به نام خدا

عنوان دوره:

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج

کنترل کیفی خارجی

اداره امور آزمایشگاههای دانشگاه علوم پزشکی سبزوار

زمستان 1402

کنترل کیفی خارجی و تفسیرنتایج

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

1

اصول صحیح کنترل کیفی

هدف از درخواست آزمایش توسط پزشک برای بیمار، بررسی وضعیت پاتوفیزیولوژیک وی به منظورتشخیص 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 وقابل 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:

1(تغییرات بیولوژیک / فیزیولوژیک در بدن فرد

2(مواد مداخله گر مثل داروها

3(متغییرهای پیش از انجام آزمایش (Preanalytic) مانند جمعآوری، انتقال، آمادهسازی و نگهداری نمونهها

4(متغیرهای حین انجام آزمایش(Analytic)

5(متغییرهای پس از انجام آزمایش(Postanalytic)

تمامی این فعالیتها بایستی طوری انجام شود که سه بخش پیش از انجام آزمایش (Preanalytic) وحین 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 24 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،.)...

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

2

معیارهای اصلی کنترل کیفی در آزمایشگاه: شامل 4 بخش می باشد:

1.کنترل پرسنل

2.کنترل معرفها، کیتها و مواد مصرفی

3.کنترل دستگاهها و وسائل

4.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 ونگهداری 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 وجابجایی 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.

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

3

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 مانندسیستمهای ,Opus Vitros ,Ektachem Kodakتقسیمبندی 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 وDiscrete Analyzer تقسیم میشوند .در اتوآنالایزر خودکار Continuous flowنمونه از طریق بازوی مکنده نمونه (Sample Probe) به جریان مداوم معرف وارد میشود ولی در سیستمهای Discrete Analyzerنمونه توسطProbe 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

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

4

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 وسرویس 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 33 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 33 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 اندازه گیری میکنند استفاده نمود. به طور مثال LDH و ALT که یکی افزایش و دیگری کاهش NADH را اندازهگیری میکند.

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

5

بدین ترتیب که بر روی یک نمونه کنترل در یک سری کار و به ترتیب زیر، 33 بار آزمایش LDH و 13 بار

ALTانجام میشود.

ALT

LDH

-

LDH

-

LDH

ALT

LDH

-

LDH

-

LDH

ALT

LDH

-

LDH

میزان پراکندگی نتایج اندازهگیری LDH بر حسب CV اندازهگیری میشود.سپس در یک سری کاری 33 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، به-طورمتوالی بررسی میشود .بهطور مثال گلوکز با غلظتهای 53 و 533 میلیگرم درصد و یا ALT در غلظتهای بالا وپایین انتخاب شده بهطور متناوب هر یک از نمونههای با غلظتهای پایین (L) و بالا (H) سه بار مورد آزمایش قرارمیگیرد.

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 می شود 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.

1(استفاده از نمونه کنترل و تعمیم نتایج آن به جواب آزمایشهای بیماران.

2(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 .اگرنتایج 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.

به نام خدا

1(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.)

2(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. ...

3(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.

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

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

6(قیمت ارزن و تعداد زیاد مصرفکنندگان.

7(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 وباعث 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 126 و 233 میلیگرم در دسی لیتر 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 33 تا 433 میلیگرم در دسیلیتر است میتوان کنترلهایی با غلظت تقریبی

43و 383 میلیگرم در دسیلیتر را انتخاب نمود.مواد کنترلی به دو شکل دارای مقادیر مشخص (assayed) و فاقد مقادیر مشخص (unassayed) موجوداست و هر دو نوع آنها را میتوان در بررسی دقت (Precision) استفاد نمود.

نکته :1 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 میباشدکنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

نکته :2 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.

نکته :3 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 درتمامی 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 2% در نظر گرفته شود، میزان پراکندگی نتایج برای غلظت 233 mg/dl به شکل زیر محاسبه میگردد.

از محاسبات بالا نتیجه میگیریم، به احتمال % 55 اگر کلسترول یک نمونه با غلظت واقعی233 mg/dl

چند بار اندازهگیری شود، نتایج در محدوده 8±233 mg/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 8% تعیین نماید و نمونه-ای با غلظت واقعی 126 mg/dl داشته باشد، در % 55 موارد احتمال دارد نتایجی در محدوده146 – 136mg/dl ارائه دهد که این طیف غلظتی وسیع بهطور واضح باعث اشتباه در تصمیمگیری پزشک خواهد شد .اگر این

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

9

آزمایشگاه میزان CV% مجاز خود را برای اندازهگیری گلوکز به 1% تغییر دهد، در غلظت 126 mg/dl نتایجی بین 123 mg/dl خواهد داشت که اگرچه برای پزشک مطلوب است ولی باعث میشود سریهای کاری125 – 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:

1-استفاده از محدوده مرجع : (Reference Interval) این فرضیه در سال 1563 توسط Tonks مطرح گردید .در این روش با استفاده از فرمول زیر میزان خطای کلی و CV محاسبه میگردد.

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.

2-، نظریه پزشکان :در اواسط دهه 1563 Barnett با نظر سنجی از پزشکان، خطای مجاز را تعیین نمود.

3-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 83 کمیت تعیین شده است.

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

5-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.

Biologic variation	NCEP
Test	3%
3%	Chol
3.6%	4%
HDL	4.2%
4%	LDL
10.5%	5%
TG	

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 % 55 مقادیر در محدوده ± 55/ % 2SD و7 مقادیر در محدوده ± 3SD قرار میگیرند .سپس احتمال اینکه یک خوانده بهطور اتفاقی خارج از محدوده± 2SD

1نتیجه بین 23 خوانده) میباشد و در مورد محدوده %) قرار گیرد حدود 3 3SD 5 نتیجه بین ± 3/%) 1333 تنها3 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 تعداد33 خوانده محدوده mean±3.14 SD و برای 433 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 3 نتیجه بین 3/) 1333 فقط333 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

1-مشخص نمودن عدم دقت مجاز با توجه به شرایط آزمایشگاه بر حسب. %CV

2-انتخاب نمونه کنترلی مناسب حتیالمکان در دو غلظت

3-خوانش نمونه کنترلی به تعداد 23 بار به یکی از طرق زیر:

(aاین تعداد خوانش بهتر است در مدت 23 روز کاری و با تکرار آزمایش بدست آمده باشد(در مدت 4 هفته.)

(bانجام آزمایش بهصورت دوتایی در 13 روزکاری

(cدر صورت عدم امکان روشهای فوق میتوان در 5 روزکاری با 4 بار تکرار در روز این مقادیر را بهدست آورد.

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

5-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 6 ادامه داده میشود در غیر این-صورت عامل ایجاد خطا بایستی شناسایی شده و پس از رفع مشکل، مجدداً مراحل 1 تا 4 اجرا خواهد شد در صورتیکه مشکل رفع نشد با تولیدکننده فراورده و یا دستگاه تماس گرفته میشود.

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

7-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.

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

13

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 %3 انتخاب و دو سرم کنترل با غلظتهای نزدیک به غلظت تصمیمگیری (Decision level)را طی 5 روز کاری، 23 بار آزمایش نموده است که نتایج آن بهقرار زیر است.

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

14

چون CV% حاصله در محدوده خطای مجاز تعیین شده)3% (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 کنترلیLevey-Jenning

چارتهای کنترلی برای اولین بار در سال 1553 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*

1-بعد از آزمایش نمونههای کنترلی حداقل به تعداد 23 بار میانگین و انحراف معیار را محاسبه کنید(مطابق مراحل 1 تا 5 در بخش اجرای کنترل داخلی کیفیت.)

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

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

4-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.

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

15

5-تا زمانیکه نتایج مورد انتظار 3SD ± mean یا(2SD ± mean 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 233 و انحراف معیار 4 میلیگرم در

دسیلیتر

به علت اینکه استفاده از چارت Levey-Jenning ساده است اکثر آزمایشگاهها از این چارت استفاده می-شود ولی استفاده از هر کدام از این محدودههای 3SD ± mean یا 2SD ± mean دارای معایبی میباشد اگر محدوده 3SD ± mean انتخاب شود امکان تشخیص خطا کاهش مییابد .در حالیکه رد کاذب (False rejection) کمتر از 5% است .اگر محدوده 2SD ± mean 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 5% است ولی این میزان برای دو کنترل (n=2) به 5% و برای 4 کنترل % (n=4) به18 میرسد.

به عنوان مثال اگر آزمایشگاهی در هر سریکاری دو غلظت نمونه کنترلی را به صورت دوبل آزمایش نماید در واقع در هر سریکاری 4 کنترل را آزمایش کرده و رد کاذب نتایج این آزمایشگاه به % 18 میرسد.

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

16

2تفسیر 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 3میرساند / .سیستماتیک، میزان رد کاذب نتایج را به کمتر از31

برای اینکه از این قوانین استفاده نماییم بایستی نمونه کنترلی را 23 بار آزمایش نموده و میانگین و انحراف معیار را محاسبه کنیم(بر طبق مراحل 1 تا 5 اجرای کنترل داخلی کیفیت)سپس در هر سریکاری نمونههای کنترلی را آزمایش نمایید.

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

2s1یک کنترل خارج از محدوده 2SD ± mean به معنی هشدار بوده و لازم است سایر قوانین بررسی گردند.

3s1یک کنترل خارج از محدوده 2SD ± mean باعث رد نتایج شده و میتواند نشاندهنده خطای راندوم یا شروع خطای سیستماتیک باشد.

2s2دو خوانده متوالی همسو و خارج از محدوده 2SD ± mean باعث رد نتایج شده و به خطای سیستماتیک حساس میباشد.

4sRیک خوانده خارج از محدوده 2SD + mean و دیگری خارج از محدوده 2SD –mean باعث رد نتایج شده و نشاندهنده خطای راندوم میباشد.

1s4دو خوانده متوالی همسو و خارج از محدوده 1SD ± mean باعث رد نتایج شده و به خطای سیستماتیک حساس میباشد.

10xده 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.

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

15

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 2s2 ممکن است یک خوانده در روز قبل و یک خوانده امروز، همسو و خارج از محدوده 2SD + mean بوده و یا در یک سری کاری، یک خوانده در کنترل 1 و خوانده دیگر در کنترل(2 نتایج هر دو کنترل)خارج از محدوده 2SD + mean قرائت گردند.

مورد استثنا قانون 4sR میباشد که باید در آن دو خوانده به دست آمده از یک سریکاری با یکدیگر4SD فاصله داشته باشند .اگر در دو سری کاری متفاوت، نتایج با هم 4SD فاصله داشته باشند، در این مورد قانون4sR کاربردی ندارد.

در سال 2336 با توجه به پیشرفتهای تجهیزات و نیز رایانهای شدن بسیاری از برنامهها، در قوانین وستگارد دو تغییر ایجاد شد .اول اینکه قانون 2s1 بهعنوان هشدار حذف شد و پیشنهاد گردید قوانین 10x و1s4 حتی در شرایطی که نتایج در محدوده 2SD ± mean 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 محدوده2SD mean ±وجود داشته باشد.

تغییر دوم که در قوانین وستگارد ایجاد شده است این است که در صورت استفاده از 3 یا 6 کنترل در هر سریکاری(مضرب) 3 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.

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

به نام خدا

18

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 2SD ± mean هستند .پس براساس قانون2s2

نتایج این سریکاری رد میشود و به احتمال زیاد یک خطای سیستماتیک در این محدوده غلطتی 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 3s1 و

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

19

2s2و 4sR بررسی میگردد .با توجه به به عدم وجود 3 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 3s1 و 2s2 و 4sR بررسی میشود .با توجه به عدم وجود 3 قانون مذکور، این سریکاری

قبول میشود ولی باید به هشدار توجه نمود.

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

21

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 2s2 – 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 3s1 و 2s2 و 4sR بررسی نمود .با توجه به عدم وجود 3 مذکور، این

سریکاری قبول میشود ولی باید به هشدار توجه نمود.

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

21

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 4 خوانده متوالی خارج از محدوده

+ 1SDوجود دارد .علیرغم وجود قانون 1s4 ، 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.

به نام خدا

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

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

22

در سریکاری بیستم بررسی نتایج سریهای کاری قبلی نشان میدهد که 5 نتیجه در غلظت بالا و5

نتیجه در غلظت پایین در یک طرف میانگین قرار گرفته که با قانون x10 باعث رد سری بیستم میگردد و به احتمال

زیاد یک خطای راندم وجود دارد.

قوانینWHO

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.

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

23

وجود یک خوانده خارج از محدوده 2SD ± mean 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 محدودهmean ± 2SD

هشدار

یک خوانده خارج از محدودهmean ± 3SD

غیر قابل قبول(خطای سیستماتیک یا راندوم)

دو خوانده متوالی خارج از محدودهmean ± 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-Jenningو 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.

1مقادیر 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-کند2 . (c)

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 2خطاهای 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

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

26

...

چارت کنترل تجمعیCumulative Sum (Cusum) Control chart

Cusumروشی 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.

به نام خدا

روشهای مختلف برای اجرای و تفسیر چارت: *Cusum*

1. V-mask

2.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.

1-کنترل را 23 بار آزمایش نموده و میانگین و انحراف معیار آنرا محاسبه مینماییم(مطابق مراحل 1 تا 5 در بخش اجرای کنترل داخلی کیفیت.)

2-چارت کنترلی را رسم نموده و که در آن محور y نشاندهنده Cusum و خط مرکزی آن Cusum صفر باشد.

3-برای تفسیر Cusum به روش محدوده تصمیم گیری باید دو محدوده را مشخص نمایید.

1K و uK که بطور معمول 1SD ± mean در نظر گرفته میشود.

1h و uh که محدوده کنترل است و اغلب 2.7 SD ± برای آن در نظر گرفته میشود.

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

5-به محض اینکه کنترل از محدوده 1SD ± mean خارج شد اختلاف نتیجه مشاهده شده را با 1(K -1SDmean)(یا u(K 1SD + mean)(محاسبه نمایید(این اختلاف در مثال زیر id نشان داده شده است.)

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

25

Cusumدر هر سریکاری از جمع جبری اختلاف جدید i(d(با جمع جبری قبلی (Csi) بدست میآید.

عدد بدست آمده روی منحنی علامتگذاری میشود.

6 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 Cusumتا زمانیکه عوامل ایجاد کننده خطا شناسایی نشدهاند متوقف میشود.

مثال:

آزمایشگاهی تری گلیسرید را در نمونه کنترلی اندازهگیری نموده و میانگین 133 و انحراف معیار 5 را بدست آورده است و مطابق موارد ذکر شده در بند 3 محدودههای کاری خود را محاسبه نموده است.

سپس در هر سریکاری، نمونه کنترل را آزمایش و نتایج را در جدول زیر درج نموده است .اختلاف هر روز با 1K و uK بصورت id و جمع جبری با (Csi) نمایش داده شده است.

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

28

همانطور که مشاهده میشود در روز اول نتیجه کنترل 113 قرائت شده است که 5 واحد از)135(uK بیشتر است لذا Cusum شروع شده و اختلاف id بصورت +5 نشان داده شده است .روز دوم کنترل 133 خوانده شده که 5 واحد کمتر از) 135 uK میباشد بنابراین مقدار id) برابر +5 جمع جبری(دو عدد داخل بیضی)و(Csi) مساوی صفر میشود .هنوز علامت (Csi) عوض نشده است پس Cusum ادامه مییابد.

Cusumدر 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 1K یا uK خارج شود .مثال این مورد در روز 16 که در آن (Csi) به 14 رسیده است که بیش از 13 uK است .در این حالت شرایط از کنترل خارج شده است .بنابراین باید خطا شناسایی / یعنی5 شده و رفع گردد.

مثال فوق در منحنی زیر نشان داده شده است.

Cusumنسبت 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 کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

29

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

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

31

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.

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 3 روز برای تعدادی از پارامترها بررسی نمود .که در جدول زیر آمده است.

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

31

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.

1-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.

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

32

روشهای آماری برای پایش میانگین نتایج بیماران

یکی از راههای استفاده از نتایج بیماران، محاسبه میانگین نرمال (AON)average of normal یا mean of normalاست 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.

33

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 3 4 نمونه-در هر سریکاری)

انجام آزمایش بازبینی (Check test) بر روی تعدادی از نمونههای بیماران(آزمایش 3 4 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

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

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

34

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.

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

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

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

5-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.

6-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.

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

8-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

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

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

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

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

4-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 می-توان از خون کامل طبیعی تازه برای این منظور استفاده نمود .برای انجام اینکار بایستی پارامترهای حداقل 3 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.

پارامتر

روش مرجع

هموگلوبین

سیانمت هموگلوبین

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

36

هماتوکریت

میکرو هماتوکریت

تعداد گلبولهای سفید

هماسیتومتر با درجهبندی اصلاح شده

اخیراً در برخی کتب رفرانس کولترهای تک کاناله بهعنوان روش مرجع برای شمارش WBC ، RBC ، 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 143 gr/L و با سلکانتر 145 gr/L باشد، فاکتور تصحیح کالیبراسیون بدین صورت محاسبه میشود.

3%کاهش یابد .برای مثال اگر ضریب کالیبراسیون / پس طبق نتیجه فوق ضریب کالیبراسیون بایستی44

56تنظیم گردد 3% / .کاهش یابد و روی / 56 قبلی 133 بوده، میبایست44

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

کنترل کیفیت

به نام خدا

1-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 23 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

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

35

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)

2-در صورتیکه نمونه خون کنترل در دسترس نباشد و یا برای کامل شدن روند کنترل کیفیت سلکانتر می-توان از نمونه خون بیماران استفاده نمود .با توجه به اینکه پارامترهایی مثل WBC ، RBC ، Hb ، HCT و اندکسهای خونی در نمونه خون به مدت 24 ساعت در دمای 4 ردجه سانتیگراد، میتوان در روز اول حداقل 5 و ترجیحاً 13 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.

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

38

مقدار t 2 بیشتر 2 / و برای 13 نمونه / 26 برای هر متغییر محاسبه شده و اگر مقادیر آن برای 5 نمونه از78 باشد، با اطمینان % 55 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 5 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.

در مثال بالا چون عدد(t 2 مقدار / بدست آمده از t 78 برای 5 نمونه)کمتر است لذا نتایج Hb دستگاه قابل قبول است.

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

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

(bبدون 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 13 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.

4-درصورتیکه امکان انجام تمامی آزمایشها بصورت دوتایی وجود نداشت بایستی در هر سریکاری حداقل2 تا 3 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.

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

5-روش دیگر در اجرایی کردن کنترل کیفیت، آزمایش بازبینی (Check test) است که در صورت نگهداری 3نمونه – صحیح نمونهها در یخچال قابل انجام میباشد .بدینصورت که در ابتدای سریکاری حداقل2 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 6 ساعت باشد کاربردی ندارد.

6-در مراکزی که تعداد بیماران زیاد است(حداقل روزانه 133 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) حداقل333

533بیمار توسط سلکانتر محاسبه و نمودار رسم میگردد و در روزهای بعد نمونههای بیماران بصورت تصادفی به گروههای 23 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 7 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.

7-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 2 تا 32 هفته باشد توصیه نمیشود.

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

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

41

8-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.

دستگاه میکرو هماتوکریت

دستگاه میکرو هماتوکریت باید دارای مشخصات زیر باشد.

شعاع چرخش بیشتر از 8 سانتیمتر باشد

توانایی رسیدن به حداکثر سرعت در عرض 33 ثانیه.

توانایی ایجاد RCF حدود 5 تا 13 هزار g در محیط بهمدت حداقل 5 دقیقه بدون افزایش دما از 45 درجه سانتیگراد.

داشتن زمانسنج اتوماتیک(با قابلیت تنظیم حداقل 33 ثانیه.)

RCF(Relative Centrifugal Field) : میدان نسبی سانتریفوژ

RPM(Revolation Per Minute) : دور در دقیقه

$RCF=1.118 \times 10\text{-}5 \times r \times RPM2$

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

کنترل کیفی وبررسی کالیبراسیون دستگاه میکرو هماتوکریت

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

. aسرعت سانتریفوژ(بررسی توسط تاکومتر)

. bزمان سنج دستگاه(بررسی توسط کورنومتر)

. cحداکثر 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 EDTA2K است به خوبی میکس نموده و نمونهها را به مدت2 دقیقه سانتریفوژ و مقادیر بدست آمده را یادداشت مینماییم .سپس هر 33 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 3یا بیشتر نیز انجام گیرد / .بهتر است حداقل با یک نمونه دارای هماتوکریت5

مثال برای بررسی حداکثر توان در تجمع سلولها:

همانطوری که در جدول فوق مشاهده میشود زمان لازم جهت به متراکم نمودن گلبولهای قرمز برای 3 /4دقیقه و برای هماتوکریت بیشتر از % 53 حدود / 5 دستگاه میکروهماتوکریت و هماتوکریت کمتر از % 53 حدود5 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.

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

، 5، 7.5 ، چند نمونه خون با هماتوکریت کمتر از % 53 را بخوبی میکس نموده و بصورت دوتایی به مدت3 11دقیقه سانتریفوژ و نتایج ثبت میگردد .اگر توان دستگاه مناسب باشد (g) نتایج حاصل از دقیقه 5 به بعد بدون

تغییر خواهد بود.

جهت بررسی خطکش هماتوکریت میتوان نمونهای که هماتوکریت آن با خطکش هماتوکریت % 53 قرائت شده است طوری در لوله موئینه پر نمود که طول قسمت پر شده دقیقاً 5 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 5 قرار 2سانتیمتر نشاندهنده صحت کار خطکش / میگیرد .قرار گرفتن انتهای بالای ستون سلول بر روی خط5 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 % 133 برای تهیه این نمونه باید پلاسمای 23 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 23 درجه سانتیگراد(ترجیحاً زیر 53 درجه سانتیگراد)نگهداری نمود.

برای تعیین محدوده نمونه Pooled Plasma ، نمونه را 23 بار آزمایش نموده و میانگین و انحراف معیار را محاسبه میشود .محدوده مورد انتظار 2SD ± mean 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 5% میباشد.

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

44

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 13%با هم متفاوت باشند قابل قبول است در غیر اینصورت آزمایش بایستی تکرار شود.

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

45

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 15 میکرو زیمنس باشد وهمچنین pH آب مورد 5باشد / .استفاده بهتر است کمی اسیدی باشد ولی نباید کمتر از5

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.

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

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 121 ° C به مدت15 دقیقه)نیاز خواهند داشت.

اندازه گیری و تنظیم: *pH*

محیطهای کشت دهیدراته اگر بطور مناسب تهیه شوند نیازی به تنظیم pH ندارند .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 25 ° C ، مقدار)± 3 pH تنظیم / را در حد مورد نظر2 (نمایید .تنظیم pH معمولا با استفاده از هیدروکسید سدیم 43 گرم در لیتر(تقریبا "یک مولار)و یا با استفاده از 36گرم در لیتر(تقریباً یک مولار)انجام میشود / .اسید کلریدریک5

توزیع:

محیط کشت را در ظرفی مناسب با حجم 2 تا 3 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 15 دقیقه و در دمای121 ° C

1کیلوگرم بر سانتیمترمربع)انجام میگیرد .برای حجمهای بیشتر از یک لیتر باید چرخه(/ فشار2

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.

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

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 3میکرومتر استفاده نمایید .این فیلترها باید قبل از استفاده، در اتوکلاو استریل شوند 3 / .یا / 45 با قطر منفذ22

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 15 دقیقه در دمایC 121 °استریل نمایید.

آماده سازی جهت مصرف:

بعد از استریلیزاسیون، اجازه دهید دمای محیط کشت به حدود C ° 53 برسد، سپس با رعایت شرایط آسپتیک در ظروف نهایی تقسیم نمایید .هیچ وقت محیط کشت را در دمای بالاتر از C ° 53 تقسیم نکنید .مکمل-های حساس به گرما و حرارت باید بعد از این که دمای محیط کشت به حدود C ° 53 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 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.

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

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 3 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 4 درجه سانتیگراد یک هفته میباشد ولی اگر در داخل کیسههای پلاستیکی بسته بندی شوند بطوریکه هوا داخل آنها نفوذ نکند تا 4 3 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 8 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 4 درجه سانتیگراد نگهداری شوند 6 3 ماه قابل مصرف میباشند- .

موارد استثناء:

تایوگلیکولات براث، اندول نیترات براث و SIM فقط به مدت یکماه قابل نگهداری میباشند .محیط های CTA Mediumو OF Medium حاوی کربوهیدرات و مولرهینتون براث فقط به مدت 6 هفته قابل نگهداری میباشند.

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

49

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 دمایº C 05

pHنامناسب

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 دمایº C 05

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

pHنامناسب، 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 C 05 º

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

51

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 5 3 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 3 625 nm ناتومتر میباشد 3 /)تا / 1 ، دارای جذب38

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

51

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 5 3 کلنی ایزوله روی پلیت 24 ساعته را در 5 3 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 CFU/ml 810-710 کلنی داشته باشد(.مطابق با استاندارد نیم مک فارلند.)

بررسی آزمایشهای عملکردی محیط کشت(Performance testing)

1آزمایش ظرفیت مغذی بودن (*Nutritional activity* - (محیط های کشت پلیتی مانند بلاد آگار سوسپانسیون اولیه را به نسبت 1 به 111 در نرمال سالین یا آب مقطر استریل رقیق نموده و مقدارµ 13 l یا 3/31 ml سوسپانسیون رقیق شده را به محیط کشت مورد آزمایش تلقیح کنید .تعداد کلنیهای مورد انتظار در هر پلیت 134 133 CFU/plate (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.

2آزمایش ظرفیت مهار کنندگی محیط های کشت انتخابی پلیتی مانند مکانکی آگار-

سوسپانسیون اولیه را به نسبت 1 به 11 در نرمال سالین یا آب مقطر استریل رقیق نموده و مقدار 13 l یاµ 3/31 mlسوسپانسیون رقیق شده را به محیط کشت مورد آزمایش تلقیح کنید .تعداد کلنیهای مورد انتظار در هر پلیت 135 134 CFU/plate (میباشد .برای اجتناب از رشد زیاد باکتری در بعضی از محیطهای کشت انتخابی(- ممکن است نیاز باشد که سوسپانسیون ده بار رقیقتر تهیه شود.

3آزمایش محیط های کشت لوله ای-

هر لوله باید با 13 l یا 3/31 ml µ 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، 24 18 ساعت یا 48 24 ساعت در دمای 2±35 C - - میباشد .محیط شکلات آگار و سایر محیطº -

5% -های کشت برای جداسازی انتخابی گونه های نیسریای بیماریزا باید در 2Co 13 انکوبه شوند و در فواصل

زمانی 24 18 ساعت وسپس 48 24 ساعت بررسی گردند- - .

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

52

برای باکتریهای بیهوازی، کشتها عموماً به حداقل 48 ساعت انکوباسیون در شرایط بیهوازی و غنی از

2Coنیاز دارند.

در مورد کمپیلوباکتر آگار، پلیتها باید در 42 C در شرایط میکروآئروفیلیک غنی از 2Co º به مدت48

ساعت انکوبه شوند.

4کنترل 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 2Co ، رطوبت و یا شرایط بیهوازی و درجه حرارت

مناسب)قرار داده و پس از طی مدت زمان لازم 24 (تا 48 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:)

1-رطوبت :محیطهای کشت باید بدون هر گونه رطوبت اضافی بوده، همچنین هیچ نشانه ای از خشک شدن اطراف

محیط کشت نباید مشاهده گردد.

2-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 133 Lot عدد یا کمتر باشد، باید به ،

تعداد % 5 3 محیطهای تهیه شده را در دمای 37 35 C - به مدت 5 2 روز انکوبه نمود .برای Lot º - - های با تعداد

بیش از 133 ، باید به تعداد 13 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-

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

53

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

42ساعت

استرپتوکوک فکالیسS. faecalis

استرپتوکوک پایوژنزS. pyogenes

رشد مثبت، محیط سیاهرنگ می شود

رشد منفی

بلاد آگار

جار شمع دار2CO

42ساعت

استرپتوکوک پایوژنز

به نام خدا

Streptococcus pyogenes

استرپتوکوک پنومونیهS. pnemoniae

رشد مثبت دارای همولیزبتا

رشد مثبت دارای همولیز آلفا

شکلات آگار

42ساعت

هموفیلوس آنفلوانزا

Haemophilus influenzae

رشد مثبت

لایزین دکربوکسیلاز

(محیط بوسیله روغن استریل

پوشانده میشود)

24ساعت

سالمونلا تایفی موریومS. typhimurium

شیگلافلکسنریShigella flexneri

مثبت(بنفش رنگ می شود)

منفی(بدون تغییر رنگ)

اورنیتین

(دکربوکسیلاز)

24ساعت

سالمونلا تایفی موریومS. typhimurium

کلبسیلا پنومونیهK. pneumoniae

مثبت

منفی

آرژینین

(دی هیدرولاز)

24ساعت

سالمونلا تایفی موریومS. typhimurium

پروتئوس میرابیلیسProteus mirabilis

مثبت

منفی

ژلاتیناز

42ساعت

اشرشیا کلیE. coli

منفی

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

54

باسیلوس سوبتیلیسBacillus subtilis

مثبت

کلایگلرآیرون آگار

42ساعت

سیتروباکتر فروندیCitrobacter frundii

سالمونلا تایفی موریومS. typhimurium

شیگلا فلکسنریSh. flexneri

اسینتوباکتر کالکوستیکوس

Acinetobacter calcoaceticus

گازA/A, SH +

گاز یا بدون گازK/A, SH +

K/A

تغییر نمی کند

مک کانکی آگار

(همراه با کریستال ویوله)

42ساعت

اشرشیا کلیE. coli

پروتئوس میرابیلیسProteus mirabilis

استرپتوکوک فکالیسS. faecalis

کلنی های قرمز رنگ

کلنی های بیرنگ، بدون

به نام خدا

سوارمینگ(خزش)

رشد منفی

مالونات

42ساعت

اشرشیا کلیE. coli

کلبسیلا پنومونیهK. pneumonia

منفی(سبز رنگ)

مثبت(آبی رنگ)

مانیتول سالت آگار

42ساعت

استافیلوکوک اورئوسS. aureus

S. epidermidisاستافیلوکوک اپیدرمیدیس

اشرشیا کلیE. coli

کلنی های زرد رنگ

کلنی های قرمز رنگ

رشد منفی

MRVP

24ساعت

اشرشیا کلیE. coli

کلبسیلا پنومونیهK. pneumonia

MRمثبت VP - منفی

MRمنفی VP - مثبت

مولرهینتون آگار

42ساعت

استافیلوکوک اورئوس

S. aureus ATCC 25923

سودوموناس آئروژینوزا

P. aeruginosa ATCC 27853

اشرشیا کلیE. coli ATCC 25922

به نام خدا

به جدول میزان هاله عدم رشد قابل

قبول در بخش آنتی بیوگرام

مراجعه شود

نیترات براث

42ساعت

اشرشیا کلیE. coli

اسینتوبا کتر کالکوستیکوس

Acinetobacter calcoaceticus

مثبت

منفی

آب پپتونه(اندول)

42ساعت

اشرشیا کلیE. coli

کلبسیلا پنومونیهK. pneumoniae

مثبت

منفی

فنیل آلانین دآمیناز

42ساعت

اشرشیا کلیE. coli

پروتئوس میرابیلیسP . mirabilis

منفی

مثبت

سالمونلا شیگلا آگار(S.S)

یا دزوکسی کلات سیترات آگار

42ساعت

اشرشیا کلیE. coli

سالمونلا تایفی موریوم

Salmonella typhimurium

منفی

کلنی های بیرنگ

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

55

یرسینیا انتروکولیتیکا

Yersinia enterocolitica

شیگلا فلکسنریShigella flexneri

کلنی های بیرنگ

کلنی های بیرنگ

سلنیت برات

(SF)

42ساعت

سالمونلا تایفی موریومS. typhimurium

اشرشیا کلیE. 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)

24ساعت

اشرشیا کلیE. coli

کلبسیلا پنومونیهK. pneumonia

رشد منفی

رشد مثبت رنگ آبی-

TCBSآگار

42ساعت

Vibrio SPP

کلنی های زرد رنگ

تایر مارتین

42ساعت

نایسریا منتژیتیدیس

به نام خدا

)2Neisseria meningitidis (CO

نایسریا گونوره N. Gonorrhoeae

اشرشیا کلی E. coli

رشد مثبت

رشد مثبت

رشد منفی

تایوگلیکولات براث

Thioglycollate broth

42ساعت

باکتروئیدس فراجیلیس

Bacteriodes fragilis

رشد مثبت

TSI

عمق محیط باید 3 سانتی متر باشد

(با درپیچ شل اتوو گذاری شود)

42ساعت

سیتروباکتر فروندی

Citrobacter frundii

سالمونلا تایفی موریوم S. typhimurium

شیگلا فلکسنری Sh. flexneri

اسینتوباکتر کالکوستیکوس

Acinetobacter calcoaceticus

گاز 2A/A, SH +

گاز یا بدون گاز 2K/A, SH +

K/A

تغییر نمی کند

محیط اوره

42ساعت

اشرشیا کلی E. coli

پروتئوس میرابیلیس P. mirabilis

منفی

مثبت، صورتی

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

56

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.

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

55

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 % 133 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.

1(تعیین میزان هدف نمونه

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

58

2(تعیین دامنه قابل قبول نتایج

3(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 موردEQA مطالبی ذکر خواهد شد.

1-تعیین میزان هدف نمونه(برآوردی از میزان واقعی نمونه)

دو روش برای این کار وجود دارد

(aاستفاده از میزان مشترک چندین آزمایشگاه

(bمیزان 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.

. iتعداد اعضاء هر گروه یا همگروه کم نباشد تا آزمون آماری معتبر باشد(.حداقل 13 و ترجیحاً 23 آزمایشگاه)

. iiدرصد 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.

2-تعیین دامنه قابل قبول

برای تعیین دامنه قابل قبول روشهای مختلفی وجود دارد که هر کدام دارای محاسن و معایب خود می-باشند .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.

3-تعیین قواعدی برای تفسیر نتایج

همانند قواعدی مثل وستگارد که در IQC مورد استفاده قرار میگیرد قواعدی برای تفسیر نتایجEQA 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

1(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.

2(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.

3(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.

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

VIS<50 نشاندهنده عملکرد عالی است.

100VIS>50 نشاندهنده عملکرد مطلوب است.

150VIS>100 نشاندهنده عملکرد قابل قبول است.

200VIS>150 نشاندهنده عملکرد هشدار دهنده است.

VIS>200 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 13 باشد.

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

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

2(گزارش نتایج بیوشیمی خون در دو جدول و دو نمودار گزارش میشود

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

61

جدول 1 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 VISعضو میباشد.

جدول 2 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 2 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 VIS های 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.

کنترل کیفی داخلی و تفسیر نتایج کنترل کیفی خارجی

62

منابع

1-کتاب کنترل کیفیت در آزمایشگاههای پزشکی، نوشته دکتر فریده رضی، دکتر پریسا داهیم و ... .،انتشارات نوید شیراز، سال1388

2-کتابچه برنامه ارزیابی خارجی کیفیت آزمایشاههای تشخیص طبی.

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

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

5-دستورالعمل فنی تهیه و کنترل کیفیت محیط های کشت آزمایشگاه رفرانس__.