

دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی (اساس کار، کالیبراسیون، کنترل کیفیت و خطاها)

گردآوری و نگارش: دکتر پریسا داهیم

نظارت علمی: اعضای کمیته هماتولوژی آزمایشگاه مرجع سلامت

اعضای کمیته به ترتیب حروف الفبا:

دکتر مینو احمدی نژاد (متخصص آسیب‌شناسی)

دکتر بهزاد پوپک (دکترای تخصصی هماتولوژی)

دکتر کتابون خداوردیان (دکترای علوم آزمایشگاهی)

دکتر پریسا داهیم (متخصص آسیب‌شناسی)

دکتر آتوسا شریعت تربقانی (متخصص آسیب‌شناسی)

دکتر عبدالعلی شمس برهان (متخصص علوم آزمایشگاهی)

دکتر محمد فرهادی لنگرودی (متخصص آسیب‌شناسی)

دکتر فرید کوثری (متخصص آسیب‌شناسی)

با همکاری: دکتر مرجان رهنمای فرزانی (متخصص آسیب‌شناسی)



وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی
معاونت سلامت

سرشناسه: داهیم، پریسا، ۱۳۴۵-

عنوان و نام پدیدآور: دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی (اساس کار، کالیبراسیون، کنترل کیفیت و خطاها)
گردآوری و نگارش: پریسا داهیم؛ نظارت علمی اعضای کمیته هماتولوژی آزمایشگاه مرجع سلامت؛ با همکاری
مرجان رهنمای فرزای؛ [به سفارش] وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی؛ معاونت سلامت؛ آزمایشگاه
مرجع سلامت.

مشخصات نشر: تهران: مرکز نشر صدا، ۱۳۸۸.

مشخصات ظاهری: ۶۴ ص.: جدول

شابک: ۹۷۸-۹۶۴-۳۵۹-۲۴۷-۹

وضعیت فهرست‌نویسی: فیبا

موضوع: پزشکی -- آزمایشگاه‌ها -- ابزار و وسایل

موضوع: پزشکی -- آزمایشگاه‌ها -- کنترل کیفی

موضوع: تشخیص آزمایشگاهی -- کنترل کیفی

شناسه افزوده: ایران، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی؛ معاونت سلامت؛ آزمایشگاه مرجع سلامت.

رده‌بندی کنگره: ۱۳۸۸ ۵۵۳۶/۲/د RB

رده‌بندی دیویی: ۶۱۶/۰۷۵۰۲۸

شماره کتابشناسی ملی: ۱۹۱۳۶۷۸

دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی (اساس کار، کالیبراسیون، کنترل کیفیت و خطاها)

گردآوری و نگارش: دکتر پریسا داهیم

نظارت علمی اعضای کمیته هماتولوژی آزمایشگاه مرجع سلامت: دکتر مینو احمدی‌نژاد (متخصص آسیب‌شناسی) دکتر
بهزاد پویک (دکترای تخصصی هماتولوژی) - دکتر کتابون خداوردیان (دکترای علوم آزمایشگاهی) - دکتر پریسا داهیم (متخصص
آسیب‌شناسی) - دکتر آتوسا شریعت‌تربقانی (متخصص آسیب‌شناسی) - دکتر عبدالعلی شمس برهان (متخصص علوم آزمایشگاهی)
دکتر محمد فرهادی لنگرودی (متخصص آسیب‌شناسی) - دکتر فرید کوثری (متخصص آسیب‌شناسی)
با همکاری: دکتر مرجان رهنمای فرزای (متخصص آسیب‌شناسی)

خدمات طراحی، چاپ و نشر: مرکز نشر صدا

نوبت چاپ: اول (۱۳۸۸)

شمارگان: ۵۰۰۰ نسخه

قیمت: ندارد

شابک: ۹۷۸-۹۶۴-۳۵۹-۲۴۷-۹ ISBN: 978-964-359-247-9

«حق چاپ برای آزمایشگاه مرجع سلامت محفوظ است.»



۵	پیش‌گفتار
۷	مقدمه
۹	فصل اول: کلیات
۱۱	اصول اولیه کار با دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی
۱۲	شناسنامه دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی
۱۳	نکته‌های مهم در انجام آزمایش CBC
	فصل دوم: اساس کار، کالیبراسیون، کنترل کیفیت و خطاهای
۱۷	دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی
۱۹	۱. اساس کار دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی
۲۴	۲. کالیبراسیون دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی
۲۷	۳. کنترل کیفیت دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی
۲۷	۳-۱- خون کنترل
۳۱	۳-۲- آزمون پایداری کالیبراسیون
۳۳	۳-۳- آزمایش دوتایی
۳۴	۳-۴- آزمایش بازبینی
۳۵	۳-۵- آزمایش دلتا
۳۶	۳-۶- استفاده از نتایج بیماران
۳۶	۳-۷- بررسی عدم دقت (CV)
۳۸	۳-۸- بررسی صحت
۳۸	۳-۹- تطابق نتایج دستگاه با یافته‌های میکروسکوپی یا بالینی
۴۲	۴. خطاهای دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی
۴۹	فصل سوم: روش‌های مرجع انجام آزمایش‌ها
۵۱	۱. اندازه‌گیری هموگلوبین خون به روش سیان‌مت‌هموگلوبین
۵۴	۲. روش اندازه‌گیری حجم سلول‌های متراکم‌شده به روش میکروهماتوکریت
۵۷	کنترل کیفیت و بررسی کالیبراسیون دستگاه میکروهماتوکریت
۵۹	۳. شمارش سلول‌های خونی به روش دستی
۵۹	شمارش گلبول‌های سفید
۶۱	شمارش پلاکت
۶۴	منابع

پیش‌گفتار



به نام خالق هستی بخش

کتاب پیش‌رو تحت عنوان دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی (اساس کار، کالیبراسیون، کنترل کیفیت و خطاها) به همت استادان و کارشناسان آزمایشگاه مرجع سلامت، زیر نظر مستقیم کمیته تخصصی هماتولوژی این اداره کل و با استناد بر آخرین اطلاعات علمی موجود در منابع معتبر و تجربیات کاربردی تدوین شده است.

در این مجموعه که با هدف استاندارد و یکسان‌نمودن روند کنترل کیفیت دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی تهیه گردیده، به دستورالعمل‌های کاربردی و قابل اجرا برای استفاده تمام همکاران و کارشناسان در رشته‌های مرتبط آزمایشگاهی متناسب با نیاز آزمایشگاه‌ها اشاره شده است.

امید است با بهره‌گیری از نکات و توصیه‌های موجود در این کتاب، شاهد ارتقای کیفیت عملکرد بخش هماتولوژی آزمایشگاه‌های پزشکی کشور باشیم.

دکتر سعید مهدوی

مدیر کل آزمایشگاه مرجع سلامت



مقدمه

دستیابی به نتایج صحیح و دقیق در آزمایشگاه‌های پزشکی بدون استفاده از برنامه‌های تضمین کیفیت امکان‌پذیر نیست. مسئول آزمایشگاه موظف است با توجه به تعداد مراجعان، تعداد و نوع تجهیزات، روش‌های آزمایشگاهی به کار رفته، تعداد کارکنان و... با روش‌های مختلف از جمله آموزش کارکنان، استفاده از روش‌های استاندارد آزمایشگاهی، انتخاب روش‌های مناسب کنترل کیفیت و شرکت در برنامه‌های ارزیابی خارجی کیفیت از درست بودن نتایج اطمینان حاصل نماید.

یکی از آزمایش‌های معمول در آزمایشگاه‌های پزشکی، شمارش سلول‌های خون (CBC)^۱ است که در بیشتر آزمایشگاه‌ها با دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی (سل کانتر)^۲ انجام می‌شود؛ بنابراین، اطمینان از صحت و دقت نتایج این آزمایش، مستلزم آگاهی کامل از عملکرد این دستگاه‌ها و آشنایی با روش‌های کالیبراسیون، کنترل کیفیت و خطاهای مربوط است.

متن این کتاب با استفاده از منابع معتبر و راهنماهای منتشره سازمان جهانی بهداشت (WHO) و مؤسسه استاندارد آزمایشگاه بالینی (CLSI)^۳ و متون و منابع معتبر خون‌شناسی با هدف ارائه مطالب کاربردی و روش‌های کنترل کیفیت قابل اجرا در کشور، برای کارکنان آزمایشگاه‌های کشور در تمام سطوح تهیه شده و مشتمل بر سه فصل است:

- ◀ **فصل اول** شامل کلیاتی در ارتباط با دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی؛
- ◀ **فصل دوم** درباره اساس کار، کالیبراسیون، کنترل کیفیت و انواع خطاهای دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی؛
- ◀ **فصل سوم** درباره روش‌های مرجع انجام آزمایش‌های کاربردی برای کالیبراسیون دستگاه‌ها.

1. Cell Blood Counter
2. Cell Counter

3. Clinical Laboratory Standard Institute

دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی (اساس کار، کالیبراسیون، کنترل کیفیت و خطاها)

یادآور می‌شود، علاوه بر لزوم آشنایی کامل با موارد مزبور، آگاهی از روش‌های کالیبراسیون و کنترل کیفیت ابزار پایه‌ای نظیر سمپلر، اسپکتروفتومتر، فتومتر و سانتریفوژ میکروهماتوکریت برای تضمین کیفیت نتایج آزمایش‌هایی که برای کالیبراسیون این دستگاه‌ها کاربرد دارد، ضروری است. برای آشنایی با روش‌های ارزیابی کیفیت ابزار پایه، می‌توان از متن‌ها و منابع معتبر و یا کتاب **کنترل کیفیت در آزمایشگاه‌های پزشکی**، که توسط اساتید و کارشناسان آزمایشگاه مرجع سلامت گردآوری و تألیف گردیده، بهره‌برد.

دکتر پریسا داهیم

فصل اول

کلیات

اصول اولیه کار با دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی

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

۱. رعایت مواردی مانند روشن و خاموش کردن دستگاه، بررسی درجات فشار (برحسب نوع دستگاه)، نحوه نگهداری و شست‌وشو (روزانه، هفتگی، ماهانه)، تعمیرات لازم، تعویض محلول‌ها و سایر اقدام‌ها مطابق دستورالعمل شرکت سازنده.
۲. گذراندن دوره آموزشی نحوه کار با دستگاه و اصول نگهداری، زیر نظر کارشناسان شرکت‌های پشتیبان (در این رابطه، سوابق مربوطه شامل تاریخ و شرح آموزش یا گواهی دوره آموزشی باید در پرونده هر کاربر نگهداری شود و در صورت تعویض کاربر نیز آموزش‌های لازم در نظر گرفته شود).
۳. نگهداری مدارک دستگاه از قبیل شناسنامه، دستورالعمل فنی و سوابقی مانند سوابق خرید، کالیبراسیون، کنترل و نگهداری، تعویض محلول‌ها، تعمیرات و سرویس‌ها، و سایر اقدام‌ها در صورت لزوم.
۴. آشنایی کامل با نحوه کالیبراسیون و کنترل کیفی دستگاه.

نکته

به منظور رعایت اصول ایمنی و جلوگیری از بروز اشکالات مربوط به نوسانات برق، وجود سیم اتصال به زمین و تثبیت‌کننده نوسانات برق برای دستگاه ضروری است.

- نکاتی در رابطه با محلول‌های دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی (ایزوتون، لایز و...)
۱. محلول‌های دستگاه باید با داشتن تاریخ انقضا و سری ساخت مشخص، فقط از شرکت پشتیبان و یا شرکت‌های ثبت‌شده در وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی تهیه شوند.
 ۲. روی ظرف حاوی هر محلول باید برچسبی با حداقل اطلاعات مانند نام محلول، تاریخ انقضا و تاریخ تعویض الصاق شده باشد.
 ۳. هیچ‌گاه ته‌مانده محلول قبلی به محلول جدید اضافه نشود.

نکته

وجود ذرات اضافی و نامحلول در محلول‌های ذکر شده به‌ویژه ایزوتون، باعث تداخل در شمارش زمینه و خطا در شمارش سلول‌های خونی به‌خصوص پلاکت‌ها می‌شود.

شناسنامه دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی

- دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی مانند سایر تجهیزات آزمایشگاهی باید شناسنامه‌ای با این اطلاعات داشته باشند:
۱. تاریخ خرید؛
 ۲. تاریخ نصب و کالیبراسیون و نام کارشناس شرکت پشتیبان که دستگاه را راه‌اندازی نموده است؛
 ۳. تاریخ شروع کار دستگاه؛
 ۴. کارخانه و کشور سازنده؛
 ۵. مدل و شماره سریال دستگاه؛
 ۶. شرایط دستگاه هنگام خرید (نو، مستعمل و بازسازی شده)؛
 ۷. نام، شماره تلفن و نشانی شرکت پشتیبان؛
 ۸. نام کاربر یا کاربران دستگاه؛
 ۹. مشخصات و نحوه آموزش کاربر دستگاه توسط شرکت پشتیبان.

فصل اول

کلیات

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

نکته

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

- مشخصات محلول‌ها و مواد مصرفی؛
- سوابق کالیبراسیون و کنترل کیفی؛
- سوابق تعمیر با ذکر قطعه تعویض شده؛
- سوابق نگهداری، سرویس‌های دوره‌ای و خدمات پشتیبانی.

نکته‌های مهم در انجام آزمایش CBC

تمام کارکنان مرتبط در آزمایشگاه‌ها باید از روش صحیح انجام آزمایش شمارش سلول‌های خونی (CBC)، به‌عنوان یکی از شایع‌ترین آزمایش‌های انجام گرفته در آزمایشگاه‌های پزشکی آگاه باشند. برای اطمینان از نتایج آزمایش CBC، موارد زیر باید در مراحل مختلف آزمایش رعایت شوند.

۱. مرحله پیش از آزمایش^۱

- ◀ مراجعه‌کننده باید پیش از خونگیری حداقل ۵ دقیقه آرام بنشیند.
- ◀ نام، نام خانوادگی و شماره پذیرش مندرج روی برچسب ظرف با برگ درخواست یا برگ پذیرش مطابقت داده شود.
- ◀ تورنیکه بیش از یک دقیقه بر دست نمونه‌دهنده بسته نماند.
- ◀ از ضدانعقاد مناسب با رعایت نسبت لازم به مقدار خون استفاده شود (توجه به الزامات مورد نیاز دستگاه در این خصوص ضروری است).
- ◀ به محض گرفتن خون، نمونه با ضدانعقاد مخلوط شود (۲ دقیقه با میکسر یا ۸ تا ۱۰ بار سروته نمودن ویال).
- ◀ ظرف حاوی نمونه CBC در بسته باشد.

- ◀ نمونه با مشاهده دقیق یا با استفاده از اپلیکاتور از نظر نبود لخته و همولیز یا لیمی بررسی شود.
- ◀ حداکثر فاصله زمانی بین نمونه‌گیری و انجام آزمایش حدود ۴ تا ۶ ساعت باشد.
- ◀ بلافاصله پیش از انجام آزمایش، نمونه خون با قراردادن ویال به مدت ۳ تا ۵ دقیقه روی روتاتور و یا حداقل ۱۰ بار سروته نمودن کامل، هموژن و یکنواخت شود.

۲. مرحله انجام آزمایش^۱

هر روز پیش از شروع آزمایش، شمارش زمینه دستگاه^۲ انجام شده و در صورت امکان سوابق آن نگهداری شود. به‌طور معمول، مقادیر مربوط به شمارش زمینه هر دستگاه در دستورالعمل آن ارائه شده است. سازمان جهانی بهداشت نیز در این رابطه معیارهایی ارائه نموده است که در زیر به آنها اشاره می‌شود:

$$L / 10^{12} \times 0.03 < \text{تعداد گلبول‌های قرمز}$$

$$L / 10^9 \times 0.04 < \text{تعداد گلبول‌های سفید}$$

$$dL / 2g < \text{هموگلوبین}$$

$$L / 10^9 \times 0.5 < \text{تعداد پلاکت‌ها}$$

در صورت زیادبودن تعداد نمونه‌های مورد آزمایش در هر سری کاری، بهتر است در فواصل آزمایش‌ها دستور شست‌وشوی دستگاه و بررسی شمارش زمینه مجدداً اجرا شود. برای اطمینان از صحت مرحله انجام آزمایش، آشنایی کامل کاربر با اصول کار با دستگاه، اجرای برنامه‌های کالیبراسیون و کنترل کیفیت و رفع خطاها الزامی است.

۳. مرحله پس از آزمایش^۳

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

اثر مواد ضدانعقاد

- ◀ ضدانعقاد مایع K₃EDTA به دلیل ایجاد رقت در نمونه، مقدار هموگلوبین را تا ۱٪ کاهش می‌دهد.

1. Analytical Phase
2. Back Ground
3. Post Analytical Phase

فصل اول

کلیات

◀ استفاده از ضدانعقاد K_3EDTA باعث چروکیدگی گلبول‌های قرمز و کاهش ۲٪ میزان هماتوکریت می‌شود. در صورتی که آزمایشگاهی ضدانعقاد مورد استفاده خود را از K_3EDTA به K_2EDTA تغییر دهد، باید به این نکته توجه نماید که میانگین MCV ۲٪ افزایش و میانگین $MCHC$ به همین میزان کاهش می‌یابد.

خطاهای ناشی از ماهیت نمونه یا خطاهای کاذب ناشی از دستگاه

- ◀ تعداد گلبول‌های سفید بیش از $30 \times 10^9/L$ ، مقدار هموگلوبین را به میزان $3g/L$ افزایش می‌دهد.
- ◀ مواردی مانند تعداد پلاکت بیش از $700 \times 10^9/L$ ، مقدار زیاد هموگلوبین S ، میکروسیتوز و هایپوکرومی میزان Hb را به‌طور کاذب بالایی برند.
- ◀ خطاهای کاذب ناشی از دستگاه به تفصیل در انتهای فصل دوم آمده‌است.

نکته

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

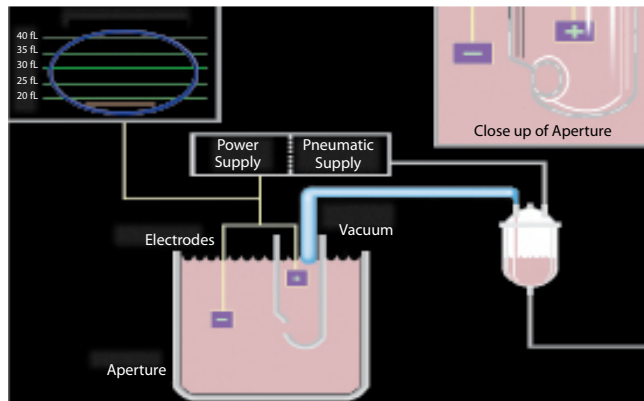
فصل دوم

اساس کار، کالیبراسیون، کنترل
کیفیت و خطاهای دستگاه‌های
خودکار شمارنده سلولی

۱. اساس کار دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی

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

۱. مقاومت الکتریکی^۱: این روش اولین بار توسط والاس کولتر^۲ در سال ۱۹۵۶ مطرح شد و اساس کار دستگاه‌هایی نظیر کولتر^۳، بک من^۴، سیسمکس^۵، ابوت^۶ و... قرار گرفت. در این مکانیسم، خون در یک محلول بافری الکتریکی رقیق شده و از بین دو الکترود حامل جریان الکتریکی مستقیم عبور می‌کند. با عبور هر سلول خونی از این مسیر، مقاومت الکتریکی و یک پالس الکتریکی ایجاد می‌شود. تغییر در پتانسیل بین الکترودها متناسب با مدت زمانی است که گلبول از فضای بین دو الکترود، که اصطلاحاً دریچه^۷ نامیده می‌شود، عبور می‌کند. ارتفاع هر پالس نشان‌دهنده حجم سلول و تعداد پالس نشان‌دهنده تعداد سلول است.



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

- | | |
|-------------------------|-------------|
| 1. Electrical Impedance | 5. Sysmex |
| 2. Wallace Coulter | 6. Abbott |
| 3. Coulter | 7. Aperture |
| 4. Beckman | |

۲. پراکندگی نور: در این روش، سوسپانسیون رقیق شده سلول‌ها به صورت یک ردیف سلولی از مقابل منبع نوری عبور می‌کند و باعث پراکندگی نور می‌شود. نور پراکنده از طریق یک فزاینده نوری^۲ یا فوتودیود^۳ به پالس‌های الکتریکی تبدیل می‌شود که در این حالت، تعداد پالس‌ها نمایانگر تعداد سلول‌ها و ارتفاع پالس‌های الکتریکی، که متناسب با میزان پراکندگی نور بوده، نشان‌دهنده حجم سلول‌ها است. منبع نوری بر حسب نوع دستگاه، لیزر یا تنگستن است. هرچه قطر ردیف سلول‌های عبوری کوچک‌تر باشد (به اندازه قطر گلبول‌های قرمز)، نور با دقت بیشتری بر جریان سلول‌ها تابیده و نتایج دقیق‌تری حاصل می‌شود.

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

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

◀ در مجرای دوم، با افزودن ماده لیزکننده به نمونه و با کمک رقیق‌کننده، گلبول‌های قرمز لیز شده و گلبول‌های سفید که دست نخورده مانده‌اند، شمارش می‌شوند. در این مجرا، علاوه بر شمارش گلبول‌های سفید، مقدار هموگلوبین نیز به روش سیانمت هموگلوبین اندازه‌گیری می‌شود.

در دستگاه‌های جدیدتر برای شمارش افتراقی لکوسیت‌ها مجراهای دیگری در نظر گرفته شده است.

اندازه‌گیری PCV^۴ و MCV^۵ در دستگاه‌های خودکار شمارنده سلول کاملاً به یکدیگر وابسته‌اند. در برخی دستگاه‌ها، با محاسبه میانگین ارتفاع پالس‌های حاصل از عبور گلبول‌های قرمز از دریچه، مقدار MCV مشخص می‌شود و براساس تعداد گلبول‌های قرمز شمارش شده، میزان همانوکریت توسط دستگاه محاسبه می‌شود. در دستگاه‌های دیگر، از مجموع پالس‌های حاصل از عبور گلبول‌های قرمز، میزان PCV تعیین شده و با استفاده از تعداد گلبول‌های قرمز، مقدار MCV محاسبه می‌شود. تقریباً در تمام

1. Light Scattering
2. Photomultiplier
3. Photodiode

4. Packed Cell Volume
5. Mean Corpuscular Volume

فصل دوم

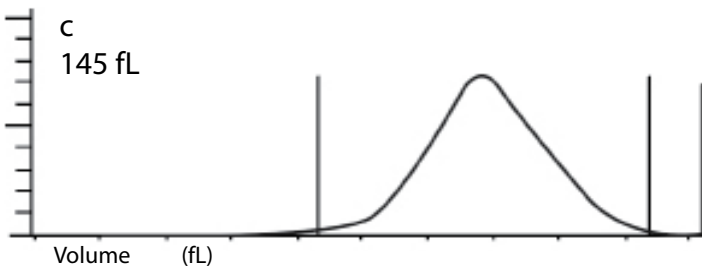
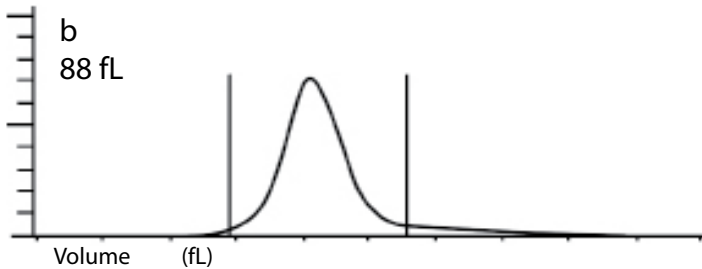
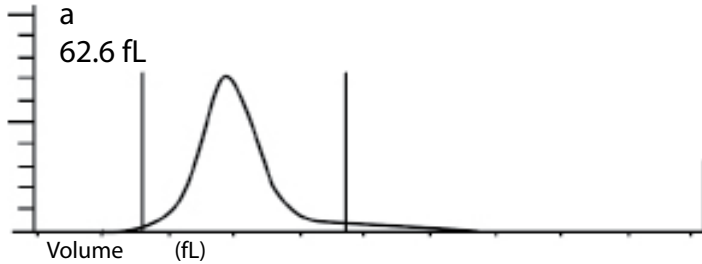
اساس کار، کالبراسیون، کنترل کیفیت و خطاهای دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی

دستگاه‌ها سایر شاخصه‌های گلبول‌های قرمز مانند MCH¹ و MCHC² از طریق محاسبه و با استفاده از مقادیر هموگلوبین، PCV و تعداد گلبول‌های قرمز مشخص می‌شوند. میزان پراکندگی اندازه گلبول‌های قرمز (RDW)³ در دستگاه‌ها، با استفاده از محاسبه میزان تغییرات ارتفاع پالس‌های ایجاد شده به دنبال عبور گلبول‌های قرمز تعیین و به صورت انحراف معیار SD⁴ (با واحد فمتولتر) یا ضریب انحراف معیار CV⁵ (درصد) ارائه می‌شود.

در بعضی دستگاه‌ها نظیر بایر تکنیکون⁶، میزان پراکندگی هموگلوبین داخل سلول (HDW)⁷ نیز مشخص می‌شود. این مقدار در واقع نشان‌دهنده پراکندگی (CV) غلظت هموگلوبین در هر سلول یا آنیزوکرومیا⁸ یا نمای دی‌مورفیک⁹ گلبول‌های قرمز است. شمارش افتراقی گلبول سفید در دستگاه‌های مختلف، با استفاده از مکانیسم‌های مختلف مانند مقاومت الکتریکی و جریان‌های الکتریکی با تواترهای مختلف، تعیین اندازه هسته، پراکندگی و جذب نور، واکنش‌های شیمیایی ناشی از گرانول‌ها و... صورت گرفته و به صورت سه، پنج و هفت قسمتی گزارش می‌شود. در شمارش افتراقی سه‌قسمتی، سه گروه سلول براساس اندازه، شامل سلول‌های بزرگ یا گرانولوسیت‌ها، سلول‌های کوچک یا لنفوسیت‌ها و سلول‌های متوسط شامل مونوسیت‌ها، بازوفیل‌ها، ائوزینوفیل‌ها و سلول‌های مونونوکلئر شمارش می‌شوند. در شمارش افتراقی پنج‌قسمتی، رده‌های نوتروفیل، ائوزینوفیل، بازوفیل، لنفوسیت‌ها و مونوسیت‌ها شمارش شده و در شمارش افتراقی هفت‌قسمتی علاوه بر رده‌های ذکر شده، سلول‌های بزرگ نابالغ (بلاست و گرانولوسیت‌های نابالغ) و لنفوسیت‌های آتیپیکال (بلاست‌های کوچک) نیز جای می‌گیرند.

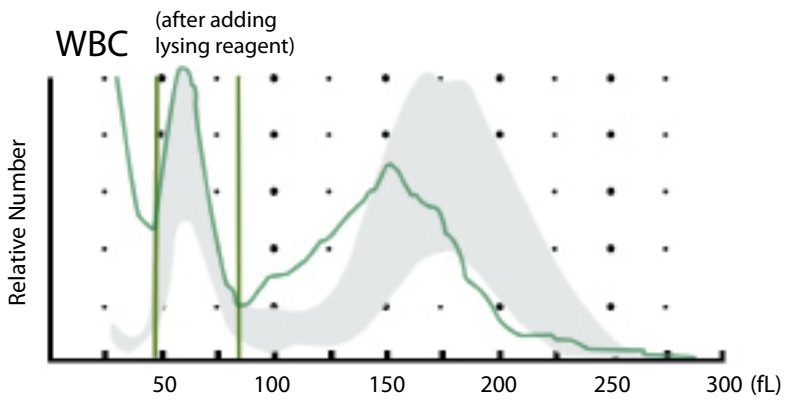
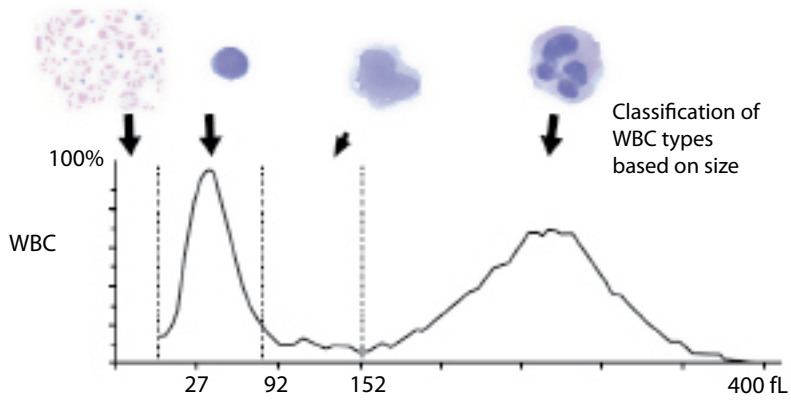
1. Mean Corpuscular Hemoglobin
2. Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration
3. Red cell Distribution Width
4. Standard Deviation
5. Coefficient Variation
6. Byertechnicon
7. Hemoglobin Distribution Width
8. Anisochromia
9. Dimorphic

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



فصل دوم

اساس کار، کالیبراسیون، کنترل کیفیت و خطاهای دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی



تصویر شماره ۳: هیستوگرام‌های نحوه پراکندگی گلبول‌های سفید برحسب اندازه در دستگاه‌های با توانایی شمارش افتراقی سه‌قسمتی

۲. کالیبراسیون دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی

کالیبراسیون به مجموعه فعالیت‌هایی اطلاق می‌شود که ارتباط میان مقادیر اندازه‌گیری شده یک کمیت توسط یک دستگاه یا روش آزمایشگاهی را با مقادیر واقعی آن ماده، که با روش‌های مرجع اندازه‌گیری شده است، مشخص می‌نماید. کالیبراتور ماده‌ای است که برای کالیبراسیون روش آزمایشگاهی به کار می‌رود و مقدار مشخصی دارد، درحالی که مواد کنترلی باید برای کنترل کیفیت روش آزمایشگاهی به کار رود و اغلب محدوده غلظتی دارند؛ بنابراین، مواد کنترلی هیچ‌گاه نمی‌توانند به‌عنوان جایگزین کالیبراتور استفاده شوند.

تمام دستگاه‌ها باید پس از نصب و پیش از شروع کار کالیبر شده و میزان عدم دقت آنها نیز بررسی شود. سوابق اجرایی این امر باید در آزمایشگاه نگهداری گردد.

کالیبراسیون باید به‌طور کل سالی یک یا دو بار و نیز در موارد زیر انجام شود:

- ◀ هنگام نصب و راه‌اندازی،
 - ◀ پس از هر بار تعمیر یا سرویس،
 - ◀ قابل قبول نبودن نتایج کنترل کیفی روزانه (در صورت اطمینان از خراب نبودن نمونه کنترل)،
 - ◀ تعویض محلول‌ها (در صورت تغییر مشخص در نتایج خون کنترل یا نمونه بیماران).
- برای بررسی میزان عدم دقت (CV) پارامترهای مختلف اندازه‌گیری شونده توسط دستگاه، می‌توان از نمونه‌های کنترل یا خون تازه در دامنه‌های طبیعی و غیرطبیعی مطابق توضیحات بند ۳ مبحث «کنترل کیفیت دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی» استفاده کرد که مقادیر به‌دست آمده باید مطابق ادعای کارخانه سازنده باشد که در دستورالعمل دستگاه درج شده است.

برای کالیبراسیون دستگاه، کالیبراتورهای تجاری وجود دارد که مقادیر مورد نظر در آنها با روش‌های مرجع اندازه‌گیری شده است. این سوسپانسیون‌های سلول‌های خونی، در صورت داشتن تاریخ انقضای معتبر و تأییدیه‌های لازم و به شرط رعایت

فصل دوم

اساس کار، کالیبراسیون، کنترل کیفیت و خطاهای دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی

دستورالعمل‌های کارخانه سازنده، برای کالیبراسیون دستگاه‌ها مناسب هستند. می‌توان موفقیت روند کالیبراسیون را به وسیله آزمایش نمونه کنترل، مقایسه نتایج دستگاه با نتایج آزمایش شده روی چند نمونه خون با روش‌های مرجع و یا کنترل دقیق میانگین‌های متحرک درباره شاخص‌های گلبول‌های قرمز^۱ تأیید کرد.

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

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

روش‌های مرجع اندازه‌گیری هموگلوبین، هماتوکریت و شمارش گلبول‌های سفید به ترتیب سیانمت هموگلوبین، میکروهماتوکریت و استفاده از هماسیتومتر (با درجه بندی نئوبار اصلاح شده) هستند. در کتاب‌های مرجع، روش مرجع شمارش گلبول‌های سفید، گلبول‌های قرمز و پلاکت‌ها، شمارنده‌های سلولی تک‌کاناله عنوان شده‌اند که در ایران، به علت دردسترس نبودن این تجهیزات، همچنان از هماسیتومتر استفاده می‌شود. به علت احتمال وجود خطای زیاد در شمارش سلولی با این روش، به ویژه در گلبول‌های قرمز و پلاکت‌ها، توصیه می‌شود که کالیبراسیون این پارامترها به وسیله شرکت پشتیبان صورت گیرد.

مثال

محاسبه ضریب کالیبراسیون: اگر میانگین اندازه‌گیری هموگلوبین به روش دستی ۱۴۰g/L و با دستگاه خودکار شمارنده سلولی ۱۴۵g/L باشد، عامل تصحیح کالیبراسیون دستگاه با استفاده از فرمول زیر محاسبه می‌شود:

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

طبق محاسبه بالا، ضریب کالیبراسیون دستگاه برای هموگلوبین باید به مقدار ۳/۴۴ کاهش یابد. به عنوان مثال، اگر ضریب کالیبراسیون دستگاه پیش از این ۱۰۰ بوده‌است، باید ۳/۴۴٪ کاهش یابد و روی ۹۶/۵۶ تنظیم شود.

در بعضی از انواع دستگاه‌های شمارنده مثل گروه سیسمکس، ضریب کالیبراسیون جدید با استفاده از فرمول کالیبراسیون که در دستورالعمل درج گردیده‌است، به ترتیب زیر محاسبه می‌شود:

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

نکته

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

فصل دوم

اساس کار، کالیبراسیون، کنترل کیفیت و خطاهای دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی

۳. کنترل کیفیت دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی

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

در ادامه این مبحث، علاوه بر نحوه استفاده از خون کنترل، درباره روش‌های مختلف کنترل کیفیت که برای بررسی عملکرد دستگاه نیز کاربرد دارند، توضیح داده خواهد شد.

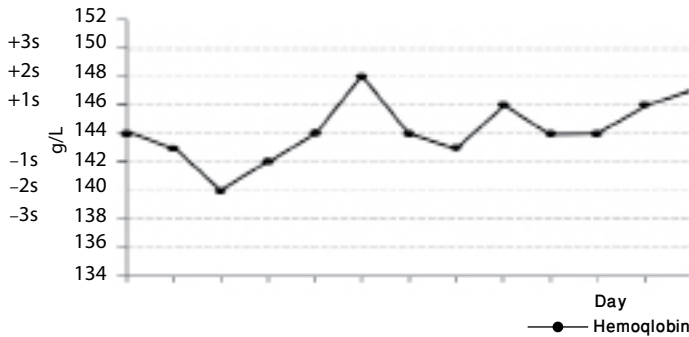
۳-۱- خون کنترل

طبق توصیه‌های منابع معتبر بین‌المللی خون‌شناسی، برای کنترل کیفیت دستگاه‌های شمارنده سلولی، باید در هر سری کاری، دست‌کم از دو نمونه خون کنترل در دامنه طبیعی و غیرطبیعی استفاده کرد. به این ترتیب، در ابتدای هر سری کاری، نمونه کنترل طبیعی و غیرطبیعی و در پایان، نمونه طبیعی با دستگاه شمارنده آزمایش و نتایج ثبت می‌شود. در ایران، دسترسی به خون کنترل در دامنه‌های مختلف برای تمام آزمایشگاه‌ها به راحتی امکان‌پذیر نیست؛ به همین دلیل، به‌طور معمول از خون کنترل در یک دامنه استفاده می‌شود.

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

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

در زیر نمودار کنترل کیفیت هموگلوبین، با میانگین 144g/L و انحراف معیارهای $\pm 1\text{SD}$ ، $\pm 2\text{SD}$ و $\pm 3\text{SD}$ به ترتیب 2g/L ، 4 و 6 مشاهده می‌شود. نقاط ثبت شده در نمودار نمایانگر میزان هموگلوبین خون کنترل در روزهای متوالی است. می‌توان نمودار کنترل کیفیت را با استفاده از قوانین لوی جنینگ^۱، وستگارد^۲ یا سازمان جهانی بهداشت تفسیر کرد. هر آزمایشگاه می‌تواند براساس اهداف کیفیتی که برای نتایج آزمایش‌های خود در نظر دارد، از یکی از این قوانین استفاده کند. با استفاده از نمودار کنترل کیفیت می‌توان خطاهای تصادفی و سیستماتیک را در صورت بروز مشخص کرد.



تصویر شماره ۴: نمودار کنترل کیفی هموگلوبین

فصل دوم

اساس کار، کالیبراسیون، کنترل کیفیت و خطاهای دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی

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

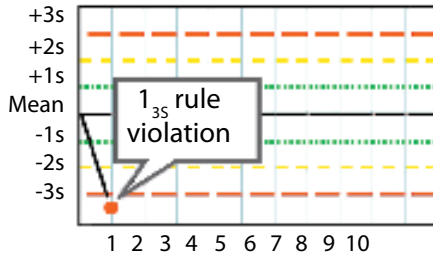
نتیجه خون کنترل	تفسیر
یک کنترل خارج از محدوده $\pm 2SD$	هشدار، نشان‌دهنده خطای تصادفی یا سیستماتیک
یک کنترل خارج از محدوده $\pm 3SD$	رد نتایج، نشان‌دهنده خطای تصادفی یا سیستماتیک
دو خواننده متوالی هم‌سو و خارج از محدوده $\pm 2SD$	رد نتایج، نشان‌دهنده خطای سیستماتیک
چهار خواننده متوالی و هم‌سو و خارج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

جدول شماره ۲: تفسیر نمودار کنترل کیفیت براساس قوانین وستگارد

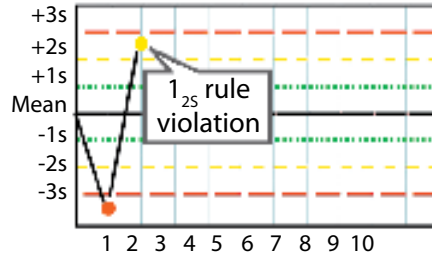
نتایج خون کنترل	تفسیر
1_{2s} یک کنترل خارج از محدوده $\pm 2SD$ (نمودار الف)	هشدار، لزوم بررسی سایر قوانین
1_{3s} یک کنترل خارج از محدوده $\pm 3SD$ (نمودار ب)	رد نتایج، نشان‌دهنده خطای تصادفی یا سیستماتیک
2_{2s} دو خواننده متوالی و هم‌سو، خارج از محدوده $\pm 2SD$ (نمودار ج)	رد نتایج، نشان‌دهنده خطای سیستماتیک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

نکته

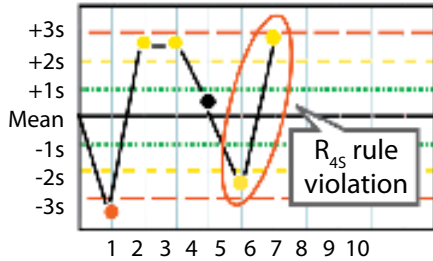
قوانین چندگانه و ستگارد بین مجموعه‌های کاری مختلف و نیز بین دو غلظت نمونه کترلی قابل استفاده هستند.



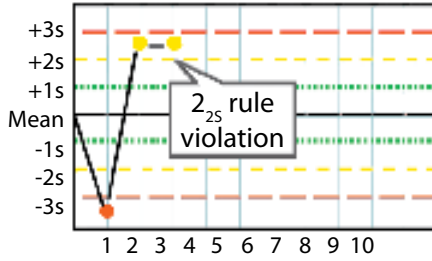
(ب)



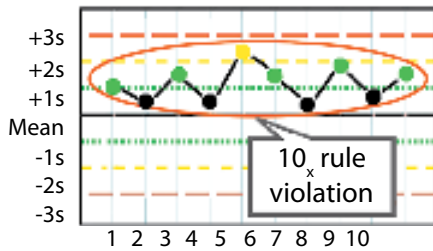
(الف)



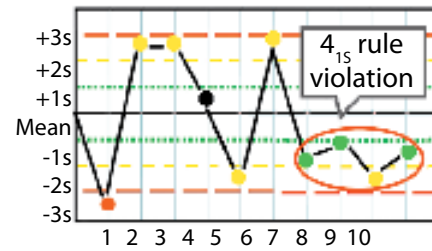
(د)



(ج)



(و)



(ه)

تصویر شماره ۵: نمودارهای کنترل کیفی با قوانین وستگارد

فصل دوم

اساس کار، کالیبراسیون، کنترل کیفیت و خطاهای دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی

نکته

در صورت یافتن هرگونه خطا با استفاده از نمودار، ابتدا، باید از آلوده یا خراب بودن نمونه کنترل اطمینان حاصل نمود. با مطمئن شدن از این امر پیش از برنامه‌ریزی برای کالیبراسیون دستگاه، باید اقدام‌های دیگری مانند شست‌وشوی دستگاه، آزمایش مجدد نمونه، آزمایش روی نمونه خون کنترل دیگر با همان سری ساخت، بررسی وضعیت محلول‌های دستگاه و... را مدنظر قرارداد.

۲-۳- آزمون پایداری کالیبراسیون^۱

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

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

n: تعداد جفت‌های مورد بررسی

d: اختلاف بین دو خواننده (روز به روز)

SD: انحراف معیار اختلافات

\bar{d} : میانگین اختلافات

مقدار t باید برای هر متغیر محاسبه شود. اگر مقدار آن برای ۵ نمونه از ۲/۷۸ و برای ۱۰ نمونه از ۲/۲۶ بیشتر باشد، با اطمینان ۹۵٪ می‌توان گفت که بین مقادیر شمارش شده در دو روز، اختلاف معنی‌دار وجود دارد. وجود اختلاف معنی‌دار برای یک متغیر، بیان‌کننده اشکال احتمالی است که در صورت تداوم، برای رفع آن باید اقدام مناسب صورت گیرد.

مثال

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

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

$$\sum d = 15$$

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

$$\sum d^2 = 55$$

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

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

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

چون عدد t به دست آمده از ۲/۷۸ (مقدار t برای ۵ نمونه) کمتر است، نتایج هموگلوبین دستگاه قابل قبول است.

فصل دوم

اساس کار، کالیبراسیون، کنترل کیفیت و خطاهای دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی

۳-۳- آزمایش دوتایی^۱

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

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

مثال

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

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

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

$$SD = 6.7$$

تفاوت بیشتر از ۲SD بین دو نتیجه آزمایش در نمونه سوم ($d = 10$)، نمایانگر بروز خطای تصادفی و لزوم تکرار آزمایش روی همان نمونه است.

۴-۳- آزمایش بازبینی^۱

یکی دیگر از روش‌های کنترل کیفیت، آزمایش بازبینی است که در صورت نگهداری نمونه‌ها در دمای مناسب (یخچال) اجراشدنی است. برای این کار باید ابتدای سری کاری یا صبح دو تا سه نمونه را پس از آزمایش بلافاصله با در بسته در یخچال قرارداد و در انتهای سری کاری یا بعد از ظهر یا روز بعد، آنها را مجدداً مورد آزمایش قرارداد. پیش از آزمایش، نمونه‌ها باید به دمای اتاق رسیده و کاملاً مخلوط شوند. نتایج این دو آزمایش را می‌توان با استفاده از فرمول آزمایش دوتایی مقایسه نمود که اختلاف نتایج در محدوده ۲SD قابل قبول است. در صورت نگهداری نمونه‌ها در شرایط مناسب، هرگونه تغییر در نتایج خارج از این محدوده، نشان‌دهنده اشکال در عملکرد دستگاه یا معرف‌ها است. این آزمایش برای بررسی تغییرات هموگلوبین و گلبول‌های قرمز مناسب است و به میزان کمتر برای گلبول‌های سفید و پلاکت‌ها کاربرد دارد؛ ولی برای هماتوکریت، به‌ویژه اگر فاصله زمانی بین دو آزمایش ۶ ساعت یا بیشتر باشد، کارایی ندارد.

نکته

بهرتر است نمونه‌هایی که برای آزمایش بازبینی و دوتایی آزمایش می‌شوند، یکسان باشند.

مثال

نتایج اندازه‌گیری هموگلوبین ۵ نمونه توسط دستگاه شمارنده در صبح و بعد از ظهر به شرح زیر است:

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

فصل دوم

اساس کار، کالبراسیون، کنترل کیفیت و خطاهای دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی

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

$$2SD = 2$$

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

۳-۵- آزمایش دلتا

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

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

۳-۶- استفاده از نتایج بیماران

به دلیل ثابت بودن مقادیر میانگین شاخص‌های گلبولی (MCV، MCH، MCHC) در فواصل روزها و هفته‌ها، می‌توان از این شاخص‌ها به منظور ارزیابی کیفیت عملکرد دستگاه شمارنده در آزمایشگاه‌هایی که حداقل روزی ۱۰۰ نمونه CBC پذیرش می‌کنند، استفاده نمود. بررسی‌ها نشان می‌دهند، در صورتی که نمونه‌های CBC مورد آزمایش در روزهای مختلف از نظر میزان اندکس‌های خونی تفاوت مشخصی با یکدیگر نداشته باشند که به تأثیر بارز بر میانگین‌ها منجر شود، مانند پذیرش نمونه‌های افراد مبتلا به فقر آهن یا تالاسمی در یک روز خاص در هفته که باعث کاهش شاخص‌های گلبولی می‌شوند، هرگونه تغییر مشخص در میانگین اندکس‌ها نشان‌دهنده تغییر در کالیبراسیون یا اختلال عملکرد دستگاه است. برای استفاده از این روش، ابتدا باید میانگین و $\pm 2SD$ اندکس‌های MCV، MCH، MCHC و حداقل ۳۰۰ تا ۵۰۰ نمونه را محاسبه و سپس، نمودار کنترل کیفیت را رسم نمود.

در صورت مراجعه بیمارانی که اندکس‌های خونی طبیعی ندارند، مانند مبتلایان به بیماری‌های ذکر شده، نتایج اندکس‌های گلبولی آنها نباید در محاسبه میانگین لحاظ شود. پس از رسم نمودار، نمونه‌های بیماران را روزانه به گروه‌های بیست‌تایی تقسیم کرده و پس از محاسبه میانگین شاخص‌های گلبولی آنها و ثبت این میانگین روی نمودار، هرگونه انحراف از مقادیر مجاز را می‌توان نمایانگر عملکرد نامناسب دستگاه دانست. برای اطمینان از درست بودن این روش، انتخاب گروه‌های بیست‌تایی نمونه‌ها، باید به صورت تصادفی باشد و در هر دسته نیز بیش از ۷ نمونه دارای شرایط بالینی یکسان نباشند. این روش کنترل کیفی به صورت برنامه‌های نرم‌افزاری روی بعضی دستگاه‌ها نصب شده است.

۳-۷- بررسی عدم دقت (CV)

این بررسی به دو شکل انجام پذیر است. در صورت استفاده از خون کنترل، می‌توان با استفاده از نتایج نمونه کنترل که طی روزهای متوالی با دستگاه آزمایش شده، عدم دقت هر پارامتر را محاسبه کرد و در صورت دسترسی نداشتن به خون کنترل، باید از نمونه‌های روزانه برای این امر استفاده کرد. به این ترتیب، هر ماه دو نمونه یا بیشتر را حداقل ۱۰ بار به صورت متوالی با دستگاه آزمایش کرده و از نتایج به دست آمده، عدم دقت هر پارامتر

فصل دوم

اساس کار، کالبراسیون، کنترل کیفیت و خطاهای دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی

را محاسبه کرد. توصیه می‌شود که عدم دقت دستگاه به‌ویژه هنگام نصب و راه‌اندازی، با استفاده از نمونه‌هایی با دامنه‌های طبیعی و غیرطبیعی بررسی شود. برای تهیه نمونه غیرطبیعی پایین، می‌توان از نمونه رقیق شده استفاده کرد، به این ترتیب که پلاسمای نمونه را جدا کرده و سپس حجمی از نمونه را با این پلاسما به دست آمده مخلوط کرد. نمونه خون با دامنه غیرطبیعی بالا را نیز می‌توان با غلیظ کردن نمونه تهیه نمود. برای این کار باید ظرف نمونه را به مدت ۲ ساعت با زاویه ۴۵° نگهداری کرد و سپس با برداشتن نیمی از پلاسما ایجاد شده و مخلوط کردن کامل، از آن به عنوان نمونه غیرطبیعی بالا استفاده نمود. در صورت مطابقت نداشتن عدم دقت هر پارامتر با ادعای سازنده که در بروشور درج شده است، ضروری است با شرکت پشتیبان تماس گرفته شود.

مثال

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

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

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

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

$$SD = \sqrt{\frac{۰/۲۰۱}{۹}} = ۰/۱۴۸$$

$$CV\% = \frac{۰/۱۴۸ \times 100}{۷/۶۳} \quad CV\% = ۱/۹$$

۳-۸- بررسی صحت

روش‌های ذکر شده جزئی از برنامه‌های کنترل داخلی کیفیت هستند و به منظور بررسی تکرارپذیری مناسب آزمایش‌ها انجام می‌شوند، ولی تکرارپذیری مناسب همواره نشان‌دهنده صحت نتایج نیست. برای ارزیابی صحت عملکرد تجهیزات و روش‌های آزمایش، باید از روش‌های دیگری نظیر استفاده از استاندارد، کالیبراتور و یا شرکت در برنامه‌های کنترل خارجی کیفیت استفاده کرد. هدف برنامه کنترل خارجی کیفیت، ایجاد هماهنگی بین نتایج آزمایشگاه‌ها است.

در این برنامه، نمونه‌های مجهول از مرکز اجرای برنامه به آزمایشگاه‌های شرکت‌کننده فرستاده می‌شود. آزمایشگاه‌ها پس از انجام آزمایش‌های لازم روی نمونه‌ها، نتایج را جهت پردازش به مرکز اجرای برنامه ارسال می‌نمایند. نتایج در مرکز ذکر شده به روش‌های مختلف بررسی می‌شود که یکی از آنها مقایسه نتایج هر آزمایشگاه با میانگین نتایج کل آزمایشگاه‌ها است که نتیجه آن به صورت (DI)^۱ به اطلاع آزمایشگاه رسانده می‌شود.

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

x: میانگین گروه

x: نتیجه هر آزمایشگاه

SD: انحراف معیار مجاز هر پارامتر

نحوه تفسیر:

۱ < DI = نتیجه مناسب

۲-۱ DI = قابل قبول اما بینابینی

۳-۲ DI = نیاز به بررسی روش آزمایش و یا کالیبراسیون

۳ < DI = نیاز به اقدام فوری

۳-۹- تطابق نتایج دستگاه با یافته‌های میکروسکوپی یا بالینی

به توصیه سازمان جهانی بهداشت، بررسی نتایج آزمایش‌های حاصل از دستگاه و مقایسه و مطابقت آنها با مشاهده میکروسکوپی گسترش‌های خونی مربوطه و یافته‌های بالینی بیمار، باید از برنامه‌های دائمی کنترل کیفیت آزمایشگاه باشد. به این ترتیب، هرگونه نتیجه

فصل دوم

اساس کار، کالبراسیون، کنترل کیفیت و خطاهای دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی

غیرقابل انتظار حاصل از دستگاه نظیر لکوسیتوز، لکوپنی، ترومبوسیتوپنی، هموگلوبین خیلی پایین یا بالا و اندکس‌های غیرطبیعی باید پیش از گزارش با مشاهده گسترش خون محیطی یا بررسی وضعیت بالینی و یا سابقه بیمار تأیید شود.

نکته

اگر چه مقایسه روش دستی (مرجع) و دستگاهی در مراجع معتبر روش روزمره برای کنترل کیفیت عنوان نشده است، ولی در بسیاری از آزمایشگاه‌های کشور از این روش به عنوان یکی از راه‌های کنترل کیفیت استفاده می‌شود. در صورت استفاده از این روش، توجه به نکته‌های زیر الزامی است:

۱. آزمایش دست کم روی ۳ نمونه (بدیهی است آزمایش روی تعداد نمونه‌های بیشتر امکان دستیابی به نتایج صحیح‌تر را فراهم می‌نماید)؛
۲. انجام آزمایش دوتایی به روش دستی و دستگاهی روی هر نمونه و محاسبه میانگین نتایج برای هر پارامتر با هر دو روش؛
۳. استفاده از آزمون آماری Paired t test برای مقایسه هم‌خوانی نتایج.

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

$$\text{Variance}(SD^2) = \frac{\sum(d-\bar{d})^2}{n-1}$$
$$\text{Standard error of difference in mean (SEdiff)} = \frac{\sqrt{SD^2}}{n}$$
$$t = \frac{\bar{d}}{\text{SEdiff}}$$

n: تعداد نمونه‌ها

d: اختلاف نتایج روش دستی و دستگاهی برای هر نمونه

\bar{d} : میانگین اختلاف نتایج

SD^2 : واریانس^۱ اختلاف بین نتایج

SE diff: تفاوت استاندارد میانگین دو گروه داده

مقادیر مجاز t با توجه به ضرایب اطمینان مختلف در جدول t test درج شده است. با استفاده از این جدول براساس تعداد نمونه‌ها (n) و درجه آزادی (n-1) و در نظر داشتن ضریب اطمینان ۰.۹۵، می‌توان عدد t مجاز را مشخص کرد.

دستگاه‌های خودکار شمارندهٔ سلولی (اساس کار، کالیبراسیون، کنترل کیفیت و خطاها)

جدول شمارهٔ ۳: جدول مقادیر t براساس ضرایب اطمینان مختلف

سطح درصد اطمینان							
df	۵۰	۴۰	۳۰	۲۰	۱۰	۵	۱
۱	۱	۱/۳۷۶	۱/۹۶۳	۳/۰۷۸	۶/۳۱۴	۱۲/۷۰۶	۶۳/۶۵۷
۲	۰/۸۱۶	۱/۰۶۱	۱/۳۸۶	۱/۸۸۶	۲/۹۲۰	۴/۳۰۳	۹/۹۲۵
۳	۰/۷۶۵	۰/۹۷۸	۱/۲۵۰	۱/۶۳۸	۲/۳۵۳	۳/۱۸۲	۵/۸۴۱
۴	۰/۷۴۱	۰/۹۴۱	۱/۱۹۰	۱/۵۳۳	۲/۱۳۲	۲/۷۷۶	۴/۶۰۴
۵	۰/۷۲۷	۰/۹۲۰	۱/۱۵۶	۱/۴۷۶	۲/۰۱۵	۲/۵۷۱	۴/۰۳۲
۶	۰/۷۱۸	۰/۹۰۶	۱/۱۳۴	۱/۴۴۰	۱/۹۴۳	۲/۴۴۷	۳/۷۰۷
۷	۰/۷۱۱	۰/۸۹۶	۱/۱۱۹	۱/۴۱۵	۱/۸۹۵	۲/۳۶۵	۳/۴۹۹
۸	۰/۷۰۶	۰/۸۸۹	۱/۱۰۸	۱/۳۹۷	۱/۸۶۰	۲/۳۰۶	۳/۳۵۵
۹	۰/۷۰۳	۰/۸۸۳	۱/۱۰۰	۱/۳۸۳	۱/۸۳۳	۲/۲۶۲	۳/۲۵۰
۱۰	۰/۷	۰/۸۷۹	۱/۰۹۳	۱/۳۷۲	۱/۸۱۲	۲/۲۲۸	۳/۱۶۹
۱۱	۰/۶۹۷	۰/۸۷۶	۱/۰۸۸	۱/۳۶۳	۱/۷۹۶	۲/۲۰۱	۳/۱۰۶
۱۲	۰/۶۹۵	۰/۸۷۳	۱/۰۸۳	۱/۳۵۶	۱/۷۸۲	۲/۱۷۹	۳/۰۵۵
۱۳	۰/۶۹۴	۰/۸۷۰	۱/۰۷۹	۱/۳۵۰	۱/۷۷۱	۲/۱۶۰	۳/۰۱۲
۱۴	۰/۶۹۲	۰/۸۶۸	۱/۰۷۶	۱/۳۴۵	۱/۷۶۱	۲/۱۴۵	۲/۹۷۷
۱۵	۰/۶۹۱	۰/۸۶۶	۱/۰۷۴	۱/۳۴۱	۱/۷۵۳	۲/۱۳۱	۲/۹۴۷
۱۶	۰/۶۹۰	۰/۸۶۵	۱/۰۷۱	۱/۳۳۷	۱/۷۴۶	۲/۱۲۰	۲/۹۲۱
۱۷	۰/۶۸۹	۰/۸۶۳	۱/۰۶۹	۱/۳۳۳	۱/۷۴۰	۲/۱۱۰	۲/۹۸۹
۱۸	۰/۶۸۸	۰/۸۶۲	۱/۰۶۷	۱/۳۳۰	۱/۷۳۴	۲/۱۰۱	۲/۸۷۸
۱۹	۰/۶۸۸	۰/۸۶۱	۱/۰۶۶	۱/۳۲۸	۱/۷۲۹	۲/۰۹۳	۲/۸۶۱
۲۰	۰/۶۸۷	۰/۸۶۰	۱/۰۶۴	۱/۳۲۵	۱/۷۲۵	۲/۰۸۶	۲/۸۴۵
۲۱	۰/۶۸۶	۰/۸۵۹	۱/۰۶۳	۱/۳۲۳	۱/۷۲۱	۲/۰۸۰	۲/۸۳۱
۲۲	۰/۶۸۶	۰/۸۵۸	۱/۰۶۱	۱/۳۲۱	۱/۷۱۷	۲/۰۷۴	۲/۸۱۹
۲۳	۰/۶۸۵	۰/۸۵۸	۱/۰۶۱	۱/۳۲۱	۱/۷۱۷	۲/۰۷۴	۲/۸۱۹
۲۴	۰/۶۸۵	۰/۸۵۷	۱/۰۵۹	۱/۳۱۸	۱/۷۱۱	۲/۰۶۴	۲/۷۹۷
۲۵	۰/۶۸۴	۰/۸۵۶	۱/۰۵۸	۱/۳۱۶	۱/۷۰۸	۲/۰۶۰	۲/۷۸۷
۲۶	۰/۶۸۴	۰/۸۵۶	۱/۰۵۸	۱/۳۱۵	۱/۷۰۶	۲/۰۵۶	۲/۷۷۹
۲۷	۰/۶۸۴	۰/۸۵۵	۱/۰۵۷	۱/۳۱۴	۱/۷۰۳	۲/۰۵۲	۲/۷۷۱
۲۸	۰/۶۸۳	۰/۸۵۵	۱/۰۵۶	۱/۳۱۳	۱/۷۰۱	۲/۰۴۸	۲/۷۶۳
۲۹	۰/۶۸۳	۰/۸۵۴	۱/۰۵۵	۱/۳۱۱	۱/۶۹۹	۲/۰۴۵	۲/۷۵۶
۳۰	۰/۶۸۳	۰/۸۵۴	۱/۰۵۵	۱/۳۱۰	۱/۶۹۷	۲/۰۴۲	۲/۷۵۰
۴۰	۰/۶۸۱	۰/۸۵۱	۱/۰۵۰	۱/۳۰۳	۱/۶۸۴	۲/۰۲۱	۲/۷۰۴
۵۰	۰/۶۸۰	۰/۸۴۹	۱/۰۴۸	۱/۲۹۹	۱/۶۷۶	۲/۰۰۸	۲/۶۷۸
۶۰	۰/۶۷۹	۰/۸۴۸	۱/۰۴۶	۱/۲۹۶	۱/۶۷۱	۲	۲/۶۶۰
۱۲۰	۰/۶۷۷	۰/۸۴۵	۱/۰۴۱	۱/۲۸۹	۱/۶۵۸	۱/۹۸۰	۲/۶۱۷
∞	۰/۶۷۴	۰/۸۴۲	۱/۰۳۶	۱/۲۸۲	۱/۶۴۵	۱/۹۶۰	۲/۵۷۶

فصل دوم

اساس کار، کالیبراسیون، کنترل کیفیت و خطاهای دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی

مثال

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

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

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

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

بر اساس جدول t با توجه به تعداد نمونه‌های مورد آزمایش (۳ نمونه) و درجه آزادی (n-1) مقدار t مورد قبول با ضریب اطمینان ۹۵٪ برابر ۴/۳ است. کمتر بودن مقدار t محاسبه شده در این آزمایش (۰/۱۵) از مقدار t مجاز (۴/۳) نشان دهنده همخوانی و قابل قبول بودن نتایج است.

۴. خطاهای دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی

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

۱. افزایش شمارش گلبول‌های سفید بیش از $10^9 \times 30$ معمولاً به دلیل ایجاد کدورت باعث افزایش کاذب، ولی جزئی در هموگلوبین و همچنین، افزایش کاذب هماتوکریت و MCV می‌شود.
۲. افزایش غلظت گلوکز (بیش از 400 mg/dL) و افزایش اسمولالیت خون ناشی از سایر علل ممکن است سبب افزایش کاذب MCV و هماتوکریت و کاهش MCHC شود. برای رفع این خطا خون باید پیش از انجام آزمایش ده دقیقه با ایزوتون انکوبه شود.
۳. آگلو تینین‌های سرد با تیتراهای بالا، به‌طور کاذب باعث کاهش شمارش گلبول‌های قرمز و افزایش MCV و MCHC می‌شوند که با گرم کردن خون یا محلول رقیق‌کننده این مشکل حل می‌شود.
۴. در بعضی از انواع لوسمی‌ها که گلبول‌های سفید شکننده هستند، شمارش آنها به‌طور کاذب کاهش نشان می‌دهد که در این موارد، شمارش با هماسیتومتر کمک‌کننده است.
۵. سطوح بسیار بالای چربی باعث کدر شدن پلاسما و در نتیجه افزایش کاذب مقدار هموگلوبین، MCH و MCHC می‌شود. برای حل این مشکل، اندازه‌گیری هموگلوبین باید

فصل دوم

اساس کار، کالیبراسیون، کنترل کیفیت و خطاهای دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی

به روش دستی و با افزودن حجم مناسبی از پلاسمای بیمار به بلانک و صفرکردن دستگاه اسپکتروفتومتر با آن انجام شود.

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

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

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

جدول شماره ۵: برخی از دلایل افزایش کاذب هموگلوبین

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

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

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

فصل دوم

اساس کار، کالبراسیون، کنترل کیفیت و خطاهای دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی

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

<p>۱. وجود پلاکت‌های درشت به تعداد زیاد ۲. افزایش چربی خون (ناپایدار) ۳. کرایوگلوبولینمی ۴. کرایوفیبرینوژنمی</p>	<p>افزایش کاذب تعداد گلبول‌های قرمز</p>
<p>۱. پان‌آگلوتیناسیون ناشی از ایجاد آگلوتینین‌های سرد وابسته به EDTA ۲. لیز گلبول‌های قرمز خارج از بدن به دنبال نگهداری نامناسب نمونه یا وجود گلبول‌های قرمز غیرطبیعی ۳. میکروسیتوز بسیار شدید یا تکه‌تکه‌شدن گلبول‌های قرمز در بعضی بیماری‌ها</p>	<p>کاهش کاذب تعداد گلبول‌های قرمز</p>
<p>۱. نگهداری خون در دمای اتاق ۲. آگلوتینین‌های سرد و آگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز وابسته به EDTA ۳. تعداد زیاد گلبول‌های سفید ۴. شرایط هیپراسمولار ۵. اضافه شدن EDTA K₂</p>	<p>افزایش کاذب MCV</p>
<p>۱. گلبول‌های قرمز هیپوکرومیک ۲. افزایش دمای اتاق ۳. شرایط هیپواسمولار ۴. مخلوط کردن مکرر نمونه که باعث افزایش اکسیژناسیون گلبول‌های قرمز می‌شود</p>	<p>کاهش کاذب MCV</p>
<p>۱. افزایش کاذب MCV (غیر از مواقعی که به دنبال آگلوتینین‌های سرد رخ می‌دهد) ۲. کاهش کاذب تعداد گلبول‌های قرمز</p>	<p>افزایش کاذب هماتوکریت</p>
<p>۱. کاهش کاذب میزان MCV ۲. کاهش کاذب گلبول‌های قرمز به دلیل میکروسیتوز بسیار شدید یا لیز گلبول‌های قرمز خارج بدن ۳. آگلوتینین سرد ۴. مخلوط کردن مکرر نمونه که باعث افزایش اکسیژناسیون گلبول‌های قرمز می‌شود</p>	<p>کاهش کاذب هماتوکریت</p>

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

<p>۱. لخته شدن نسبی نمونه ۲. فعال شدن پلاکت‌ها در حین خون‌گیری و تجمع آنها ۳. تجمع پلاکتی ایجادشده توسط EDTA ۴. Platelet Satellitism ۵. پلاکت‌های ژانت که اندازه آنها از آستانه تعیین شده برای پلاکت‌ها بیشتر باشد</p>	پایین بودن کاذب شمارش پلاکت‌ها
<p>۱. گلبول‌های قرمز میکروسیت یا تکه تکه شده ۲. گلبول‌های سفید خرد شده ۳. بیماری هموگلوبین H ۴. کرایوگلوبولین ۵. هیپرتری گلیسریدمی یا هیپرلیپیدمی ۶. وجود میکروارگانیسم‌ها در نمونه خون ۷. گرم کردن ناخواسته خون</p>	بالا بودن کاذب شمارش پلاکت‌ها

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

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

فصل دوم

اساس کار، کالبراسیون، کنترل کیفیت و خطاهای دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی

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

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

فصل سوم

روش‌های مرجع انجام آزمایش‌ها

۱. اندازه‌گیری هموگلوبین خون به روش سیان‌مت‌هموگلوبین

روش شیمیایی اندازه‌گیری هموگلوبین در خون با روش سیان‌مت‌هموگلوبین، روش دستی اندازه‌گیری مرجع هموگلوبین است که برای کالیبراسیون دستگاه‌های شمارنده نیز کاربرد دارد. نکته‌های مهمی که هنگام انجام این آزمایش برای دستیابی به نتایج صحیح باید در نظر گرفته شوند:

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

KCN	۰/۰۵g
$K_3Fe(CN)_6$	۰/۲g
KH_2PO_4 (Anhydrous)	۰/۱۴۰g
Nonionic Detergent	۰/۵-۱mL
Clinical laboratory Reagent water (type I)	۱۰۰۰mL

این معرف در مدت ۵ دقیقه تمام هموگلوبین‌ها را غیر از سولفوهموگلوبین به سیان‌مت‌هموگلوبین تبدیل می‌کند. کربوکسی هموگلوبین که در افراد سیگاری افزایش می‌یابد، برای اکسیدشدن به ۳۰ دقیقه زمان نیاز دارد.

- ◀ محلول درابکین را باید در ظرف‌های تیره در بسته از جنس بوروسیلیکات نگهداری نمود و در صورت مشاهده کدری دور ریخت.
- ◀ هنگام استفاده از این محلول‌ها و دفع آنها، به علت سمی بودن، احتیاط‌های لازم باید از نظر ایمنی به کار رود.

- ◀ از درابکین با ترکیب‌های دیگر (غیر از فرمول بالا) نیز می‌توان استفاده نمود، ولی زمان کامل شدن واکنش طولانی‌تر و احتمال ایجاد کدری بیشتر است.
- ◀ برای انجام آزمایش می‌توان از نمونه خون مویرگی یا وریدی استفاده نمود، ولی استفاده از خون وریدی برتری دارد.
- ◀ ضدانعقاد مناسب، نمک‌های EDTA (دی‌سدیک یا دی‌پتاسیک) هستند که به مقدار $2/2\text{mg/mL} - 1/5$ به ازای هر میلی‌لیتر خون باید استفاده شوند.
- ◀ پس از خون‌گیری، باید نمونه را بلافاصله با ضدانعقاد مخلوط نمود.
- ◀ در صورت استفاده از $K_3\text{EDTA}$ ، به دلیل ایجاد رقت در نمونه، میزان هموگلوبین تا ۱٪ کاهش نشان می‌دهد.

روش آزمایش

- ◀ در روش معمول اندازه‌گیری هموگلوبین به روش دستی، $0/02\text{mL}$ خون با 5mL درابکین مخلوط و پس از طی مدت لازم برای کامل شدن واکنش، جذب نوری آن با فتومتر خوانده می‌شود.
- ◀ برای انجام آزمایش به منظور کالیبراسیون دستگاه شمارنده، از روش رقت زیاد^۱ استفاده می‌شود تا احتمال خطای ناشی از رقیق‌سازی کاهش یابد. برای اجرای این کار، می‌توان از روش‌های رقیق‌سازی زیر استفاده کرد:
 - $0/04\text{mL}$ خون با 10mL درابکین یا
 - $0/4\text{mL}$ یا $0/5\text{mL}$ خون با 100mL درابکین یا
 - $0/1\text{mL}$ خون با 25mL درابکین.

نکته

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

در هر دو روش معمولی و بارقت زیاد، ابتدا نمونه خون توسط پیپت یا سمپلر با سرعت آهسته و ثابت کشیده می‌شود و پس از پاک کردن سطح خارجی پیپت یا سرسمپلر با پارچه بدون پرز، که

فصل سوم

روش‌های مرجع انجام آزمایش‌ها

با آب مقطر یا نرمال سالین مرطوب شده، داخل لوله آزمایش تخلیه می‌شود. نمونه باقی مانده در پیپت یا سرسمپلر، باید با ۸ تا ۱۰ بار برداشت و تخلیه، با محتویات لوله کاملاً شسته شود. برای مخلوط شدن کامل خون و درابکین، پس از ۵ تا ۶ بار سروته نمودن لوله، باید محلول را برای کامل شدن واکنش پیش از خواندن جذب نوری، ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری نمود.

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

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

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

منابع خطا

- ◀ تکنیک نامناسب خون‌گیری و ریدی که با تغلیظ نمونه سبب افزایش کاذب مقدار هموگلوبین و شمارش سلولی می‌شود؛
- ◀ استفاده از تجهیزات بدون سوابق کنترل کیفیت و کالیبراسیون؛
- ◀ آگاهی ناکافی کارکنان از نحوه صحیح انجام آزمایش و منابع خطا؛
- ◀ مخلوط نمودن ناکافی نمونه پیش از آزمایش؛
- ◀ وجود لخته در نمونه؛
- ◀ نگهداری درابکین در مقابل نور یا یخ‌زدن؛
- ◀ استفاده از استاندارد خراب یا تاریخ مصرف گذشته (به‌ویژه اگر پس از باز شدن مدت طولانی در دمای اتاق بماند)؛
- ◀ کالیبراسیون نادرست اسپکتروفتومتر؛

◀ عملکرد نامناسب اسپکتروفتومتر ناشی از کافی نبودن زمان گرم شدن دستگاه یا بیش از حد گرم شدن دستگاه، اختلالات مربوط به منبع نوری، فتوسل، ولتاژ، خطی نبودن دستگاه، صحیح قرارنگرفتن کووت و یا استفاده از کووت کثیف یا خش دار.

۲. روش اندازه‌گیری حجم سلول‌های متراکم شده به روش میکروهماتوکریت

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

نکته‌های مهم در آزمایش اندازه‌گیری حجم گلبول‌های قرمز متراکم شده

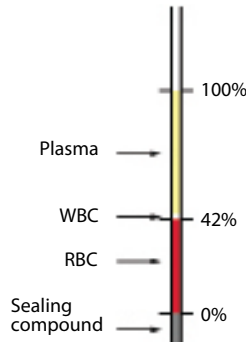
- ◀ انجام آزمایش با استفاده از خون مویرگی، شریانی و وریدی امکان‌پذیر است.
- ◀ در جمع‌آوری نمونه به طریق مویرگی، از لوله‌های هپارینه حاوی حداکثر ۷ واحد هپارین به‌ازای هر لوله مویینه استفاده می‌شود.
- ◀ می‌توان نمونه را پس از جمع‌آوری در دمای اتاق نگهداری و حداکثر در مدت ۶ ساعت پس از نمونه‌گیری آزمایش نمود.
- ◀ نمونه‌ها باید به روش دوتایی آزمایش شوند. مقدار هماتوکریت نمونه‌های دوتایی نباید بیش از $0.05 / (0.05)$ با یکدیگر اختلاف داشته باشند.
- ◀ در صورت انجام این آزمایش، به‌منظور کالیبراسیون دستگاه شمارنده فقط باید از ضدانعقاد K_2EDTA استفاده شود تا از چروکیدگی گلبول‌های قرمز جلوگیری شود. استفاده از ضدانعقاد K_3EDTA به‌علت ایجاد چروکیدگی در گلبول‌های قرمز میزان MCV را ۲٪ کاهش می‌دهد. در صورت استفاده از ضدانعقاد مایع، ضریب رقت باید محاسبه شود.
- ◀ توصیه می‌شود برای انجام آزمایش کالیبراسیون دستگاه شمارنده از لوله‌های مویینه با حلقه آبی (بدون ضدانعقاد) استفاده شود.
- ◀ هنگام خواندن نتیجه با خط‌کش مخصوص، مقدار بافی‌کوت در نظر گرفته نشود.
- ◀ خطای قابل قبول اندازه‌گیری حجم سلول‌های متراکم شده به روش میکروهماتوکریت $\pm 1\%$ است.

فصل سوم

روش‌های مرجع انجام آزمایش‌ها

روش آزمایش

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



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

منابع خطا

- ◀ توقف جریان خون^۱ به علت بستن طولانی تورنیکه که باعث افزایش غلظت خون می‌شود؛
- ◀ خون‌گیری‌های سخت و طولانی به دلیل ورود مایع بین‌بافتی به فضای داخل عروقی که باعث رقیق یا لخته شدن خون می‌شود؛
- ◀ همولیز در اثر استفاده از سرسوزن نازک؛
- ◀ مخلوط نشدن نمونه با ضدانعقاد؛
- ◀ پر یا مسدود کردن نادرست انتهای لوله هماتوکریت؛
- ◀ مسدود کردن انتهای لوله با حرارت؛
- ◀ خطای دید هنگام خواندن نتیجه آزمایش؛

- ◀ محاسبه بافی کوت به‌عنوان جزئی از ستون گلبول‌های قرمز هنگام خواندن نتیجه آزمایش؛
- ◀ خطای به‌دام افتادن پلاسما^۱ که این مورد در آنمی‌های ماکروسیتیک کم و در اسفروسیتوز، تالاسمی و آنمی سیکل سل زیاد است. در حالت طبیعی، میزان پلاسمای به‌دام افتاده ۱٪ تا ۳٪ است که هنگام کالیبراسیون دستگاه شمارنده باید ۲٪ در نظر گرفته شود.

جدول شماره ۱۱: علل کاهش و افزایش کاذب هماتوکریت

علل کاهش کاذب میزان هماتوکریت	علل افزایش کاذب میزان هماتوکریت
EDTA اضافی	هیپوناترمی
همولیز	به‌دام افتادن پلاسما
هیپوناترمی	

ویژگی‌های دستگاه میکروهماتوکریت استاندارد

- ◀ شعاع چرخش بیشتر از ۸cm؛
- ◀ توانایی رسیدن به حداکثر سرعت در ۳۰ ثانیه؛
- ◀ توانایی ایجاد RCF حدود ۱۰۰۰۰g تا ۱۲۰۰۰g در محیط، حداقل به مدت ۵ دقیقه بدون افزایش دما از ۴۵°C؛
- ◀ داشتن زمان سنج خودکار (با قابلیت تنظیم حداقل ۳۰ ثانیه).

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

RCF: میدان نسبی سانتریفوژ

RPM: دور در دقیقه

1. Plasma Trapping
2. Relative Centrifugal Field
3. Revolution Per Minute

فصل سوم

روش‌های مرجع انجام آزمایش‌ها

کنترل کیفیت و بررسی کالیبراسیون دستگاه میکروهماتوکریت

دستگاه میکروهماتوکریت باید توانایی ایجاد حداقل نیرویی برابر با 10000g به مدت ۵ دقیقه را دارا باشد.

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

◀ سرعت سانتریفوژ،

◀ زمان سنج،

◀ حداکثر توان در تجمع سلول‌ها!

سرعت سانتریفوژ (دور در دقیقه) و عملکرد زمان‌سنج دستگاه به ترتیب با تاکومتر کالیبره و کروномتر ارزیابی می‌شوند.

برای بررسی حداکثر توان دستگاه در تجمع سلول‌ها از خون تازه استفاده می‌شود. برای انجام این امر دو نمونه خون تازه حاوی ضدانعقاد EDTA دی‌پتاسیک که به خوبی مخلوط شده‌اند را به صورت دوتایی به مدت دو دقیقه سانتریفوژ کرده و مقادیر PCV آنها ثبت می‌شود. سپس، زمان سانتریفوژ را ۳۰ ثانیه به ۳۰ ثانیه افزوده تا زمانی که میزان دو هماتوکریت اندازه‌گیری شده پی‌درپی بدون تغییر بماند. این زمان به عنوان حداقل زمان لازم برای متراکم نمودن گلبول‌های قرمز در نظر گرفته می‌شود. این آزمایش بهتر است حداقل با یک نمونه دارای هماتوکریت $0.5(50\%)$ یا بیشتر نیز انجام شود.

جدول شماره ۱۲ مثالی است از ارزیابی حداکثر توان یک دستگاه میکروهماتوکریت در تجمع سلول‌ها.

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

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

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

داده‌های جدول بالا نشان می‌دهد که زمان متراکم نمودن گلبول‌های قرمز در دستگاه میکروهماتوکریت مورد آزمایش، ۳/۵ دقیقه برای آزمایش نمونه‌ای با میزان هماتوکریت کمتر از ۰/۵ و ۴/۵ دقیقه برای نمونه‌ای با هماتوکریت بیشتر از ۰/۵ است. ارزیابی عملکرد دستگاه میکروهماتوکریت به روش توصیه شده سازمان جهانی بهداشت به صورت زیر انجام می‌شود:

چند نمونه خون با هماتوکریت کمتر از ۰/۵ و حاوی ضدانعقاد EDTA دی‌پتاسیک (۱/۵mg برای هر میلی‌لیتر خون) را پس از بیست بار سروته نمودن ظرف نمونه، به صورت دوتایی به مدت ۳، ۵، ۷، ۹ و ۱۱ دقیقه سانتریفوژ کرده و سپس نتایج آنها ثبت می‌شود. در صورت مناسب بودن توان دستگاه (برحسب g)، نتایج باید از دقیقه ۵ به بعد بدون تغییر بماند.

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

فصل سوم

روش‌های مرجع انجام آزمایش‌ها

۳. شمارش سلول‌های خونی به روش دستی

شمارش گلبول‌های سفید و پلاکت‌ها به روش دستی، جایگزین قابل قبولی برای دستگاه‌های شمارنده سلولی است، ولی برای شمارش گلبول‌های قرمز کاربرد زیادی ندارد؛ زیرا در آزمایشگاه‌ها در شرایط معمول برای شمارش‌های دستی، حدود ۴۰۰ گلبول قرمز شمارش شده که موجب دقت زیاد در شمارش این سلول‌ها می‌شود.

برای شمارش سلول‌های خونی به روش دستی از هماسیتومتر (نئوبار اصلاح شده) استفاده می‌شود که بر روی آن ۹ فضای خط‌کشی شده با مساحت $1\text{mm} \times 1\text{mm}$ تعبیه شده است. پس از قرار گرفتن لامل سنگین (دارای سطح صیقلی) روی آن فضایی با حجم 0.1^4mm ایجاد می‌شود.

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

شمارش گلبول‌های سفید

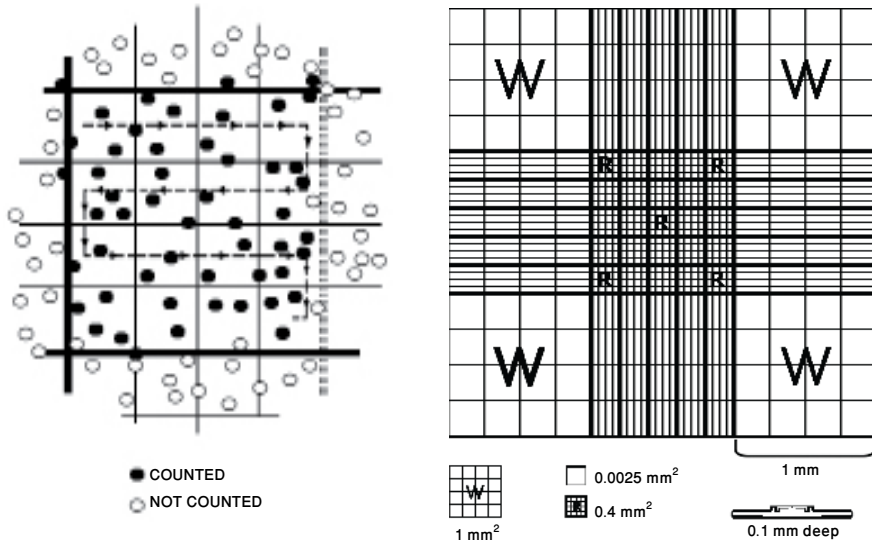
برای شمارش گلبول‌های سفید، خون حاوی ضدانعقاد EDTA با محلول حاوی ماده رنگی مخلوط می‌شود که علاوه بر لیز گلبول‌های قرمز، هسته گلبول‌های سفید را نیز به رنگ بنفش - سیاه درمی‌آورد. برای انجام این آزمایش استفاده از ضدانعقاد هپارین توصیه نمی‌شود. محلول رنگی با استفاده از اسید استیک $2\% (20\text{mL/L})$ تهیه می‌شود که با اضافه نمودن چند قطره ویوله دوژانسین به رنگ بنفش درآمده است.

نکته

عدم دقت (CV) شمارش گلبول‌های سفید در نمونه طبیعی و غیرطبیعی بالا
 $6/5\%$ و در نمونه غیرطبیعی پایین 15% است.

روش آزمایش

برای انجام آزمایش، در لوله آزمایش پلاستیکی یا شیشه‌ای، 0.1 mL از خونی که به خوبی مخلوط شده به 0.9 mL محلول رقیق‌کننده اضافه می‌شود تا رقت $1/10$ ایجاد شود (مخلوط کردن ناکافی خون پیش از تهیه رقت، موجب خطای زیاد در نتیجه آزمایش می‌شود). پس از بستن دهانه لوله، با استفاده از مخلوط‌کننده‌های مکانیکی یا سروته نمودن آن با دست با زاویه 120° و چرخاندن هم‌زمان به مدت ۲ دقیقه، محتویات لوله کاملاً مخلوط می‌شود. با این کار، حباب‌های هوا نیز با محلول مخلوط می‌شوند. سپس، بلافاصله با استفاده از پیت یا لوله مویینه، فضای زیر لامل ضخیم در هماسیتومتر در یک مرحله از این مخلوط پرمی‌شود. به منظور ته‌نشین شدن سلول‌ها، هماسیتومتر باید به مدت ۲ دقیقه روی سطحی صاف، بدون لرزش و دور از نور خورشید و حرارت نگهداری و سپس، شمارش سلول‌ها انجام شود. گلبول‌های سفید باید در چهار مربع کناری و در دو طرف محفظه شمارش شوند. در این مربع‌ها، علاوه بر شمارش گلبول‌های داخل این فضا، گلبول‌هایی که روی اضلاع بالایی و سمت چپ هستند نیز شمارش می‌شوند؛ ولی گلبول‌های روی اضلاع سمت راست و پایینی مربع در شمارش به حساب نمی‌آیند.



تصویر شماره ۷: نمایی از فضاها هماسیتومتر به کار رفته برای شمارش گلبول‌های سفید

فصل سوم

روش‌های مرجع انجام آزمایش‌ها

در صورت ایجاد هریک از مشکلات زیر هنگام پرکردن هماسیتومتر، شمارش باید با استفاده از لام خشک و تمیز دیگری انجام گیرد:

- ◀ پرکردن بیش از حد اسلاید و سرریز شدن آن؛
- ◀ پرنشدن کامل محفظه‌ها از محلول؛
- ◀ ایجاد حباب هوا در هر قسمت محفظه؛
- ◀ هرگونه ذره اضافی در محفظه‌ها.

طبق توصیه سازمان جهانی بهداشت، حداقل ۱۰۰ گلبول سفید باید شمارش شود، ولی برای دستیابی به عدم دقت (CV) ۵٪، شمارش ۴۰۰ سلول الزامی است. برای به حداقل رساندن خطای ناشی از پراکندگی نامناسب سلول‌ها، توصیه می‌شود که شمارش گلبول‌های سفید در کل فضای خط‌کشی شده هماسیتومتر (۹ فضای ۱۰/۱۰۰) انجام گیرد. برای محاسبه تعداد گلبول‌های سفید می‌توان از فرمول زیر استفاده نمود:

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

برای مثال، اگر در ۹/۱۰۰ فضای خط‌کشی شده (۹ فضای خط‌کشی شده) ۴۲۰ گلبول سفید شمارش شود، تعداد کل گلبول‌های سفید به طریق زیر محاسبه می‌شود:

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

شمارش پلاکت

شمارش پلاکت‌ها روی خون وریدی حاوی ضدانعقاد EDTA انجام پذیر است. شمارش با استفاده از خون مویرگی نیز انجام می‌شود، ولی تعداد پلاکت‌ها نسبت به خون وریدی کمتر و شمارش آن نیز ناپایدارتر است؛ زیرا تعداد متفاوتی از پلاکت‌ها در محل سوراخ کردن پوست باقی می‌مانند.

روش آزمایش

محللول رقیق‌کننده حاوی اکسالات آمونیوم آبی ۱٪ (۱۰g/L) است که موجب لیز گلبول‌های قرمز می‌شود. پیش از تهیه رقت باید از نبود لخته در نمونه اطمینان حاصل کرد. در صورت وجود لخته، باید دوباره نمونه‌گیری انجام شود. برای تهیه رقت ۱/۲۰، ۱/۱mL خون کاملاً مخلوط‌شده با ۱/۹mL محللول رقیق‌کننده مخلوط می‌شود، این مخلوط باید به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه روی مخلوط‌کننده مکانیکی قرار گیرد. سپس، هماسیتومتر با روش ذکر شده برای شمارش گلبول‌های سفید از این مخلوط پر و برای ته‌نشین شدن پلاکت‌ها، حداقل ۲۰ دقیقه در ظرف پتری که کف آن کاغذ صافی مرطوب قرار دارد، نگهداری می‌شود. پس از گذشت مدت ذکر شده، پلاکت‌ها با میکروسکوپ شمارش می‌شوند. در صورت پایین بردن کندانسور میکروسکوپ، پلاکت‌ها به صورت ذرات کوچک درخشانی قابل رؤیت هستند. به‌طور معمول، پلاکت‌ها در مربع مرکزی هر محفظه شمارش می‌شوند، ولی شمارش پلاکت‌ها باید در یک یا بیشتر از فضاهای 1mm^2 (حجم $1/10\mu\text{l}$) انجام شود. برای دستیابی به عدم دقت ۸٪ تا ۱۰٪، شمارش حداقل ۲۰۰ پلاکت الزامی است.

$$\text{PLT/L} = \frac{10^6 \times 10^6 \times \text{ضریب رقت} \times \text{تعداد سلول‌های شمارش شده}}{\text{تعداد مربع‌های بزرگ شمارش شده}}$$

نکته

میزان ساخت محللول رقیق‌کننده در هر بار نباید از ۵۰۰mL بیشتر باشد و برای تهیه از ظرف‌های شیشه‌ای تمیز و آب مقطر یا دیونیزه استفاده شود. در صورت امکان، رقیق‌کننده با استفاده از فیلتر $22\mu\text{l}$ صاف و در یخچال نگهداری شود. در غیر این صورت، هر روز پیش از انجام آزمایش حجم مشخصی از آن با دور بالا سانتریفوژ شده و از محللول رویی برای رقیق کردن استفاده شود.

منابع خطا

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

۱. خطاهای تکنیکی

◀ خطاهای جمع‌آوری نمونه؛

◀ مخلوط نکردن کامل نمونه؛

فصل سوم

روش‌های مرجع انجام آزمایش‌ها

- ◀ بیپت کردن نادرست (استفاده از بیپت و هماسیتومتر غیر کالیبره و غیر استاندارد)؛
- ◀ استفاده از لامل عادی به جای ضخیم (سنگین)؛
- ◀ مخلوط نکردن کافی نمونه با رقیق کننده؛
- ◀ پرکردن نادرست اسلاید؛
- ◀ شمارش نادرست سلول‌ها.

۲. خطاهای ذاتی

این خطاها به پراکندگی غیریکنواخت سلول‌ها در نواحی مختلف اسلاید مربوط است که با مخلوط نمودن کافی محلول پیش از پرکردن محفظه‌های اسلاید نیز برطرف نمی‌شود. فقط شمارش سلول‌ها به تعداد زیاد می‌تواند این خطا را کاهش دهد. جدول زیر میزان پراکندگی نتایج شمارش دستی گلبول‌های سفید را در مقایسه با تعداد سلول‌های شمارش شده نشان می‌دهد. با افزایش تعداد سلول‌های شمارش شده، میزان پراکندگی نتایج کاهش می‌یابد.

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

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

منابع

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