نتایج دستگاه سل‌کانتر با گسترش لام خون محیطی: در این روش نتایج حاصل از شمارش پلاکت و گلبولهای سفید توسط سل‌کانتر با تعداد سلولهایی که در گسترش لام خون محیطی شمارش شده مقایسه می‌گردد. در جدول زیر ارتباط بین میانگین سلول‌های شمارش شده در گسترش لام خون محیطی با تعداد تخمینی سلول‌ها نشان داده شده است.

میانگین تعداد گلبولهای سفید شمارش شده در هر میدان دید با بزرگنمایی زیاد (۴۰×)	تعداد تخمینی گلبولهای سفید ($\times 10^9$/L)	میانگین تعدادپلاکتهای شمارش شده در هر میدان دیدبا بزرگنمایی زیاد(دید روغن ۱۰۰×)	تعداد تخمینی پلاکتها ($\times 10^9$)
۲-۳	۳-۷	۲-۳	۵۰-۱۰۰
۴-۶	۷-۱۰	۴-۶	۱۰۰-۱۵۰
۷-۱	۱۰-۱۳	۷-۱	۱۵۰-۲۵۰
۱۱-۲۰	۱۳-۱۸	۱۱-۲۰	۲۵۰-۵۰۰

دستگاه میکرو هماتوکریت

دستگاه میکرو هماتوکریت باید دارای مشخصات زیر باشد.

شعاع چرخش بیشتر از ۸ سانتیمتر باشد

توانایی رسیدن به حداکثر سرعت در عرض ۳۰ ثانیه.

توانایی ایجاد RCF حدود ۵ تا ۱۰ هزار g در محیط به‌مدت حداقل ۵ دقیقه بدون افزایش دما از ۴۵ درجه سانتیگراد.

داشتن زمان‌سنج اتوماتیک (با قابلیت تنظیم حداقل ۳۰ ثانیه).

RCF(Relative Centrifugal Field): میدان نسبی سانتریفوژ

RPM(Revolation Per Minute): دور در دقیقه

$$RCF=1.118 \times 10^{-5} \times r \times RPM^2$$

کنترل کیفی وبررسی کالیبراسیون دستگاه میکرو هماتوکریت

برای کنترل کیفی دستگاه ضروری است به نکات زیر توجه شود.

a. سرعت سانتریفوژ(بررسی توسط تاکومتر)

b. زمان سنج دستگاه (بررسی توسط کورنومتر)

c. حداکثر توان در تجمع سلول‌ها

برای بررسی حداکثر توان در تجمع سلول‌ها می‌توان از روش زیر استفاده نمود.

- دو نمونه خون تازه که دارای ضد انعقاد K_2EDTA است به خوبی میکس نموده و نمونه‌ها را به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ و مقادیر بدست آمده را یادداشت می‌نماییم. سپس هر ۳۰ ثانیه، زمان سانتریفوژ را افزایش داده و این کار را تا زمانی‌که مقادیر دو هماتوکریت بدست آمده بدون تغییر باقی بماند ادامه می‌دهیم. این زمان به عنوان حداقل زمان لازم جهت متراکم کردن گلبولهای قرمز در نظر گرفته می‌شود. این آزمایش بهتر است حداقل با یک نمونه دارای هماتوکریت ۰/۵ یا بیشتر نیز انجام گیرد.

مثال برای بررسی حداکثر توان در تجمع سلول‌ها:

Time	PCV	
	Sample 1	Sample 2
2.0	0.40	0.59
2.5	0.39	0.58
3.0	0.38	0.57
3.5	0.38 (minimum packing time)	0.56
4.0	-	0.55
4.5	-	0.55 (minimum packing time)

همانطوری که در جدول فوق مشاهده می‌شود زمان لازم جهت به متراکم نمودن گلبولهای قرمز برای دستگاه میکروهماتوکریت و هماتوکریت کمتر از ۵۰٪ حدود ۳/۵ دقیقه و برای هماتوکریت بیشتر از ۵۰٪ حدود ۴/۵ دقیقه می‌باشد.

- درصورتی‌که ارزیابی عملکرد دستگاه میکروهماتوکریت بصورت مستقیم میسر نباشد می‌توان از روش توصیه شده WHO جهت بررسی توان دستگاه به روش زیر استفاده نمود.

چند نمونه خون با هماتوکریت کمتر از ۵۰٪ را بخوبی میکس نموده و بصورت دوتایی به مدت ۳، ۵، ۷، ۹، ۱۱ دقیقه سانتریفوژ و نتایج ثبت می‌گردد. اگر توان دستگاه مناسب باشد (g) نتایج حاصل از دقیقه ۵ به بعد بدون تغییر خواهد بود.

جهت بررسی خط‌کش هماتوکریت می‌توان نمونه‌ای که هماتوکریت آن با خط‌کش هماتوکریت ۵۰٪ قرائت شده است طوری در لوله موئینه پر نمود که طول قسمت پر شده دقیقاً ۵ سانتیمتر باشد و بعد از سانتریفوژ ابتدای قسمت گلبولهای قرمز را روی نقطه صفر خط‌کش قرار داده و انتهای ستون سلول و پلاسما روی سانتیمتر ۵ قرار می‌گیرد. قرار گرفتن انتهای بالای ستون سلول بر روی خط ۲/۵ سانتیمتر نشان‌دهنده صحت کار خط‌کش هماتوکریت می‌باشد.

کنترل کیفی آزمایشات انعقادی

برای انجام آزمایشات انعقادی نیز مانند سایر آزمایشهای کمی بایستی در هر سری‌کاری از نمونه پلاسمای کنترل و یا در صورت عدو در دسترس بودن پلاسمای کنترل از Pooled Plasma که از مخلوط پلاسمای افراد طبیعی بدست آمده است استفاده نمود.

نمونه پلاسمای کنترل بایستی همان ویژگی‌هایی که در مورد نمونه کنترلی، قبلاً ذکر شد را داشته باشد. البته استفاده از دو نمونه کنترل در دو سطح متفاوت بیشتر توصیه شده است.

اگر پلاسمای کنترل تجاری در دسترس نبود بایستی بدلیل اختلاف غلظت فاکتورهای انعقادی در افراد مختلف و با توجه به لزوم فعالیت انعقادی ۱۰۰٪ برای تهیه این نمونه باید پلاسمای ۲۰ مرد و زن طبیعی (غیر حامله که OCO نیز مصرف نمی‌کنند) با هم مخلوط شود. پس از اطمینان از عدم آلودگی نمونه می‌توان نمونه را در لوله-های پلاستیکی کوچک تقسیم نموده و در دمای زیر ۲۰ درجه سانتیگراد (ترجیحاً زیر ۵۰ درجه سانتیگراد) نگهداری نمود.

برای تعیین محدوده نمونه Pooled Plasma ، نمونه را ۲۰ بار آزمایش نموده و میانگین و انحراف معیار را محاسبه می‌شود. محدوده مورد انتظار mean±2SD می‌باشد. در هر سری‌کاری نمونه کنترل یا Pooled Plasma همراه نمونه‌های بیمارن آزمایش شود و نتایج آن با محدوده مورد انتظار مقایسه گردد. میزان مجاز پراکندگی نتایج بر حسب CV حداکثر ۵٪ می‌باشد.

آزمایش‌های انعقادی بویژه به روش دستی بایستی بصورت دوتایی انجام گیرند و برای مورد قبول واقع شدن نتایج بایستی به تفاوت نتایج جفت آزمایش‌های دوتایی توجه نمود. بدین صورت که اگر این دو نتیجه حداکثر اگر ۱۰٪ با هم متفاوت باشند قابل قبول است در غیر این‌صورت آزمایش بایستی تکرار شود.

نتیجه آزمایش (ثانیه)	حداکثر تفاوت قابل قبول بین نتایج دو آزمایش(ثانیه)
۰-۲۰	۱-۲
۲۱-۶۰	۲-۶
۶۱- ۱۰۰	۶-۱۰
>۱۰۰	۱۰-۲۰

اصول صحیح کنترل کیفی در آزمایشگاه میکروب‌شناسی

تهیه و کنترل کیفیت محیط های کشت

نکات عمومی در مورد محیط های کشت:

آب:

کیفیت محیط‌های کشت بطور مستقیم بستگی به کیفیت مواد خام مورد استفاده در تهیه آن‌ها دارد. آب یکی از مهمترین موادی است که در تهیه محیط های کشت بکار می‌رود. سه معیار مهم برای آب مورد استفاده در تهیه محیط های کشت شامل وجود یونهای مس، قدرت هدایت الکتریکی و pH می‌باشد. در شرایط ایده آل یون-های مس بدلیل خاصیت مهارکنندگی برای اغلب میکروارگانیسم‌ها نباید در آب مورد استفاده جهت تهیه محیط‌های کشت وجود داشته باشد. قدرت هدایت الکتریکی آب باید کمتر از ۱۵ میکرو زیمنس باشد وهمچنینpH آب مورد استفاده بهتر است کمی اسیدی باشد ولی نباید کمتر از ۵/۵ باشد.

توزین محیط کشت و افزودن آب:

طبق دستورالعمل تهیه محیط کشت که بر روی قوطی نصب گردیده است، مقدار مناسبی از پودر محیط کشت را با دقت وزن نمایید. ظرف محیط کشت را دور از کوران هوا و رطوبت باز کنید. از استنشاق پودرها به خصوص آنهایی که دارای مواد سمی هستند و تماس طولانی مدت آنها با پوست اجتناب کنید. پودر را به سرعت، به دقت و بدون ایجاد توده ای از غبار وزن کنید. هرچه زودتر درب ظرف را ببندید.

نصف حجم آب مورد نیاز را داخل ظرف بریزید. سپس مقدار وزن شده محیط کشت را به آن اضافه نمایید. برای چند دقیقه به تندی تکان دهید. باقیمانده آب را به دیواره ظرف بریزید تا ذرات محیط کشت چسبیده به دیواره نیز وارد محلول شوند. این مرحله بسیار مهم است، چون پودر خشک محیط کشت در بالای سطح آب، ممکن است در اتوکلاو استریل نشود و منبع آلودگی گردد.

حل کردن محیط کشت:

محیط‌های کشت بدون آگار، معمولا با تکان دادن آهسته و ملایم حل خواهند شد. اما محیط‌های کشت حاوی آگار باید قبل از حرارت دادن به مدت چند دقیقه با آب مخلوط شوند. سپس حرارت داده شوند تا آگار قبل از اتوکلاو کردن، حل شود. محیط های کشت را بجوشانید بدون آنکه بسوزند.

محیط‌های کشتی که نباید اتوکلاو شوند، بعد از این مقدار حرارت دادن، برای تقسیم داخل پلیت ها یا ظروف دیگر آماده خواهند بود. اکثر محیط‌های کشت به استریلیزاسیون نهایی (در دمای ۱۲۱ $^{\circ}$ C به مدت ۱۵ دقیقه) نیاز خواهند داشت.

اندازه گیری و تنظیم pH:

محیط‌های کشت دهیدراته اگر بطور مناسب تهیه شوند نیازی به تنظیم pH ندارند. pH نهایی محصول استریل شده را می توان روی پلیت یا بطری اندازه گیری کرد، اما باید آنها را بعد از سنجش pH دور ریخت. بنابراین بعد از استریل شدن و خنک شدن محیط کشت تا دمای ۲۵ $^{\circ}$ C، مقدار pH را در حد مورد نظر (۰/۲ ±) تنظیم نمایید. تنظیم pH معمولا با استفاده از هیدروکسید سدیم ۴۰ گرم در لیتر (تقریبا" یک مولار) و یا با استفاده از اسید کلریدریک ۳۶/۵ گرم در لیتر (تقریباً یک مولار) انجام می‌شود.

توزیع:

محیط کشت را در ظرفی مناسب با حجم ۲ تا ۳ برابر حجم محیط کشت بریزید تا بتوانید آنرا به خوبی تکان دهید و مخلوط کنید.

استریلیزاسیون:

بعضی از محیط‌های کشت به استریلیزاسیون با اتوکلاو احتیاجی نداشته و با جوشاندن استریل می‌شوند که دستور ساخت آنها بر روی برچسب قوطی محیط کشت قید گردیده است. استریلیزاسیون سایر محیط‌های کشت توسط حرارت مرطوب یا صافی غشایی انجام می‌گردد که این موارد نیز بر روی بر چسب قوطی محیط کشت قید گردیده است.

الف) استریلیزاسیون با حرارت مرطوب:

استریلیزاسیون محیط کشت تا حجم یک لیتر، در اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۱۲۱ $^{\circ}$ C (فشار ۱/۲ کیلوگرم بر سانتیمترمربع) انجام می‌گیرد. برای حجم‌های بیشتر از یک لیتر باید چرخه استریلیزاسیون را بطور مناسب تغییر داد. اما چون اکثر مشکلات در استریلیزاسیون محیط‌های کشت وقتی رخ میدهد که مقادیر بیشتر از دو لیتر محیط کشت باید استریل شود، لذا توصیه می‌شود که مقادیر زیاد محیط کشت را در حجم‌های کوچکتر تقسیم نمایید.

کنترلی کیفی اتوکلاو ، کنترل دما و فشار اتوکلاو بایستی بطور مداوم انجام گردد. برای کنترل اتوکلاو از اندیکاتورهای شیمیائی TST استفاده می‌کنند. از اندیکاتورهای بیولوژیکی که جهت کنترل کارائی اتوکلاو استفاده می کنند اسپور *Bacillus Stearothermophilus* را می‌توان نام برد که بصورت تجاری قابل دسترس می باشد.

ب) استریلیزاسیون با صافی غشایی:

از صافی غشایی برای استریل کردن محیط‌های کشت و ترکیبات حساس به حرارت استفاده می‌شود. استریلیزاسیون بوسیله صافی غشایی تحت شرایط خلاء یا افزایش فشار انجام می‌پذیرد. از غشاء ها و صافی‌های با قطر منفذ ۰/۲۲ یا ۰/۴۵ میکرومتر استفاده نمایید. این فیلترها باید قبل از استفاده، در اتوکلاو استریل شوند. در مورد غشاء ها و صافی‌هایی که در بسته‌بندیهای استریل به فروش می‌رسند، به دستورالعمل سازنده مراجعه نمایید. قسمت‌های مختلف دستگاه صافی را با صافی یا بدون صافی در اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه در دمای C ۱۲۱° استریل نمایید.

آماده سازي جهت مصرف:

بعد از استریلیزاسیون، اجازه دهید دمای محیط کشت به حدود C ۵۰° برسد، سپس با رعایت شرایط آسپتیک در ظروف نهایی تقسیم نمایید. هیچ وقت محیط کشت را در دمای بالاتر از C ۵۰° تقسیم نکنید. مکمل-های حساس به گرما و حرارت باید بعد از این که دمای محیط کشت به حدود C ۵۰° رسید، به آن اضافه شوند. اجازه دهید دمای مکمل (ساپلمنت) استریل قبل از این که به محیط کشت اضافه شود، به دمای اتاق برسد. سپس مکمل را با رعایت شرایط آسپتیک به محیط کشت اضافه نموده، خوب مخلوط کنید و در ظروف نهایی که از قبل استریل شده اند، تقسیم نمایید.

پتری دیش:

کیفیت پتری‌دیش‌های مورد استفاده در تهیه محیط نیز اهمیت دارد. معمولاً پتری‌دیش‌ها را با اتیلن اکساید ویا اشعه گاما استریل می‌کنند. در صورت استفاده از پتری‌دیش‌هایی که با اتیلن اکساید استریل شده باشند بایستی از نظر وجود بقایای این ماده بررسی شود زیرا اتیلن اکساید دارای خاصیت مهارکنندگی برای میکروارگانیسم‌ها می‌باشد و می‌توان آن را با روش کروماتوگرافی اندازه گرفت.

در صورت استفاده از پتری‌دیش‌های شیشه‌ای بایستی از پتری‌دیش‌هایی از جنس بروسیلیکات استفاده کرد. استفاده از پتری‌دیش‌هایی از جنس قلیائی ممکن است موجب آزادسازی قلیا در داخل محیط کشت گردد.

پارامترهای فیزیکی:

محیط کشت‌های تهیه شده باید قبل از استفاده، از لحاظ فیزیکی و ظاهری نیز بررسی شوند. معیارهای ظاهری قابل بررسی شامل وجود حباب، حفره، ناصافی سطح محیط، ترک خوردگی، یخ زدگی می‌باشد. ضخامت محیط نیز اهمیت دارد. ضخامت محیط‌های کشت پلیتی نباید کمتر از ۳ میلی‌متر باشد.

نگهداری محیط های کشت تهیه شده:

طول عمر محیط‌های کشت تهیه شده بستگی به نوع اجزاء تشکیل دهنده محیط، نحوه نگهداری و ذخیره کردن آنها دارد. تمامی محیط‌های کشت باید دور از نور نگهداری شوند. تابش نور به محیط های کشت موجب تشکیل مواد باکتریوستاتیک و باکتریوساید مانند پراکسیداز می‌گردد. طول عمر اغلب محیط‌های کشت پلیتی در دمای ۴ درجه سانتیگراد یک هفته می‌باشد ولی اگر در داخل کیسه‌های پلاستیکی بسته بندی شوند بطوری‌که هوا داخل آنها نفوذ نکند تا ۴-۳ هفته قابل مصرف هستند. طول عمر محیط‌های کشت حاوی آنتی بیوتیک بستگی به پایداری آنتی بیوتیک موجود در آن دارد. در مجموع محیط‌های حاوی آنتی بیوتیک را در مدت یک هفته باید مصرف کرد. از سوی دیگر با گذشت زمان این‌گونه محیط‌های کشت رطوبت خود را از دست داده، بدلیل افزایش غلظت آنتی بیوتیک قدرت انتخابی آنها افزایش می‌یابد. پلیت‌ها را باید قبل از مصرف به دمای اتاق رساند. اگر پلیت محیط کشت بیش از ۸ ساعت در دمای اتاق باقی بماند برای مصرف مناسب نمی‌باشد. محیط‌های کشت لوله‌ای در مقایسه با محیط‌های کشت پلیتی عمر طولانی‌تری دارند. اغلب این محیط‌های کشت اگر در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شوند ۶-۳ ماه قابل مصرف می‌باشند.

موارد استثناء:

تایوگلیکولات براث، اندول نیترات براث و SIM فقط به مدت یک‌ماه قابل نگهداری می‌باشند. محیط های CTA Medium و OF Medium حاوی کربوهیدرات و مولرهینتون براث فقط به مدت ۶ هفته قابل نگهداری می‌باشند.

اشکالات و علل رایج در محیط‌های کشت

اشکال	علت
نرم بودن آگار	حرارت بیش از حد، pH پایین که موجب هیدرولیز اسید در محیط کشت می‌گردد، توزین یا مخلوط نکردن درست، حل نشدن کامل آگار، حجم نادرست آب، رقیق سازی زیاد با مایع تلقیح یا مکمل ها و ذخیره سازی طولانی در دمای ۵۰ °C
pH نامناسب	استفاده از شیشه های قلیائی، آب ناخالص، حرارت بیش از حد، آلودگی شیمیائی، اندازه گیری pH در دمای نامناسب، استفاده از pH متر غیرکالیبره، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده، ذخیره سازی نادرست محیط کشت دهیدراته و کیفیت پایین آب یا ظروف
رنگ یا تیرگی غیرطبیعی	ناخالص بودن آب، استفاده از شیشه آلات کثیف، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده، حرارت دادن بیش از حد، pH نامناسب، حل نشدن کامل محیط کشت و ذخیره سازی طولانی در دمای ۵۰ °C
سمیت	حرارت دادن بیش از حد (سوزاندن محیط)، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده، قرارگیری در معرض مستقیم نور خورشید و حجم نادرست مکمل اضافه شده
رشد ضعیف ارگانیسم یا داشتن خاصیت ضعیف انتخابی و یا افتراقی	استفاده از آب و یا شیشه آلات آلوده، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده، توزین یا مخلوط نکردن درست، حرارت بیش از حد، ذخیره سازی طولانی محیط کشت، خشک شدن، تیرگی وتغییر pH محیط کشت
لخته یا کواگوله شدن محیط کشت	حرارت بیش از حد محیط در هنگام افزودن مکمل به آن
رگه رگه شدن محیط کشت	رگه رگه سیاه: نیم سوز شدن آگار رگه رگه روشن: سرد شدن آگار موقع افزودن مکمل
ایجاد رسوب یا کدورت	pH نامناسب، ناخالص بودن آب، استفاده از شیشه آلات کثیف، حل نشدن محیط کشت، کیفیت پایین آب یا ظروف، حرارت بیش از حد و ذخیره سازی طولانی در دمای ۵۰ °C

کنترل کیفی محیط های کشت میکروبی:

اصطلاحات مربوط به سویه های میکروبی کنترل

- سویه کنترل (Control Strain): میکروارگانیسمی که برای ارزیابی عملکرد میکروبی محیط کشت استفاده می‌شود.
- سویه مرجع (Reference Strain): میکروارگانیسمی که حداقل تا سطح جنس و گونه شناسایی شده و بر اساس ویژگی ها و ترجیحاً منشا آن، فهرست‌بندی و تعریف شده است.
- ذخیره‌های مرجع (Reference Stocks): کشت‌های بدست آمده از پاساژ سویه مرجعی که از مراکز بین المللی تهیه شده است.
- ذخیره‌های‌کاری (Working Stocks): کشت مجددی که از کشت های ذخیره جهت کنترل کیفیت محیط‌های کشت استفاده می‌شود.

منبع سویه‌های کنترل:

همه سویه‌های کنترل که در جدول از آنها نام برده شده‌است، ATCC می‌باشند (A mericantype culture collection) این سوش‌ها، حداقل سوش‌هایی هستند که باید برای ارزیابی هر محیط کشت استفاده شوند. ارگانیسم‌های مورد استفاده برای اهداف کنترل کیفی می‌تواند از سویه‌های National collection باشد. سویه‌های دیگری نیز ممکن است توسط سازنده محیط کشت به کار رود که شامل مجموعه‌ای از سویه‌های وحشی (Wild strain) یا بدست آمده از نمونه‌های بیمار می‌باشد که مختص هر آزمایشگاه بوده و برای انجام آزمایش‌های بیشتر به کار می‌روند.

روش انجام آزمون کنترل کیفیت محیط‌های کشت

تهیه سوسپانسیون میکروبی:

یک کشت از ارگانیسم کنترل کیفی روی پلیت بلادآگار تهیه کنید. بعد از انکوباسیون پلیت ۵-۳ کلنی ایزوله را در مقدار کمی تریپتیکیس سوی براث (TSB) استریل حل نمایید تا سوسپانسیون میکروبی حاصل شود و آن را برای چهار یا پنج ساعت انکوبه نمایید. سپس کدورت آن را با استاندارد نیم مک فارلند تنظیم کنید. (استاندارد نیم مک فارلند در طول موج 625 nm، دارای جذب ۰/۰۸ تا ۰/۱ ناتومتر می‌باشد)

به جای این روش می‌توان مستقیماً از کلنی های ایزوله روی پلیت، سوسپانسیون میکروبی مطابق با کدورت نیم مک فارلند تهیه کرد. بدین ترتیب که ۵-۳ کلنی ایزوله روی پلیت ۲۴ ساعته را در ۵-۳ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل حل کرده و کدورت آن را با نیم مک فارلند تنظیم نمایید. با هر روشی که این سوسپانسیون میکروبی تهیه شود، باید کدورتی حاوی 10^7-10^8 CFU/ml کلنی داشته باشد. (مطابق با استاندارد نیم مک فارلند).

بررسی آزمایش‌هاي عملکردی محیط کشت (Performance testing)

۱ - آزمایش ظرفیت مغذی بودن (Nutritional activity) محیط هاي کشت پلیتی مانند بلاد آگار

سوسپانسیون اولیه را به نسبت **۱ به ۱۰۰** در نرمال سالین یا آب مقطر استریل رقیق نموده و مقدار µl ۱۰ یا ml ۰/۰۱ سوسپانسیون رقیق شده را به محیط کشت مورد آزمایش تلقیح کنید. تعداد کلنی‌های مورد انتظار در هر پلیت (CFU/plate) $۱۰^۳$-$۱۰^۴$ می‌باشد. برای اجتناب از رشد زیاد باکتری در بعضی از محیط‌های کشت انتخابی ممکن است نیاز باشد که سوسپانسیون را ده بار رقیق‌تر تهیه نمایید.

۲ - آزمایش ظرفیت مهار کنندگی محیط های کشت انتخابی پلیتي مانند مکانکي آگار

سوسپانسیون اولیه را به نسبت **۱ به ۱۰** در نرمال سالین یا آب مقطر استریل رقیق نموده و مقدار µl ۱۰ یا ml ۰/۰۱ سوسپانسیون رقیق شده را به محیط کشت مورد آزمایش تلقیح کنید. تعداد کلنی‌های مورد انتظار در هر پلیت (CFU/plate) $۱۰^۴$-$۱۰^۵$ می‌باشد. برای اجتناب از رشد زیاد باکتری در بعضی از محیط‌های کشت انتخابی ممکن است نیاز باشد که سوسپانسیون ده بار رقیق‌تر تهیه شود.

۳ - آزمایش محیط های کشت لوله ای

هر لوله باید با µl ۱۰ یا ml ۰/۰۱ از سوسپانسیون اولیه تهیه شده مطابق با نیم مک فارلند (بدون رقیق سازی) تلقیح شود. گاهی ممکن است به تلقیح کمتر یا بیشتر نیاز باشد.

محیط مورد آزمون را بعد از تلقیح تحت شرایطی که در جدول آمده است، انکوبه نمایید. به طور نرمال زمان انکوباسیون، ۲۴-۱۸ ساعت یا ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ^oC ۳۵±۲ می‌باشد. محیط شکلات آگار و سایر محیط-های کشت برای جداسازی انتخابی گونه های نیسریای بیماریزا باید در ۱۰- ۵٪ Co_2 انکوبه شوند و در فواصل زمانی۲۴-۱۸ ساعت وسپس ۴۸-۲۴ ساعت بررسی گردند.

برای باکتری‌های بی‌هوازی، کشت‌ها عموماً به حداقل ۴۸ ساعت انکوباسیون در شرایط بی‌هوازی و غنی از Co_2 نیاز دارند.

در مورد کمپیلوباکتر آگار، پلیت‌ها باید در ۴۲ ^oC در شرایط میکروآئروفیلیک غنی از Co_2 به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شوند.

۴ـ کنترل محیط‌های کشت برای آزمایش‌های بیوشیمیایی

از سوسپانسیون میکروبی رقیق نشده برای کنترل این محیطها استفاده می کنیم.

پس از تلقیح، تمام کشت ها را در شرایط لازم (از نظر Co_2، رطوبت و یا شرایط بیهوازی و درجه حرارت مناسب) قرار داده و پس از طی مدت زمان لازم (۲۴ تا ۴۸ ساعت) آنها را مورد بررسی قرار می دهیم. محیط های مناسب دارای رشد کافی از کلنی های باکتریهای مورد نظر می باشند و در مورد محیطهای انتخابی مهار میکروارگانیسمهای مورد نظر باید مشخص باشد.

کنترل محیط های ساخته شده تجاری (آماده مصرف):

۱- رطوبت: محیطهای کشت باید بدون هر گونه رطوبت اضافی بوده، همچنین هیچ نشانه ای از خشک شدن اطراف محیط کشت نباید مشاهده گردد.

۲- سترون بودن: محیطهای کشت باید عاری ازآلودگی باشند.

رنگ: محیطهای کشت آگار خون‌دار نباید هیچ نشانه‌ای از همولیز داشته باشند و محیط‌های کشت دیگر نباید هیچگونه تغییر رنگ غیر طبیعی داشته باشند.

بررسی آلودگی محیط های کشت (استریل بودن محیط های کشت):

در صورتی‌که تعداد پلیت یا لوله تهیه شده در هر سری ساخت یا Lot، ۱۰۰ عدد یا کمتر باشد، باید به تعداد ۵-۳٪ محیط‌های تهیه شده را در دمای ۳۷ ^oC-۳۵ به مدت ۵-۲ روز انکوبه نمود. برای Lotهای با تعداد بیش از ۱۰۰، باید به تعداد ۱۰ پلیت یا لوله را به طور تصادفی برداشته و در شرایط فوق انکوبه نمود. بعد از انکوباسیون هیچ‌گونه رشد میکروبی نباید مشاهده شود.

تفسیر نتایج:

یک محیط کشت زمانی قابل قبول می‌باشد که با همه سویه های پیشنهادی برای آزمون محیط کشت که در جدول زیر مشخص شده است، رشد کافی داشته و خصوصیات مورفولوژیکی کلنی ها بارز باشد. در مورد محیط-های انتخابی، رشد بعضی از ارگانیسم های خاص مهار می‌شود، ضمن اینکه اجازه رشد کافی به سایرارگانیسم می-

دهد. در بعضی موارد، واکنش‌های رنگی خاص یا همولیز همچنانکه در جدول آمده است، باید ایجاد شود. مثلاً در مورد کشت بلادآگار ایجاد همولیز مناسب ضروری است و یا برای محیط مکانکی آگار ایجاد واکنش‌های رنگی برای سویه‌های میکروبی مشخص ضروری می‌باشد.

سایر معیارهای تضمین کیفیت:

محیط‌های کشت آماده مصرف باید از نظرموارد زیر نیز بررسی شوند:

- شکستگی ظروف پتری
- پر شدن ناصاف پلیت‌ها
- ترک خوردگی محیط کشت در پلیت‌ها
- وجود همولیز (برای بلاد آگار)
- یخ زدگی

وجود مقدار زیاد حباب یا حفره در سطح محیط کشت

محیط کشت	زمان انکوباسیون	ارگانیسم های کنترلی	نتیجه قابل انتظار
بایل اسکولین آگار	۲۴ ساعت	استرپتوکوک فکالیس S. faecalis استرپتوکوک پایوژنز S. pyogenes	رشد مثبت، محیط سیاهرنگ می شود رشد منفی
بلاد آگار جار شمع دار CO_2	۲۴ ساعت	استرپتوکوک پایوژنز Streptococcus pyogenes استرپتوکوک پنومونیه S. pnemoniae	رشد مثبت دارای همولیزبتا رشد مثبت دارای همولیز آلفا
شکلات آگار	۲۴ ساعت	هموفیلوس آنفلوانزا Haemophilus influenzae	رشد مثبت
لایزین دکربوکسیلاز (محیط بوسیله روغن استریل پوشانده میشود)	۴۸ ساعت	سالمونلا تایفی موریوم S. typhimurium شیگلافلکسنری Shigella flexneri	مثبت (بنفش رنگ می شود) منفی (بدون تغییر رنگ)
اورنیتین (دکربوکسیلاز)	۴۸ ساعت	سالمونلا تایفی موریوم S. typhimurium کلبسیلا پنومونیه K. pneumoniae	مثبت منفی
آرژینین (دی هیدرولاز)	۴۸ ساعت	سالمونلا تایفی موریوم S. typhimurium پروتئوس میرابیلیس Proteus mirabilis	مثبت منفی
ژلاتیناز	۲۴ ساعت	اشرشیا کلی E. coli	منفی

		باسیلوس سوبتیلیس Bacillus subtilis	مثبت
کلایگلرآیرون آگار	۲۴ ساعت	سیتروباکتر فروندی Citrobacter frundii سالمونلا تایفی موریوم S. typhimurium شیگلا فلکسنری Sh. flexneri اسینتوباکتر کالکوستیکوس Acinetobacter calcoaceticus	گاز + SH_2 ,A/A گاز یا بدون گاز + SH_2 ,K/A K/A تغییر نمی کند
مک کانکی آگار (همراه با کریستال ویوله)	۲۴ ساعت	اشرشیا کلی E. coli پروتئوس میرابیلیس Proteus mirabilis استرپتوکوک فکالیس S. faecalis	کلنی های قرمز رنگ کلنی های بیرنگ، بدون سوارمینگ (خزش) رشد منفی
مالونات	۲۴ ساعت	اشرشیا کلی E. coli کلبسیلا پنومونیه K. pneumonia	منفی (سبز رنگ) مثبت (آبی رنگ)
مانیتول سالت آگار	۲۴ ساعت	استافیلوکوک اورئوس S. aureus S. epidermidis استافیلوکوک اپیدرمیدیس اشرشیا کلی E. coli	کلنی های زرد رنگ کلنی های قرمز رنگ رشد منفی
MRVP	۴۸ ساعت	اشرشیا کلی E. coli کلبسیلا پنومونیه K. pneumonia	MR مثبت- VP منفی MR منفی- VP مثبت
مولرهینتون آگار	۲۴ ساعت	استافیلوکوک اورئوس S. aureus ATCC 25923 سودوموناس آئروژینوزا P. aeruginosa ATCC 27853 اشرشیا کلی E. coli ATCC 25922	به جدول میزان هاله عدم رشد قابل قبول در بخش آنتی بیوگرام مراجعه شود
نیترات براث	۲۴ ساعت	اشرشیا کلی E. coli اسینتوبا کتر کالکوستیکوس Acinetobacter calcoaceticus	مثبت منفی
آب پپتونه (اندول)	۲۴ ساعت	اشرشیا کلی E. coli کلبسیلا پنومونیه K. pneumoniae	مثبت منفی
فنیل آلانین دآمیناز	۲۴ ساعت	اشرشیا کلی E. coli پروتئوس میرابیلیس P. mirabilis	منفی مثبت
سالمونلا شیگلا آگار (S.S) یا دزوکسی کلات سیترات آگار	۲۴ ساعت	اشرشیا کلی E. coli سالمونلا تایفی موریوم Salmonella typhimurium	منفی کلنی های بیرنگ

		یرسینیا انتروکولیتیکا Yersinia enterocolitica شیگلا فلکسنری Shigella flexneri	کلنی های بیرنگ کلنی های بیرنگ
سلنیت برات (SF)	۲۴ ساعت	سالمونلا تایفی موریوم S. typhimurium اشرشیا کلی E. coli	بعد از کشت مجدد رشد می کند بعد از کشت مجدد رشد نمی کند
سیمون سیترات (در لوله های با درپیچ شل در انکوباتور گذاشته شود)	۴۸ ساعت	اشرشیا کلی E. coli کلبسیلا پنومونیه K. pneumonia	رشد منفی رشد مثبت- رنگ آبی
TCBS آگار	۲۴ ساعت	Vibrio SPP	کلنی های زرد رنگ
تایر مارتین	۲۴ ساعت	نایسریا منتژیتیدیس Neisseria meningitidis (CO_2) نایسریا گونوره N. Gonorrhoeae اشرشیا کلی E. coli	رشد مثبت رشد مثبت رشد منفی
تایوگلیکولات براث Thioglycollate broth	۲۴ ساعت	باکتروئیدس فراجیلیس Bacteriodes fragilis	رشد مثبت
TSI عمق محیط باید ۳ سانتی متر باشد (با درپیچ شل اتوو گذاری شود)	۲۴ ساعت	سیتروباکتر فروندی Citrobacter frundii سالمونلا تایفی موریوم S. typhimurium شیگلا فلکسنری Sh. flexneri اسینتوباکتر کالکوستیکوس Acinetobacter calcoaceticus	گاز + SH_2 ,A/A گاز یا بدون گاز + SH_2 ,K/A K/A تغییر نمی کند
محیط اوره	۲۴ ساعت	اشرشیا کلی E. coli پروتئوس میرابیلیس P. mirabilis	منفی مثبت، صورتی

اصول صحیح کنترل کیفی در آزمایشات کیفی:

- در هر سری‌کاری بایستی از نمونه‌های کنترلی مثبت و منفی استفاده گردد. بهتر است علاوه بر کنترل‌هایی که داخل کیت وجود دارد، نمونه‌های مثبت و منفی دیگر(نمونه کنترل تجاری یا نمونه انسانی) نیز آزمایش شوند.
- در مورد استفاده از کیت و شرایط نگهداری و استفاده از آن بایستی بطور کامل از دستورالعمل سازنده آن تبعیت نمود.
- عواملی که در واکنش اتصال آنتی‌ژن و آنتی‌بادی دخالت دارند، مانند PH محیط، بافر مناسب، دما، حرکت مناسب(Shaking) و نسبت معرف‌ها و نمونه‌ها رعایت شوند.
- احتمال بروز Hook effect ، Prozone در نظر گرفته شود.
- به مختصات کیت مانند Detection limit توجه شود.
- معرف‌ها بصورت تازه تهیه شوند.
- معرف‌ها از نظر اتواگلوتیناسیون و تغییر رنگ بررسی شوند.
- نمونه‌گیری و نگهداری نمونه بر اساس نوع آزمایش به‌نحو مناسب انجام گردد.
- در مورد آزمایش IFA از کونژوگه مناسب استفاده و نتیجه نهایی بر اساس نظر دو نفر اعلام شود.

تفسیر نتایج برنامه کنترل کیفی خارجی

آزمایشگاه‌ها همانند کارخانه‌های تولیدی هستند که مواد اولیه را به محصولات مورد نظر تبدیل می‌کنند. با این تفاوت که مواد اولیه در آزمایشگاه‌های بالینی، نمونه‌های بیماران بوده و محصول نتایج آزمایش‌ها می-باشند.کیفیت نتایج آزمایش، وابسته به عملکرد پرسنل، تجهیزات و معرف‌هایی است که در این فرایند مورد استفاده قرار می‌گیرد. علاوه بر این‌ها عوامل درون فردی نیز در کیفیت نمونه تهیه شده از بیمار تاثیر می‌گذارد. 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 آزمایشگاه‌های بالینی، بررسی دوره‌ای یک روش اندازه‌گیری در جهت تصدیق اجرای آن بر اساس مشخصات تعیین شده می‌باشد. برای این منظور معمولاً از نمونه کنترل کیفی (QC) و محاسبات آماری استفاده می‌شود. 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 اندازه‌گیری است. در حالی‌که روش‌های ارزیابی کنترل کیفیت خارجی (EQA) برای حفظ صحت طولانی مدت روش‌های آزمایش مهم می‌باشد. در عمل IQC و EQA مکمل یکدیگر می‌باشند.

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 سیگنال‌های مربوط به خطا در روش آنالیز و گزارش‌دهی از نویزهای مربوط به نوسانات ذاتی روش‌ها می‌باشد. 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 این‌صورت به دلیل کاهش احتمال آشکارسازی خطا و یا افزایش رد کاذب، بتدریج میزان اعتماد به سیستم کنترلی کاهش می‌یابد.

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 می‌باشد، ولی در جزئیات تفاوت‌های زیادی وجود دارد. از آنجایی‌که 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 شرکت‌کنندگان بعد از حذف بیرون افتاده‌ها 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 آزمایشگاه‌ها بر اساس روش آزمایشگاه می‌باشد. 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 می‌تواند تفاوت قابل توجهی داشته باشند و این موضوع عدم دسته بندی، گاهی در مورد آنالیت‌های غیر آنزیمی نظیر گلوکز و کلسترول مطرح می‌گردد که در این مورد هم دسته‌بندی کردن آزمایشگاه‌ها بر اساس روش آزمایش سبب رسیدن به میزان مشترکی می‌شود که برای آزمون آماری در هر گروه مناسب‌تر است.

۲- تعیین دامنه قابل قبول

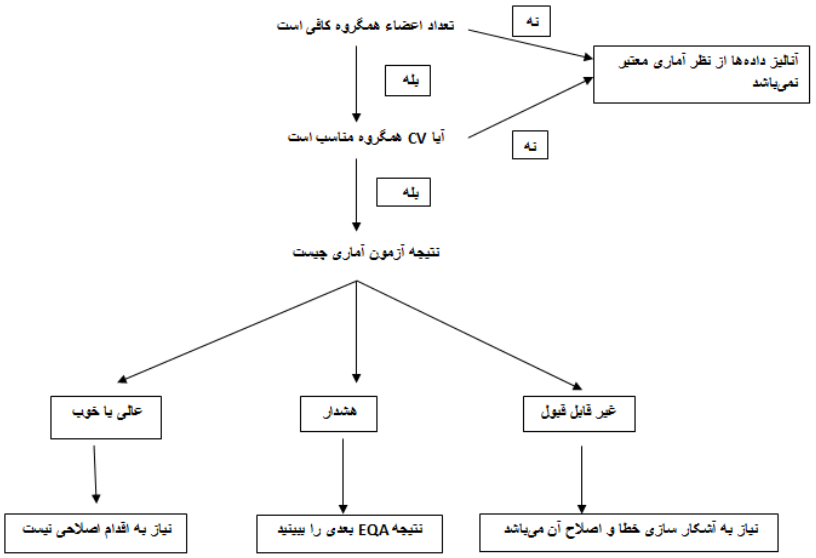
برای تعیین دامنه قابل قبول روش‌های مختلفی وجود دارد که هر کدام دارای محاسن و معایب خود می‌باشند. ولی دو روشی که در کشور ما بیشتر استفاده می‌شود استفاده از VIS و DI می‌باشد. اساس هر دو روش

یکسان می‌باشدو اختلاف این دو روش فقط انتخاب میزان SD می‌باشد که در مورد VIS از قبل تعیین شده است (بر اساس CCV% مورد استفاده) ولی در مورد DI بر اساس SD هم‌گروه می‌باشد. عدم انتخاب SD مناسب سبب می-شود که سیستم کنترلی نتواند سیگنال را از نویز تشخیص دهد. استفاده از یک دامنه ثابت مثل X±5mg/dl یا X±10% نیز توسط مراجع بین‌المللی مطرح گردیده است ولی هنوز در ایران مورد استفاده قرار نگرفته‌اند.

۳- تعیین قواعدی برای تفسیر نتایج

همانند قواعدی مثل وستگارد که در IQC مورد استفاده قرار می‌گیرد قواعدی برای تفسیر نتایج EQA وضع نشده است که مورد قبول اکثر صاحب‌نظران 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 :

۱) آزمایشگاه‌های شرکت کننده بر اساس نوع آنالیت مورد اندازه‌گیری گروه‌بندی می‌شوند.کل گروه‌ها (Total groups) شامل مجموع آزمایشگاه‌هایی می‌باشد که در اندازه‌گیری یک آنالیت خاص شرکت کرده‌اند و به آزمایشگاه‌ها اعضاء گفته می‌شود.

۲) اعضاء کل گروه بر اساس نوع کیت مصرفی به دو دسته دستی و دستگاهی تقسیم می‌شوند و اعضایی که برای اندازه‌گیری یک آنالیت از یک نوع کیت و از یک روش استفاده می‌کنند در یک گروه به نام هم‌گروه (Total group) قرار داده می‌شوند.

۳) محاسبات آماری برای به دست آوردن مقادیر : میانگین و انحراف معیار انجام می‌شود. و بعد از تعیین SD، اگر نتیجه یا نتایجی در خارج از محدوده mean±2.5SD وجود داشته باشد این نتایج به‌عنوان نتایج پرت از محاسبه خارج می‌شود و دوباره میانگین محاسبه می‌گردد و این کار را تا وقتی که نتیجه یا نتایجی در خارج از محدوده mean±2.5SD وجود نداشته باشد ادامه می‌دهم و میانگین به دست آمده تحت عنوان میانگین وزن‌دار شده (Weighted Mean) نامیده می‌شود.

VIS پارامتری است که برای ارزیابی عملکرد عضو هر گروه مورد استفاده قرار می‌گیرد. هر جه میزان VIS کمتر باشد، عملکرد عضو بهتر می‌باشد. بر اساس میزان VIS اعضاء به گروه‌های زیر تقسیم می‌شوند.

- VIS<50 نشاندهنده عملکرد عالی است.
- 50<VIS≤100 نشاندهنده عملکرد مطلوب است.
- 100<VIS≤150 نشاندهنده عملکرد قابل قبول است.
- 150<VIS≤200 نشاندهنده عملکرد هشدار دهنده است.
- 200<VIS نشاندهنده عملکرد غیرقابل قبول است.

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

- تعداد اعضاء همگروه کمتر از ۱۰ باشد.
- نام کیت و روش دستی و دستگاهی ذکر نشده باشد و یا خوانا نباشد.

۱) در صورتی‌که نتیجه گزارش شده عضو خارج از محدوده X±2.5SD همگروه یا کل گروه باشد، در محاسبات منظور نشده و عبارت «≥±2.5SD» در مقابل VIS نوشته می‌شود.

۲) گزارش نتایج بیوشیمی خون در دو جدول و دو نمودار گزارش می‌شود

جدول ۱ مروری کلی بر تمامی آنالیت‌ها است که توسط آزمایشگاه بر نمونه کنترلی ارسالی انجام شده است. پارامترهای این جدول شامل آنالیت، واحد، نتیجه، تعداد اعضاء همگروه، میانگین همگروه، CV% همگروه و VIS عضو می‌باشد.

جدول ۲ هم‌گروه‌های مربوط به یک آنالیت خاص را فهرست نموده و تعداد، میانگین و CV% هر همگروه را نشان می‌دهد. در انتهای سمت راست موقعیت عضو در همگروه به همراه نتیجه گزارش شده عضو و VIS مربوطه آورده می‌شود و برای هر آنالیت بیوشیمی یک جدول ۲ وجود دارد.

نمودار توزیع فراوانی نتایج گزارش شده (محور عمودی برای فراوانی و محور افقی برای میزان آنالیت) را نشان می‌دهد که بر روی آن محدوده‌های مربوط به VISهای مختلف(با رنگ) و موقعیت نتیجه گزارش شده عضو با ستاره مشخص می‌شود.

نمودار امتیاز شاخص بایاس (BIS,Bias Index Score) جهت ارزیابی نتایج عضو برای یک آنالیت خاص در دوره‌های مختلف می‌باشد. در این نمودار میزان VIS هر دوره برای یک آنالیت خاص با توجه به علامت منفی یا مثبت آن تحت عنوان BIS دوره‌های مختلف عملکرد خود را ارزیابی نماید.

منابع

۱- کتاب کنترل کیفیت در آزمایشگاه‌های پزشکی، نوشته دکتر فریده رضی، دکتر پریسا داهیم و ...،انتشارات نوید شیراز، سال ۱۳۸۸ .

۲- کتابچه برنامه ارزیابی خارجی کیفیت آزمایشاه‌های تشخیص طبی.

۳- http://persian.persiantd.com/archive/index.php

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

۵- دستورالعمل فنی تهیه و کنترل کیفیت محیط های کشت آزمایشگاه رفرانس.