آزمایشگاه مرجع سلامت

کنترل کیفیت در آزمایشگاههای تشخیص طبی
بخش انجام آزمایش(analytic phase)

پائیز ۱۳۸۶

ویرایش اول

مجموعه‌ای که در پیش رو دارید با موضوع تضمین کیفیت در آزمایشگاه با تاکید بر کنترل کیفیت در بخش انجام آزمـایش(آنالیتیـک) تـدوین و در آن مطالـب پایـه ماننـد کنتـرل کیفیت تجهیزات مورد استفاده در آزمایشگاه و کنترل داخلی کیفیـت بـصورت کـاربردی و خلاصه بیان شده است.

بدیهی است برای دستیابی به اطلاعات بیشتر می توان بـه مراجـع مـورد اسـتفاده کـه در انتهای دستورالعمل آمده است، مراجعه نمود.

فهرست **صفحه**

مقدمه ۵

فصل اول : کنترل کیفیت تجهیزات آزمایشگاهی

میکرو پیپت ۸

فتومتر ۱۴

سانتریفوژ ۱۸

بن ماری ۲۱

یخچال ۲۱

ترازو ۲۱

سیستمهای تخلیص آب ۲۲

میکروسکوپ ۲۴

فصل دوم : کنترل کیفیت آزمایشهای بیوشیمی و سایر آزمایشهای کمیquantitative

کنترل کیفیت آماری ۲۶

انتخاب مواد کنترلی ۲۶

خطای مجاز ۲۷

کلیات نمودار کنترلی ۲۹

اجرای گام به گام کنترل کیفیت آماری ۳۰

تفسیر نتایج ۳۳

چارت کنترلی Levey –Jenning ۳۳

چارت کنترلی با تفسیر قوانین چندگانه وستگارد ۳۴

قوانین WHO ۳۸

انواع خطا ۳۹

اقدام اصلاحی ۳۹

چارت کنترلی تجمعی Cumulative Sum (Cusum) Control chart ۴۱

کنترل کیفیت بر اساس نتایج بیماران ۴۳

نتایج هر بیمار بطور انفرادی ۴۳

هماهنگی با علائم بالینی ۴۳

هماهنگی با سایر نتایج آزمایشگاهی ۴۴

آزمایشهای مضاعف در آزمایشگاه ۴۴

دلتا چک با نتایج قبلی ۴۴

Limit check ۴۵

کنترل کیفیت بر اساس نتایج بیماران متعدد ۴۵

روشهای آماری برای پایش میانگین نتایج بیماران ۴۶

هماهنگی با علائم بالینی ۴۶

تجزیه‌گرهای خودکار ۴۷

فصل سوم : کنترل کیفیت آزمایشهای شایع خون‌شناسی

مقدمه ای براصول کنترل کیفی در آزمایشگاه خونشناسی ۵۰

اصول کار با دستگاههای شمارشگر سلولی اتوماتیک (سل کانتر) ۵۱

محلولهای سل کانتر ۵۱

کالیبراسیون سل کانتر ۵۲

کنترل کیفیت سل کانتر ۵۳

میکرو هماتوکریت ۵۷

آزمایشهای انعقادی ۵۸

فصل چهارم : کنترل کیفیت آزمایشهای میکروبشناسی

نگهداری و استفاده از سویه‌های باکتریایی ۶۱

تهیه نیم مک‌فارلند ۶۴

کنترل کیفیت دیسک های آنتی بیوتیک جهت انجام آزمایش تعیین حساسیت میکروبی به روش *disk diffusion agar* ۶۵

روش تعیین حجم لوپ ۶۸

اتوکلاو ۷۰

فور ۷۲

انکوباتور ۷۳

نکات مهم در کنترل کیفیت آزمایشهای انگل‌شناسی ۷۵

نکات مهم درکنترل کیفیت آزمایشهای کیفی Qualitative ۷۶

ضمائم ۷۷

مقدمه

هدف پزشک از درخواست آزمایش برای بیمار ، بررسی وضعیت پاتوفیزیولوژیک وی به منظور تشخیص، پیگیری یا درمان است. نتایج آزمایش زمانی می تواند در تصمیم گیری به پزشک کمک نماید که تاثیر خطاهای آزمایشگاه بر نتیجه نهایی ناچیز بوده و پاسخ آزمایش تنها نشانگر وضعیت بیولوژیک بیمار باشد .

برای اخذ نتیجه درست و قابل قبول و به حداقل رساندن خطاهای آزمایشگاه ، اجرای صحیح برنامه تضمین کیفیت ضروری می‌باشد. تضمین کیفیت طیف وسیعی از فعالیتها را در بر می‌گیرد که اجرای آنها در یک قالب منسجم منجر به رسیدن آزمایشگاه به کیفیت مطلوب می‌گردد.

عوامل بسیاری عملکرد آزمایشگاه را متاثر می سازند که برخی ازآنها عبارتند از :

- تغییرات بیولوژیک / فیزیولوژیک در بدن فرد
- مواد مداخله‌گر مانند داروها
- متغیرهای پیش از انجام آزمایش مانند جمع‌آوری ، انتقال، آماده‌سازی و نگهداری نمونه
- متغیرهای حین انجام آزمایش
- متغیرهای پس از انجام آزمایش

مجموعه فعالیتها باید طوری برنامه‌ریزی شوند که ۳ بخش اصلی پیش از انجام آزمایش(preanalytic)، انجام آزمایش (analytic)و پس از انجام آزمایش (post analytic) را در برگیرند.

بسیاری از مشکلات مهم آزمایشگاه در بخش **پیش از آزمایش** ایجاد می‌شوند که مثالهای 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 انجام آزمایش(مانند مواردی که برای جمع‌آوری ادرار ۲۴ ساعته یا مدفوع لازم است) ، نمونه‌گیری ناصحیح (ظرف یا نگهدارنده نامناسب ،آلودگی در زمان نمونه‌گیری، بستن تورنیکه به مدت طولانی، اندازه سوزن، شرایط خوابیده یا ایستاده و ...)، برچسب‌گذاری غلط، آماده‌سازی‌و نگهداری نامناسب (سانتریفوژ یا دمای نامناسب نگهداری ، ....)

برای جلوگیری از بروز این خطاها **لازم است دستورالعملهای پذیرش، نمونه‌گیری، انتقال و نگهداری نمونه ، به تفکیک نوع آزمایش (یا گروهی از آزمایشها که شرایط مشابه دارند) تهیه و ضمن آموزش کارکنان، در اختیار آنان قرار گیرد.**

ثبت غلط نتایج در برگه گزارش و جابجایی نتایج از جمله خطاهایی است که در **بخش پس از آزمایش** رخ می‌دهد و با آموزش کارکنان و کنترل نتایج به حداقل رسانده می شود.

خطاهایی که در بخش آزمایش(آنالیتیک) بروز می‌کنند مواردی مانند کالیبراسیون نامناسب سیستم، اشکال در روش آزمایشگاهی مورد استفاده و... می‌باشند.

موضوع اصلی این دستورالعمل ، خطاهای بخش آنالیتیک ، روش شناسایی و نحوه برخورد با این خطاها می‌باشد.

این مجموعه در بخشهای کنترل کیفیت تجهیزات آزمایشگاهی ، کنترل کیفیت در آزمایشهای بیوشیمی وسایر آزمایشهای کمی ، کنترل کیفیت در آزمایشهای خونشناسی ، کنترل کیفیت در آزمایشهای میکروب‌شناسی ، کنترل کیفیت آزمایشهای کیفی و انگل‌شناسی بهمراه ضمائم تدوین شده است.

توضیحات مربوط به تجهیزات و ابزار رایج مورد استفاده در آزمایشگاه در بخش کنترل کیفیت تجهیزات و دستگاههایی که عموما در بخشهای خاص کاربرد دارند، در فصول مربوطه آورده شده‌اند.

مطالب مربوط به کنترل کیفیت آزمایشهای کمی(quantitative) مندرج در فصل دوم ، قابل تعمیم به کلیه آزمایشهای کمی بوده و مطالب تکمیلی، در بخشهای مرتبط آمده است.

اضافه می‌نماید روشهای مربوط به کنترل کیفیت و نگهداری تجهیزات، کنترل داخلی کیفیت و نیز سوابق انجام این فعالیتها می‌بایست مطابق دستورالعمل مستندسازی، مکتوب و نگهداری گردد.

فصل اول :

کنترل کیفیت تجهیزات آزمایشگاهی

اولين قدم براي استفاده صحيح از تجهيزات آزمايشگاهي، مطالعه كامل كاتالوگها و عمل به دستورالعملهاي نگهداري و كنترل كيفيت مندرج در آن مي‌باشد. مطالبي كه در ذيل آمده است ، جنبه عام داشته و جايگزين دستورالعمل سازنده نمي‌باشد.

میکرو پیپت / سمپلر

چگونگی کاربری

پس از محکم کردن نوک سمپلر مناسب به سمپلر ، ابتدا دکمه کنترل / فشار(Control button/Push button) سمپلر را به آرامی تا توقف اول دکمه، پائین می آوریم ، در همان حال نوک سمپلر را چند میلیمتر(حدود ۳ میلی متر وبسته به حجم سمپلر) در مایع فرو برده و دکمه فشار را به آرامی رها می‌کنیم تا مایع وارد نوک سمپلر شود، برای تخلیه در لوله یا ظرف مورد نظر ، با فشار مجدد دکمه تا توقف اول، محلول را با تماس به جداره ظرف به آرامی خارج کرده و پس از ۳-۱ ثانیه با فشار تا توقف دوم ، باقیمانده محلول را نیز کاملاً خارج می‌نمائیم.

جهت رسیدن به حداکثر دقت و صحت برای سمپلرهای با حجم ۱۰ میکرولیتر و بیشتر ، توصیه می شود قبل از انتقال حجم نمونه ، ۲ الی۳ بار عمل برداشت و تخلیه از نمونه تکرار شده تا کاملا جدار داخلی نوک سمپلر به نمونه آغشته شود و سپس حجم مورد نظر از نمونه منتقل شود.

برای حجم های کمتر از ۱۰ میکرولیتر بهتر است، فقط یکبار برداشت با نوک سمپلر Unwetted Tip که خشک و بدون آغشتگی به نمونه باشد، انجام شده و پس از تخلیه در محل مورد نظر، جهت اطمینان از تخلیه کامل تمامی حجم درون نوک سمپلر، با محلول موجود در ظرف شسته شود.

باید در نظر داشت، عملکرد مطلوب سمپلر فقط با استفاده از سر سمپلر های نو و یکبار مصرف بدست می آید و از شستشو و استفاده مجدد از سر سمپلرها، می‌بایست خودداری نمود.

نکات مهمی که در کار با سمپلرمی‌بایست رعایت شود، عبارتند از :

۱- اطمینان از اتصال کامل نوک سمپلر به سمپلر
۲- عمود نگهداشتن سمپلر در زمان مکش
۳- تخلیه محلول با تماس نوک سمپلر به جداره ظرف تحت زاویه ۱۰ تا ۴۰ درجه
۴- رها کردن آرام دکمه در زمان پر یا خالی کردن محتویات نوک سمپلر
۵- کشیدن کناره های خارجی نوک سمپلر پس از انجام مکش به جداره های فوقانی لوله به منظور حذف قطرات خارجی نوک سمپلر یا در صورت نیازخشک کردن قطرات باقی مانده در بخش خارجی آن به کمک پارچه ای بدون پرز(البته باید مطمئن شد که پارچه چیزی از محتویات داخل نوک سمپلر را به خود جذب نکند)
۶- هنگام تخلیه محلول پس از توقف اول (پائین آوردن دکمه کنترل تا مرحله اول) باید کمی تامل کرد (۳-۱ ثانیه) و سپس دکمه را تا توقف دوم پائین آورد.

۷- درسمپلرهای متغیر (قابل تنظیم برای حجم های مختلف) توصیه می شود برای کاهش حجم و تنظیم حجم مورد نظر ، دکمه کنترل به آرامی تارسیدن به حجم انتخابی، چرخانده شود .

برای افزایش حجم بهتر است دکمه کنترل را تا کمی بیش از حجم مورد نظر پیچاند و بعد در خلاف جهت با کم کردن حجم به مقدار مورد نظر رسید.

کنترل کیفیت سمپلر(میکروپیپت):

اطمینان از کالیبراسیون صحیح میکرو پیپتها که ازطریق بررسی دقت و صحت عملکرد میکرو پیپت در برداشت حجم مورد انتظار حاصل میشود ، نقش مهمی در برنامه های تضمین کیفیت ایفامیکند. اگرچه این ارزیابی به دو روش توزین و رنگ سنجی قابل انجام است، ولی تحت شرایط موجود و به علت عدم دسترسی اغلب آزمایشگاهها به الزامات استفاده از روش توزین مانند ترازوهایی با درجه تفکیک (Resolution) مناسب برای کنترل سمپلر (درجه تفکیک ۰/۰۱ میلی گرم) و کالیبراسیون منظم ترازو ، استفاده از روش رنگ سنجی، توصیه می‌گردد.

بررسی دقت و صحت سمپلر بهتراست ۳ تا ۴ بار در سال انجام شود.

ارزیابی سمپلر (میکروپیپت) به روش رنگ سنجی

در این روش با استفاده از یک محلول رنگی با جذب پایدار، مثل رنگ سبز خوراکی در طول موج ۶۳۰-۶۲۰ نانومتر و یا پارانیتروفنل در طول موجهای ۴۰۱ یا ۴۰۵ نانومتر ، صحت عملکرد سمپلر ونیز قابلیت تکرار آن کنترل می شود.

مواد و ابزار مورد نیاز :

۱- ماده رنگی :

- رنگ سبز خوراکی

یا

- پارانیترو فنل Paranitrohenol (C6H5NO3), indicator PH(5.4-7.5) MERCK Art. 6798

(جذب نوری بدست آمده از پودر پارانیتروفنل (اندیکاتور) استفاده شده در این دستورالعمل با مقادیر قید شده برای Paranitrophenol High purity- NIST SRM 938 مندرج در کتاب Tietz 1999 قابل انطباق است.)

۲ - هیدروکسید سدیم ۰ / ۰۱ نرمال ،محلول کاری برای رقت سازی پارانیترو فنل .

Sodium hydroxide(NaOH) , Pure … MERCK Art. 6462.

۳- لوازم شیشه ای کلاس A با توجه به حجم مورد نیاز در تهیه غلظت محلول رنگی(از قبیل بالن ژوژه و پیپت)

۴- فتومتر دارای طول موجهای ۴۰۱یا ۴۰۵ برای پارانیترو فنل و ۶۲۰یا ۶۳۰ نانومتر برای رنگ سبز خوراکی

۵- لوله آزمایش

۶- ترازو (کالیبره و تحت کنترل)

۷- نوک سمپلر مناسب

۸- آب مقطر

نکته : طول موج انتخابی برای قرائت محلول پارانیتروفنل ۴۰۱ نانومتر است ولی امکان قرائت در ۴۰۵ نانومتر نیز وجود دارد.

روش کار :

همانطور که گفته شد انجام روش رنگ سنجی با استفاده از پودررنگ سبز خوراکی و نیز پارانیتروفنل امکانپذیر میباشد، لذا نحوه تهیه هردومحلول ذخیره (stock) ذیلا بیان شده است .قابل ذکر است درسالهای اخیر رنگ سبز خوراکی بعضا بصورت ناهمگون ویا محلول عرضه شده که در این موارد، دستورالعمل زیر کاربرد نداشته و بهتر است از پارانیترو فنل استفاده شود.

بطور معمول سمپلرها به سه گروه الف) ۱۰۰۰-۱۰۰ میکرولیتر ، ب) ۱۰۰-۱۰ میکرولیتر پ) حجمهای کمتر از ۱۰ میکرولیتر، تقسیم می شوند.

برای هریک از گروههای فوق می‌بایست باید یک محلول ذخیره از" رنگ "تهیه نمود . از آنجایی که اغلب فتومترها بهترین عملکرد خود را در محدوده جذبی ۴ /۰ نشان میدهند محلول های ذخیره رنگی با غلظتی تهیه میشوند که پس از مرحله رقیق شدن دارای جذبی در حدود ۰/۴ باشند.

۱-طرز تهیه محلول رنگی ذخیره رنگ سبز خوراکی برای هرگروه ازسمپلرها :

سمپلرهای گروه الف (۱۰۰۰-۱۰۰ میکرولیتر): ۱۵/۵ میلی گرم پودر رنگ سبزدر ۱۰۰ میلی لیترآب مقطر حل شود.(غلظت رنگ در محلول ذخیره این گروه، ۱۵/۵میلی گرم درصد است)

سمپلرهای گروه ب (۱۰۰-۱۰ میکرولیتر): ۱۵۵ میلی گرم پودر رنگ سبز در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شود.(غلظت رنگ در محلول ذخیره این گروه، ۱۵۵میلی گرم درصد است)

سمپلرهای گروه پ (سمپلرهای کمتر از ۱۰ میکرولیتر) : ۱/۵۵ گرم از پودر رنگ سبز در ۱۰۰ میلی لیتر آب حل شود. (غلظت رنگ در محلول ذخیره این گروه ۱/۵۵ گرم درصد یا۱۵۵۰میلیگرم درصد است)

۲ -طرز تهیه محلول رنگی ذخیره پارانیتروفنل برای هر گروه از سمپلرها :

سمپلرهای گروه الف (۱۰۰۰-۱۰۰ میکرولیتر): ۴۲ میلی گرم پودر پارانیتروفنل، در یک لیتر آب مقطر، حل می‌شود. .(غلظت رنگ در محلول ذخیره این گروه، ۴۲میلی گرم درلیتر است)

سمپلرهای گروه ب (۱۰۰-۱۰ میکرولیتر): ۴۲ میلی گرم پودر پارانیتروفنل، در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر، حل می‌شود. .(غلظت رنگ در محلول ذخیره این گروه، ۴۲میلی گرم درصد است)

سمپلرهای گروه پ (سمپلرهای کمتر از ۱۰ میکرولیتر) : ۴۲۰میلی گرم پودر پارانیتروفنل ، در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر، حل می‌شود. .(غلظت رنگ ذخیره این گروه، ۴۲۰میلی گرم درصد است)

ارزیابی دقت

برای بررسی دقت عملکرد سمپلر وبعبارتی سنجش مقدار عدم دقت یا قابلیت تکرار، ابتدا محلول ذخیره رنگی مناسب طبق روش ذکرشده و باتوجه به حجم سمپلر مورد کنترل، تهیه می گردد سپس ده لوله در جالوله ای چیده و با استفاده از پی پت کلاس A و بر مبنای جدول (۱-۱) مقدار مشخص آب مقطر(در صورت استفاده از رنگ سبز) ویا

سود ۰/۰۱ نرمال(در صورت استفاده از پارانیتروفنل)، با دقت بسیار زیاد در هر لوله ریخته می شود. سپس با استفاده از سمپلر مورد کنترل ، از محلول ذخیره رنگی برداشت شده و به هر لوله اضافه می شود . پس از مخلوط کردن، میزان جذب نوری لوله ها در مقابل بلانک مناسب(آب مقطربرای سبز خوراکی وسود برای پارانیتروفنل)قرائت می‌گردد .همانگونه که قبلا ذکر شد طول موج انتخابی برای قرائت جذب نوری رنگ سبز خوراکی ۶۲۰ یا۶۳۰ نانومتر وبرای پارانیتروفنل ۴۰۱ یا۴۰۵ نانومتر میباشد.

توجه : در صورت استفاده از محلول ذخیره پارانیترو فنل ، رقتهای مورد نیاز طبق جدول ۱ میباید در سود ۰/۰۱ نرمال تهیه شود . در حالیکه برای رنگ سبز خوراکی از آب مقطر استفاده می‌شود.

جدول (۱-۱)

گروه سمپلر	حجم سمپلر مورد کنترل برحسب میکرولیتر	آب مقطر یاسود ۰/۰۱ نرمال برداشتی توسط پی پت برحسب میلی لیتر	حجم رنگ برداشتی از محلول ذخیره توسط سمپلر برحسب میکرولیتر	رقت حاصله
گروه پ	۵	۵	۵	۱/۱۰۰۱
گروه ب	۱۰	۱	۱۰	۱/۱۰۱
گروه ب	۲۰	۲	۲۰	۱/۱۰۱
گروه ب	۲۵	۲/۵	۲۵	۱/۱۰۱
گروه ب	۵۰	۵	۵۰	۱/۱۰۱
گروه ب	۱۰۰	۱۰	۱۰۰	۱/۱۰۱
گروه الف	۲۰۰	۲	۲۰۰	۱/۱۱
گروه الف	۵۰۰	۵	۵۰۰	۱/۱۱
گروه الف	۱۰۰۰	۱۰	۱۰۰۰	۱/۱۱

سپس میانگین و انحراف معیارخوانده های جذب نوری(OD) ۱۰لوله ، محاسبه و ضریب انحراف خوانده‌ها (CV%) بدست می‌آید.

$$mean = \frac{\sum x_i}{n}$$

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

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

CV : ضریب انحراف (Coefficient of variation)

SD: انحراف معیار

mean : میانگین جذب نوری لوله‌ها

n : تعداد خوانده‌ها

x_i: جذب نوری هر لوله

در صورت انتقال صحیح حجم آب ویا سود ، اختلاف در جذب نوری لوله های حاوی محلول رنگی به اختلاف در حجم برداشت شده توسط سمپلر، نسبت داده شده و درصد ضریب انحراف خوانده‌ها (CV%) معرف قابلیت تکرارپذیری و مقدار عدم دقت سمپلر خواهد بود.

ارزیابی صحت

جهت کنترل صحت عملکرد سمپلر و تهیه معیار سنجش صحت در روش رنگ سنجی ، باید با استفاده از ابزار شیشه ای کالیبره، محلولی دارای رقت مشابه با رقت تهیه شده توسط سمپلر تهیه شود. (۱/۱۰۰۱) یا(۱/۱۰۱) ویا(۱۱ /۱)

بدین منظور با پی پت کلاس A، مقداری از محلول رنگی ذخیره (متناسب با گروه حجمی سمپلرو طبق روش ذیل)، به بالن ژوژه کلاس A ای که تا خط نشانه از آب مقطر پر شده اضافه میشود .

روش تهیه محلولهای کنترل صحت :

کنترل صحت گروه پ (سمپلرهای کمتر از ۱۰ میکرولیتر) رقت ۱/۱۰۰۱:

بالن ژوژه یک لیتری را برای سبز خوراکی با آب مقطر و برای پارانیتروفنل با سود ۰/۰۱ نرمال به حجم رسانده سپس با پی پت کلاس A ، ۱ میلی لیتر از رنگ ذخیره (گروه پ) به آن اضافه و مخلوط نمائید.

کنترل صحت گروه ب (سمپلرهای ۱۰- ۱۰۰) رقت ۱/۱۰۱ :

بالن ژوژه ۱۰۰ میلی لیتری را برای سبز خوراکی با آب مقطر و برای پارانیتروفنل با سود ۰/۰۱ نرمال به حجم رسانده سپس با پی پت کلاسA ، ۱میلی لیتر از رنگ ذخیره (گروه ب) به آن اضافه و مخلوط نمائید .

کنترل صحت گروه الف (سمپلرهای ۱۰۰-۱۰۰۰) رقت ۱/۱۱ :

بالن ژوژه ۱۰۰ میلی لیتری را برای سبز خوراکی با آب مقطر و برای پارانیتروفنل با سود ۰/۰۱ نرمال به حجم رسانده سپس با پی پت کلاس A ، ۱۰میلی لیتر از رنگ ذخیره (گروه الف) به آن اضافه و مخلوط نمائید.

نکته : هرگاه برای اضافه کردن ۱۰میلی لیتر رنگ، در بالای خط نشانه فضای خالی وجود نداشت ، تاجائیکه امکان دارد از حجم ۱۰میلی لیتر به بالن اضافه نموده و بقیه را به داخل بشر منتقل میکنیم . پس از مخلوط نمودن کامل محتویات بالن ژوژه ، همه حجم را به بشر اضافه نموده و با محتویات بشر ، بالن ژوژه را چند بار شستشو میدهیم.

پس از اطمینان از یکنواختی محلول صحت تهیه شده ، محلول حداقل در سه لوله ریخته و جذب نوری هر سه لوله قرائت می‌شود . میانگین خوانده ها بعنوان معیار مقایسه صحت دربررسی صحت عملکرد سمپلر استفاده میشود .

شاخصه صحت (Bias) است که از فرمول زیر بدست می آید:

$$Bias\,\% = \frac{\exp ected - observed}{\exp ected} \times 100$$

expected : میانگین جذب نوری ۳خوانده ازمحلول تهیه شده در بالن ژوژه

observed : میانگین جذب نوری ۱۰ لوله که در مرحله ارزیابی عدم دقت بدست آمده است.

توجه : به منظور به حداقل رساندن عوامل ایجاد خطا بهتر است بررسی دقت و صحت در یک روز انجام گیرد .

مقادیر مجاز عدم دقت و عدم صحت :

اولین معیار مقایسه برای کنترل کیفیت سمپلرها، میزان ادعا شده توسط سازندگان سمپلر برای **Inaccuracy (Bias)** و **Imprecision** (CV%) میباشد . چرا که بدنبال ارتقای فنآوری ابزار آزمایشگاهی و بهبود کیفیت عملکرد ابزار ، مقادیر عدم صحت و عدم دقت ادعائی سازند گان میکرو پیپتها نیز بسیار کاهش یافته است .

با توجه به مختصات کیفیتی بسیاری از میکرو پیپتها ، حداکثر میزان قابل قبول عدم دقت CV%= ٪۲ و حداکثر میزان قابل قبول عدم صحت Bias% = ٪۳ پیشنهاد میشود .

نکته: معیارهای یاد شده که با توجه به تنوع سمپلرهای مورد استفاده آزمایشگاهها انتخاب شده است، اگرچه از معیارهای مجاز اعلام شده قبلی کوچکتر میباشد ولی هنوز با میزان قابل قبول برخی مراجع بین المللی فاصله زیادی دارد.

تنظیم

در برخی از انواع سمپلرها که حجم ثابتی را برداشت می‌نمایند(سمپلرهای Fixed Volume) در صورت وجود Bias غیرقابل قبول، می‌توان با استفاده از اطلاعات مندرج درراهنمای سمپلر، حجم برداشتی را تصحیح نمود.

در مورد تنظیم سمپلرهای متغیر باید توجه داشت که هرگونه تغییر در حجمهای مختلف ، به میزان ثابت اعمال میشود . بدین معنی که تغییر ۱ میکرو لیتر در حجم ۱۰۰میکرولیتر (۱٪ تغییر) ، در حجم ۱۰ میکرولیترنیز باعث ۱ میکرو لیتر تغییر، (یعنی ۱۰٪ تغییر) خواهد شد. لذا بهتر است عمل تنظیم کالیبراسیون توسط شرکت معتبر انجام شود.

نحوه نگهداری سمپلر:

نگهداری سمپلر بر اساس دستورالعمل سازنده انجام می‌پذیرد ولی مطالب ذیل در موردبیشتر انواع سمپلر صادق می‌باشد.

- کلیه قسمت های خارجی اغلب سمپلرها را می توان با محلول صابون تمیز کرد و پس از آبکشی با آب مقطر در دمای اتاق خشک نمود.
- برای ضدعفونی کردن ، محلول ۶۰٪ ایزوپروپانل توصیه می شود. برخی از انواع سمپلر نیز قابل اتوکلاو هستند.
- پس از شستشوی سطوح خارجی و تمیزکردن بخش نگهدارنده نوک سمپلر "Tip holder" (که به کمک میله همراه یا با سوآب آغشته به اتانل ۷۰ درجه انجام می گیرد) باید پیستون با مقدار کمی از روغن همراه سمپلر،که اغلب Silicone grease میباشد ، روغن کاری شود.
- برای تمیز کردن قسمتهای داخلی سمپلر باید به راهنمای همراه سمپلر مراجعه شود.

نکات مهم :

۱- ضربه به سمپلر می تواند این وسیله را از کالیبراسیون خارج نماید.

۲-با انتخاب سر سمپلر مناسب، حجم محلول برداشتی باید در حدی باشد که مایع وارد قسمتهای داخلی نگردد.

۳- تماس دست با نوک سمپلر آلوده ممنوع است.
۴- در صورت مکش محلول های اسیدی و سایر مواد با خاصیت خورندگی باید بخش نگهدارنده نوک سمپلر (Tip-holder) باز شده و پیستون و حلقه پلاستیکی (O-ring) بخوبی با آب مقطر شسته شود.
۵- هرگز نباید سمپلر حاوی محلول به پهلو روی میز گذاشته شود.
۶- هرگز نباید سمپلرهای متغیر را بر روی حجمی خارج از محدوده حجم ادعائی آن تنظیم کرد.

اسپکتروفتومتر و فتومتر

مهمترین مواردی که در اسپکتروفتومترها مورد ارزیابی قرار می‌گیرند عبارتند ازخطی بودن ، صحت فتومتریک، صحت طول موج ، رانش و نورهای ناخواسته

۱ -خطی بودن Linearity

هدف از این آزمون تعیین محدوده ای است که در آن ارتباط خطی بین نور جذب شده و خوانش فتومتر وجود دارد. در این آزمایش میزان عدم صحت جذب نوری در هر رقت بررسی می شود.

برای این ارزیابی از محلولهای مختلفی می توان استفاده نمود که می بایست تا حد امکان پایدار باشند. بعلت تاثیر متغیرهایی از قبیل خطای رقت ، کاهش پایداری ، تغییراتpH و تاثیرات دما در محلولها، باید در استفاده از این روش ، عوامل یاد شده را تحت کنترل گرفت.

در صورت امکان، استفاده از فیلترهای شیشه‌ای solid glass filter مانند دیدمیوم، جایگزینی برای روش قبل میباشد (این فیلترها از طریق شرکتهای پشتیبان قابل دستیابی است)

بررسی خطی بودن با استفاده از محلول در طول موجهای مختلف :

برای بررسی خطی بودن در طول موج ۵۴۰ نانومتر از محلول HiCN ، در طول موج ۴۰۵ نانومتر از محلول پارانیتروفنل ۰/۰۸ میلی مول در لیتر و در طول موج ۳٤۰ نانومتر از محلول دی‌کرومات پتاسیم استفاده می گردد.

جهت بررسی خطی بودن طول موج ۵۴۰ نانومتر ، می بایست با مخلوط نمودن خون با درابکین ، ذخیره ای (Stock) از محلول سیان مت هموگلوبین با جذب نوری حدود ۲ تهیه شود .(بطور مثال از اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر خون با هموگلوبینg/l ۱۷۰ به ۵ میلی لیتر درابکین ، محلولی با جذب نوری حدود ۲/۰۹ بدست می آید .) اگر میزان هموگلوبین نمونه کم باشدحجم بیشتری از خون ، می بایست به درابکین اضافه شود. سپس از این محلول ذخیره ، حداقل ۴ رقت تهیه می شود (بطور مثال ۱/۲ ، ۱/۴، ۱/۸ و۱/۱۶) و جذب نوری محلول ذخیره و رقتهای تهیه شده در طول موج یاد شده در مقابل بلانک درابکین، قرائت می‌گردد تا ۵ خوانده بدست آید . جذبهای نوری قرائت شده به عنوان مقدار مشاهده شده (Observed) در نظر گرفته می‌شود .

برای محاسبه میزان خطا در هر رقت ،جذب نوری(OD) رقتی از محلول که در حدود ۰/۴ باشد به عنوان مبنا انتخاب و میزان خطای سایر رقتها با توجه به آن محاسبه می شود تا جذب مورد انتظار بدست بیاید .

بطور مثال اگر جذب نوری نمونه با رقت ۱/۴ ، حدود ۰/۴ باشد .جذب نوری مورد انتظار برای رقت ۱/۲ بصورت زیر محاسبه می شود :

رقت	جذب نوری
۱/۴	۰/۴
۱/۲	x

مقدار X بدست آمده ، مقدار مورد انتظار (Expected) جذب نوری نمونه در رقت ۱/۲ می باشد. بدین ترتیب پس از محاسبه جذب نوری مورد انتظار برای رقتهای مختلف ، میزان عدم صحت هر رقت با استفاده از فرمول Bias تعیین می‌گردد .

$$Bias = \frac{\exp ected - obsereved}{\exp ected} * 100$$

مثال زیر ، میزان عدم صحت جذب نوری رقتهای مختلف نمونه سیان مت هموگلوبین در یک دستگاه فتومتررا نشان می دهد .

جدول۲-۱

(OD expected) جذب مورد انتظار	(OD observed) جذب نوری بدست آمده	%Bias
2.075	2.094	0.91
1.66	1.663	0.18
1.245	1.259	1.12
1.037	1.017	1.97
0.83	0.826	0.48
-	0.415	-
0.207	0.212	2.1

<u>برای بررسی خطی بودن در طول موج ۴۰۵ نانومتر</u> از محلول پارانیتروفنل ۰/۰۸ میلی مول در لیتر استفاده می‌گردد . طرز تهیه این محلول:

وزن یک مول پارانیتروفنل = ۱۳۹/۱۱ گرم

یک میلی مول =۰/۱۳۹۱۱ گرم

برای تهیه پارانیتروفنل ۰/۰۸ میلی مول در لیتر ، با استفاده از محاسبه زیر ، می بایست ۱۱/۱۱۲۸۸ پارانیتروفنل (بطور تقریبی ۱۱/۱ میلی گرم) در یک لیتر هیدروکسید سدیم (Na OH) ۰/۰۱ نرمال حل شود.

$0.13911 \times 0.08 = 0.0111288$ گرم = 11.11288 میلی‌گرم ~ 11.1 میلی‌گرم

این محلول جذبی در حدود ۲ خواهد داشت و با تهیه رقتهای مختلف در سود(Na OH) ۰/۰۱ نرمال می‌توان خطی بودن در محدوده جذب 0.1 تا 2 را در طول موج ۴۰۵نانومتر و در مقابل بلانک سود، بررسی نمود.بطور مثال با تهیه محلولهایی با غلظت 0.06 ، 0.04 ، 0.02 ، 0.01 و 0.005 میلی مول در لیتر نتایج زیر بدست آمده و Bias محاسبه گردیده است.

همانطور که قبلا گفته شد جذب نوری حدود 0.4 را ملاک قرار داده و با تناسب مانند مثال زیر جذب نوری مورد انتظار هر غلظت را محاسبه نمایید.

غلظت	جذب نوری
0.02	0.463
0.04	x

جدول۳-۱

غلظت محلول پارانیتروفنل µmol/L	جذب نوری مورد انتظار	جذب نوری بدست آمده	Bias %
0.08	1.852	1.908	3
0.06	1.389	1.418	2
0.04	0.926	0.937	1.2
0.02	–	0.463	–
0.01	0.231	0.225	2.6
0.005	0.116	0.113	2.6

برای بررسی خطی بودن درطول موج ۳۴۰نانومتر از محلول دی‌کرومات پتاسیم استفاده می‌شود.

برای تهیه محلول، پودر دی‌کرومات پتاسیم را در oven با حرارت ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یکساعت خشک کرده و 200 میلی‌گرم آن را با اسید سولفوریک ۰/۰۱ نرمال به حجم ۱ لیتر برسانید. این محلول را بعنوان ذخیره در شیشه تیره نگهداری نمائید. محلول ذخیره جذبی در حدود ۲ خواهد داشت و با تهیه رقتهای مختلف در اسید سولفوریک ۰/۰۱ نرمال، می‌توان خطی بودن در محدوده جذب 0.1 تا 2 را در مقابل بلانک اسید سولفوریک، درطول موج ۳۴۰ نانومتر بررسی نمود. بطور مثال با تهیه محلولهایی با غلظت 200 ، 150 ، 100 ، 50 ، 25 و 10 میلی گرم در لیتر نتایج زیر بدست آمده و Bias محاسبه گردیده است.

مشابه مثال قبل جذب نوری حدود 0.4 را ملاک قرار داده و با تناسب مانند مثال زیر جذب نوری مورد انتظار هر غلظت را محاسبه نمایید.

غلظت	جذب نوری
50	0.493
25	x

جدول۴-۱

غلظت محلول دی‌کرومات پتاسیم mg/L	جذب نوری مورد انتظار	جذب نوری بدست آمده	Bias %
200	1.972	2.007	1.8
150	1.479	1.486	0.5
100	0.986	0.991	0.5
50	–	0.493	-
25	0.247	0.245	0.8
10	0.099	0.095	4

میزان عدم صحت مجاز در هر رقت حداکثر ۵٪ پیشنهاد می‌شود . ولی بهتر است این مقدار را براساس دستورالعمل سازنده تعیین نمود.

۲-صحت فتومتریک

بررسی صحت فتومتری با استفاده از محلول دی کرومات پتاسیم : بیش از ۵۰ میلی گرم از دی کرومات پتاسیم را به مدت یکساعت در درجه حرارت ۱۱۰ درجه سانتی گراد قرارداده تا خوب خشک شود. سپس با ترازوی کالیبره، دقیقاً ۵۰ میلی گرم از ماده فوق برداشته و در یک لیتر اسید سولفوریک ۰/۰۱ نرمال حل میگردد . سپس اسپکتروفوتومتر توسط بلانک اسید سولفوریک ۰/۰۱ نرمال در طول موج ۳۵۰ نانومتر صفر شده و جذب نوری محلول دی کرومات پتاسیم در اسید سولفوریک قرائت می‌گردد . جذب نوری در **محدوده ۰۰۵ /۰ ± ۰/۵۳۶** نشاندهنده صحت فتومتریک دستگاه می‌باشد.

نکته : بررسی صحت فتومتری با استفاده از روش گفته شده برای فتومتر امکانپذیر نمی‌باشد(بعلت عدم دسترسی به طول موج ۳۵۰ نانومتر). این بررسی می‌بایست با استفاده از محلولها یا فیلترهای مناسب و توسط شرکتهای پشتیبان ، انجام گردد.

(مواد استاندارد مرجع SRM جهت کالیبراسیون و تائیدیه عملکرد اسپکتروفتومتر و فتومتر توسط انستیتوی مواد مرجع و روشها در اروپا IRMM و انستیتوی ملی استاندارد و تکنولوژی امریکامعرفی شده است www.irmm.jrc/bc. www.nist.gov)

۳-صحت طول موج

ارزیابی صحت طول موج به منظور ارزیابی ادعای سیستم درتاباندن طول موجی است که دستگاه برای آن تنظیم شده است .

راحتترین و قابل دسترس ترین روش برای اسپکتروفتومترهایی که با نور مرئی کار می کنند، استفاده از محلول سیان‌مت‌هموگلوبین (۲۰ میکرولیتر خون و ۵ میلی لیتر درابکین) بوده که دارای حداکثر جذب نوری در طول موج ۵۴۰ نانومتر است .ابتدا با محلول درابکین به عنوان بلانک دستگاه را صفر کرده و سپس جذب نوری نمونه در طول موج ۵۳۰ ، ۵۳۵، ۵۴۰ ، ۵۴۵ و ۵۵۰ نانومتر قرائت می‌گردد.(لازم بذکر است پس از هر تغییر طول موج ، باید جذب نوری دستگاه با

محلول بلانک صفرگردد .) بر اساس طول موج و میزان جذب ،یک منحنی رسم می‌گردد که در صورت وجود صحت طول موج ، حداکثر جذب نوری را در ۵۴۰ نانومترنشان خواهد داد.

نکته : بررسی صحت طول موج با استفاده از روش گفته شده برای فتومتر امکانپذیر نمی‌باشد. این بررسی می‌بایست با استفاده از محلولها یا فیلترهای مناسب و توسط شرکتهای پشتیبان ، انجام گردد.

۴-آزمون رانش فوتومتری (Drift)

یکی از منابع اصلی خطا در اسپکتروفتومتری ، که به علت فرسودگی شدید منبع نوری رخ می‌دهد، عدم پایداری مقدار جذب خوانش شده درطول زمان می‌باشد.

برای بررسی ، ابتدا دستگاه را با درابکین صفر نموده و پس از ریختن محلول سیان مت هموگلوبین در کووت و بستن درب آن با پارافیلم ، جذب نوری این محلول هر۵ تا ۱۵ دقیقه یکبار (بمدت یکساعت) قرائت می گردد. حداکثر تغییر مجاز در جذبهای نوری قرائت شده طی این مدت 0.005 ± می‌باشد .

بعنوان مثال اگرجذب محلولی در ابتدا 1.259باشد در مدت یکساعت می‌تواند در محدوده 0.005 ±1.259 تغییر نماید.

۵-نورهای ناخواسته (Stray light)

نورهای ناخواسته ، نورهایی هستند که غیر از نور عبور داده شده از منوکروماتور ، به نمونه تابیده می شوند. برای اینکار محلولی که نور را بطور کامل جذب می‌کند (مثل استن یا نیتریت سدیم در طول موجهای خاص) در مسیر عبور نور قرار داده می‌شود . در این حالت می‌بایست ترانس‌میتانس 0 ٪ (جذب بی‌نهایت و غیر قابل خوانش) باشد زیرا نور از محلول عبور نکرده و به دتکتور نمی‌رسد.

برای بررسی انوار ناخواسته محلول آبی ۵۰گرم در لیتر سدیم نیتریت تهیه و در مقابل بلانک آب مقطر در طول موج ۳۰۰ تا ۳۸۵ نانومتر خوانش می شود. ترانس میتانس میباید T=٪ 0 باشد.

توجه : آزمایشگاههایی که از فتومتر استفاده می‌نمایند ، ازبین پارامترهای گفته شده تنها می‌توانند خطی بودن، رانش فتومتری و انوار ناخواسته را بررسی نمایند. سایر موارد ذکر شده و همچنین دمای محفظه باید از طریق شرکت پشتیبان بررسی شود.

سانتریفوژ

سانتریفوژ نمودن یکی از روشهای جدا سازی است که در آن با استفاده از نیروی گریز از مرکز، قسمتهای سبکتر یک محلول ، مخلوط ویا سوسپانسیون ، از قسمتهای سنگینترآن جدا میشود .

اساس عمل سانتریفوژ، حرکت دورانی حول یک محور ثابت است . نیروی سانتریفوژ یا Relative Centrifugal Force(RCF)بستگی به شعاع و و سرعت دوران داشته ، با فرمول زیر محاسبه و واحد آن نیز بر اساس ضریبی از g (gravity) بیان میشود . (بطور مثال۵۰۰× g)

$RCF = 1.118 \times 10^{-5} \times r \times (rpm)^2$

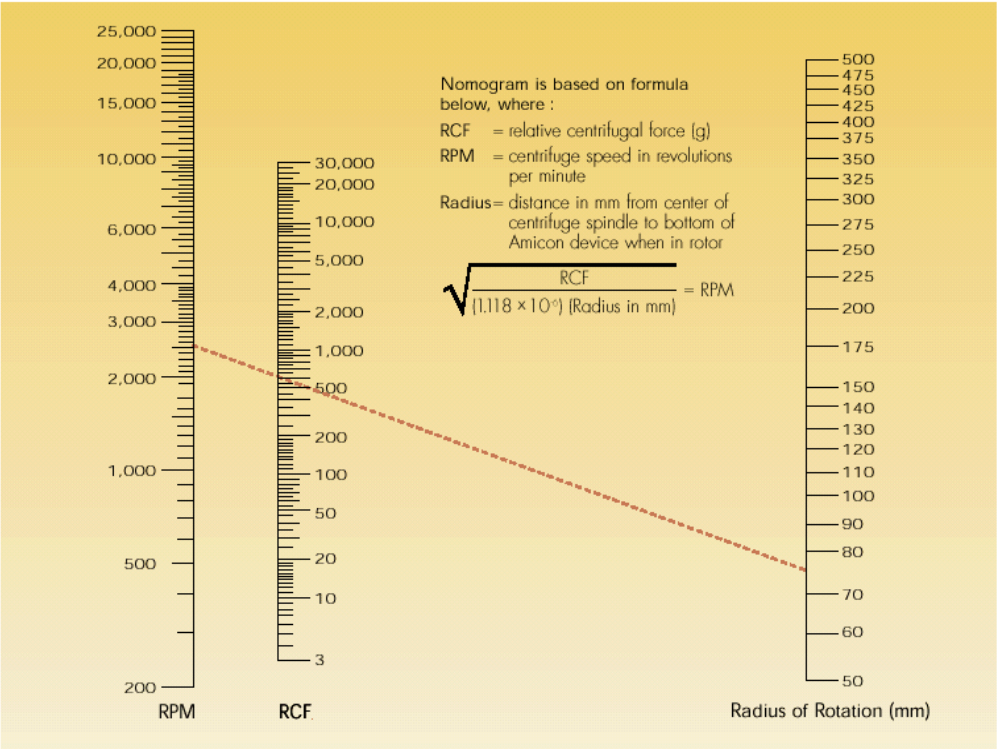
1.118×10^{-5} مقدارتجربی قراردادی

r = شعاع سانتریفوژ برحسب سانتیمتر

مقدارشعاع، از مرکز چرخش سانتریفوژ (محور) تا انتهای لوله درون سانتریفوژاندازه گیری میشود

rpm = سرعت چرخش برحسب دور در دقیقه

نیروی سانتریفوژ RCF را میتوان به وسیله نموگرام نیز تعیین نمود



در این حالت با کشیدن خطی که از شعاع سانتریفوژ و g مورد انتظار عبور می‌کند و ادامه آن، سرعت بدست می‌آید. بعنوان مثال در شکل فوق برای بدست آوردن قدرت 500g در سانتریفوژی که شعاع آن ۷۵ میلی‌متر است، لازم است سرعت روی ۲۵۰۰ دور در دقیقه تنظیم گردد.

انواع سانتریفوژ :

سانتریفوژ های شناور (Horizontal- head /Swinging- bucket) و سانتریفوژ های زاویه ثابت ، انواعی از سانتریفوژ هستند که بیشتر در آزمایشگاههای تشخیص طبی استفاده میشوند .

در سانتریفوژ های شناور، لوله ها در حالت توقف وضعیت عمودی و در حال حرکت وضعیت افقی دارند.

در سانتریفوژهای زاویه ثابت ، لوله ها در همه حال دارای زاویه ثابت نسبت به محور سانتریفوژ می‌باشند. سرعت این نوع سانتریفوژ ، می‌تواند نسبت به مورد قبلی بیشترباشد ولی در زمان چرخش بعلت مقاومت به هوا ، درون آن گرمای بیشتری ایجاد شده و دما بالا می‌رود.

انتخاب سانتریفوژ در آزمایشگاه باید با توجه به نوع مصرف (مانند سرعت مورد نیاز، حداکثر دمای قابل قبول و...) و نیز مختصات فنی مندرج در کاتالوگ دستگاه صورت گیرد.

نکات مهم در استفاده از سانتریفوژ :

- در کار روزانه نباید سانتریفوژ را با درب باز به کار انداخت .
- استفاده از لوله های مناسب و توصیه شده سازنده و رعایت توازن لوله‌ها و حجم نمونه‌ها هنگام استفاده از سانتریفوژ از نکات اساسی در استفاده صحیح سانتریفوژ میباشد . بطور معمول وزن لوله های حاوی نمونه که مقابل هم قرار گرفته‌اند نباید بیش از ۱٪ متفاوت باشند. وزن مجموع لوله‌های حاوی نمونه نباید از وزن تعیین شده سازنده برای سرعت خاص ، تجاوز نماید .
- لازم است درب لوله‌های حاوی خون قبل از سانتریفوژ بسته شود تا از پخش آئروسل در محیط جلوگیری گردد . از استفاده از اپلیکاتورهای چوبی جهت خارج کردن لخته قبل از عمل سانتریفوژ به علت افزایش احتمال همولیز باید خودداری شود .

نگهداری و کنترل کیفیت سانتریفوژ :

تمیز نگهداشتن سانتریفوژ در کاهش انتشار آلودگی ها بسیار مهم است و باید در فواصل زمانی مشخص انجام شود .

برای کنترل کیفیت سانتریفوژ لازم است موارد زیر بررسی گردد:

سرعت سانتریفوژ : ابزار سنجش سرعت سانتریفوژ، تاکومتر است .سرعت سانتریفوژ باید حداقل هر سه ماه یکبار بررسی شده و میزان سرعت اندازه گیری شده نباید بیش از ۵٪ با سرعت مورد انتظار (سرعت انتخابی هنگام کار با سانتریفوژ) متفاوت باشد . برای بررسی سرعت سانتریفوژ با تاکومتر مراحل زیر انجام میشود :

- قفل سانتریفوژ را در حالتی قرار دهید که در حال باز بودن در ، چرخش انجام شود.
- کاغذ مخصوص همراه تاکومتر را نزدیک مرکز محور سانتریفوژ (نه در روی مرکز محور) بچسبانید. این کار باعث می‌شود در هر بار چرخش ، نور یکبار از کاغذ مخصوص به تاکومتر باز تابیده شود.
- سانتریفوژ را با دور مورد نظر تنظیم نموده و روشن کنید.
- تاکومتر را در فاصله مناسب نسبت به کاغذ نشاندار نگهداشته و آنرا روشن کنید.
- هنگامیکه عدد نمایش داده شده روی تاکومتر ثابت ماند ، آن را یادداشت نموده با سرعت انتخاب شده اولیه مقایسه نمائید .

زمان سنج سانتریفوژ: بهتر است زمان سنج بصورت هفتگی در مقابل زمان سنج کالیبره مورد بررسی قرار گیرد. برای این امر زمان‌سنج را در زمانهای مختلف تنظیم وبا کرونومتر مقایسه کنید . اعداد حاصله نباید بیش از ۱۰٪ با زمان مورد انتظار متفاوت باشد.

کنترل دما : برخی سانتریفوژ ها هنگام کار ایجاد حرارت زیاد در محفظه داخل سانتریفوژ مینمایند و این دما میتواند بر کیفیت نمونه و غلظت کمیت های آن تاثیر گذار باشد لذا هنگامی که اندازه‌گیری کمیتی مورد نظر است که به دما حساس میباشد، بهتر است از سانتریفوژ یخچال دار استفاده شود . برای کنترل دما ،می‌توان در لوله آزمایش ، آب مقطر ریخته و دمای آنرا تعیین نمود. سپس لوله در سانتریفوژ قرار گرفته و دستگاه با دور مشخص روشن می‌شود . پس از مدت مقرر ، دمای آب داخل لوله مجددا اندازه گیری می شود . دمای سانتریفوژهای یخچال دار میباید هر ماه بررسی شده و میزان دمای اندازه گیری شده نباید بیش از ۲ درجه سانتی گراد با دمای مورد انتظار متفاوت باشد .

بن ماری

برای انجام آزمایش در محیط مرطوب و دمای خاص از بن ماری استفاده می‌شود. برای استفاده مناسب از بن‌ماری باید به موارد زیر توجه داشت.

۱- سطح آب در بن ماری باید بالاتر از سطح مایعات انکوبه شده باشد.

۲- آب بن‌ماری باید مرتبا تعویض گردد تا از رشد میکروبها جلوگیری بعمل آید.

۳- برای جلوگیری از ایجاد رسوب بهتر است از آب مقطر برای پر کردن بن‌ماری استفاده شود. در صورت ایجاد رسوب می توان از اسید کلریدریک رقیق برای ازبین بردن رسوبها استفاده نمود.

۴- برای اطمینان از دمای بن‌ماری می‌بایست دمای آب، روزانه بوسیله دماسنجی غیر از دماسنج درون بن‌ماری، کنترل گردد.

۵- در مورد بن‌ماری هایی که فاقد سیرکولاتور آب می‌باشند ، لازم است در چهار گوشه بن‌ماری دماسنجهای دقیق قرار گرفته و نتایج آن با دماسنج درون بن‌ماری مقایسه گردد.

۶- میزان خطای مجاز دما برای آزمایشهای نقطه پایانی(end point) ± 0.5 می‌باشد.

یخچال

برای استفاده صحیح از یخچال باید به موارد زیر توجه داشت :

۱- یخچالها باید طوری قرار گیرند که هوای کافی از مبرد که عموما در پشت یخچال است ، عبور نماید.

۲- دمای یخچال باید روزانه دو بار در ساعات مشخص، اندازه‌گیری و ثبت شود. با توجه به امکان وجود اختلاف دما، درجه حرارت بخشهای مختلف یخچال باید بررسی گردد.

۳- محفظه یخ باید هرماه بررسی و در صورت وجود یخ تمیز شود.

۴- غبار روی مبرد ماهانه پاک شود.

۵- لاستیک دور در، مرتبا بررسی شود.

ترازو

عواملی مانند دما، رطوبت ، نیروی جاذبه و هوا می‌توانند در اندازه‌گیری صحیح وزن مواد تداخل نمایند.

برای نگهداری و برای استفاده صحیح از ترازو باید به موارد زیر توجه داشت :

۱- ترازو باید در محلی دور از جریان هوا ، دقیقا در وضعیت افقی و در مکانی ثابت و بدون ارتعاش قرار گیرد .

۲- ترازو باید پیش از هر اندازه‌گیری صفر شود.

۳- ظرفی که برای توزین استفاده شود باید تا حد امکان کوچک باشد (با توجه به حجم ماده مورد توزین). از بکار بردن ظروف پلاستیکی باید خودداری شود.

۴- ظرف و ماده مورد توزین باید قبل از توزین به حرارت اتاق رسانده شوند.

۵- دست را نباید وارد محفظه توزین نمود زیرا باعث گرم شدن محفظه می‌شود. بهتر است از پنس استفاده شود.

۶- ماده مورد توزین را باید وسط کفه قرار داد.

۷- ترازو باید تمیز نگه داشته شود. در صورت ریختن مواد شیمیایی باید سریعا محل را تمیز نمود . برای پاکسازی عوامل بیولوژیک از الکل ۷۰ درصد استفاده می‌شود.

۸- برای اطمینان از صحت اندازه‌گیری لازم است علاوه برکالیبراسیون داخلی ، در فواصل زمانی مشخص با استفاده از وزنه‌های کالیبره با وزن معین، صحت عملکرد را بررسی کرد یا از طریق مراجع کالیبراسیون معتبر ، اقدام به کالیبراسیون دستگاه نمود.

سیستم‌های تخلیص آب

آب خالص یکی از ارکان ضروری بسیاری از فعالیتهای آزمایشگاهی می‌باشد . درجه خلوص مورد نیاز آب به مورد مصرف آن بستگی دارد.

برای تهیه آب از روشهای تقطیر ، اسموز معکوس و دیونیزه کردن استفاده می‌شود.از آنجائیکه هیچیک از این روشها به تنهایی ، معیارهای NCCLS (کمیته ملی استانداردهای آزمایشگاهی امریکا که به CLSI تغییر نام داده است) برای آب نوع ۱ را تامین نمی‌نمایند ، در صورت نیاز به این نوع آب باید دو روش تخلیص را با هم استفاده نمود. توانایی روشهای مختلف تخلیص آب در برداشت ناخالصیها به تفکیک نوع روش براساس دستورالعمل NCCLS در جدول۵-۱ آمده است.

جدول۵-۱

Purification Process	**Major Classes of Contaminants**					
	Dissolved Ionized Solids	**Dissolved Ionized Gases**	**Dissolved Organics**	**Particulate Matter**	**Micro-organisms**	**Pyrogens/ Endotoxins**
Distillation	E	G/P	G	E	E	E
Deionization	E	E	P	P	P	P
Reverse osmosis	G	P	G	E	E	E
Carbon adsorption/absorption	P	P	E/G	P	P	P
Filtration (0.22 mm)	P	P	P	E	E	P
Ultrafiltration	P	P	P	E	E	P

E : Excelent G : Good P : Poor

موارد استفاده از انواع آب بشرح زیر می‌باشد.

نوع III : برای شستشوی ظروف شیشه‌ای و آزمایشهای کیفی مانند تجزیه ادرار

نوع II : در روشهای معمول آزمایشگاهی که به آب نوع I احتیاج ندارد .

نوع I : مواردی که کمترین تداخلات و بیشترین صحت مورد نیاز است مانند اندازه‌گیری عناصر کمیاب

جدول۶-۱

TABLE 1-9 NCCLS Specifications for Reagent Grade Water

	Type I	Type II	Type III
Microbiological content,* colony forming units per mL, cfu/mL (maximum)	10	10^3	N.A.
pH	N.A.	N.A.	5.0-8.0
Resistivity,† MΩ per centimeter (MΩ-cm), 25 °C	10 (in line)	2.0	0.1
Silicate, mg SiO_2/L (maximum)	0.05	0.1	1.0
Particulate matter‡	Water passed through 0.2-µm filter	N.A.	N.A.
Organics	Water passed through activated carbon	N.A.	N.A.

From National Committee for Clinical Laboratory Standards: Preparation and Testing of Reagent Water in the Clinical Laboratory. 3rd ed. Approved Standard. NCCLS Document C03-A3. Wayne, PA, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997.

**Microbiological content.* The microbiological content of viable organisms, as determined by total colony count after incubation at 36 ± 1 °C for 14 hr, followed by 48 hr at 25 ± 1 °C, and reported as colony forming units per mL (cfu/mL).

†*Specific resistance or resistivity.* The electrical resistance in ohms measured between opposite faces of a 1-cm cube of an aqueous solution at a specified temperature. For these specifications, the resistivity will be corrected for 25 °C and reported in MΩ/cm. The higher the amount of ionizable materials, the lower the resistivity and the higher the conductivity.

‡*Particulate matter.* When water is passed through a membrane filter with a mean pore size of 0.2 µm, it is considered to be free of particulate matter. *Organic material.* When water is passed through a bed of activated carbon, it is considered to contain minimum organic material.

نگهداری انواع آب : آب نوع I امکان نگهداری نداشته و باید بلافاصله بعد از تهیه مصرف گردد. آب نوعII و III را می‌توان در ظروف بوروسیلیکات یا پلی‌اتیلن با درب محکم برای مدت کوتاهی نگهداری نمود.

پیشنهاد می‌گردد برای اطمینان از کیفیت آب حداقل ۳ شاخص مقاومت آب ، آلودگی میکروبی و در مورد آب نوع III ، PH بررسی گردد.

برای بررسی مقاومت آب از هدایت سنج یا کنداکتومتر استفاده می‌شود که میزان هدایت آب را اندازه می‌گیرد. هدایت با مقاومت نسبت عکس دارد (Conductivity = 1/ resistance) . مقاومت برای آب نوعI ، II و III به ترتیب ۱۰ MΩ/cm، ۲ و ۰/۱ می‌باشد پس هدایت به ترتیب معادل ۰/۱ µS/cm ، ۰/۵ و ۱۰ خواهد بود. اندازه‌گیری هدایت آب باید پس از اندازه‌گیری دما با دماسنج کالیبره و براساس دستورالعمل هدایت سنج صورت گیرد.

برای بررسی آلودگی میکروبی می‌بایست اجازه داد آب برای حداقل یک دقیقه براحتی از دستگاه خارج شود .سپس در یک ظرف استریل ۱۰ میلی لیتر آب جمع آوری می‌شود. آزمایش باید در مدت یکساعت از جمع‌آوری آب انجام شود در صورت عدم امکان کشت در مدت یکساعت، نگهداری برای ۶ ساعت در دمای ۸-۲ درجه امکانپذیر است. بعد از مخلوط کردن آب (که با ۱۰ بار سروته کردن بدست می‌آید) ، ۱ میلی‌لیتر از آب در پتری دیش ریخته می‌شود. سپس محیط کشت ذوب شده تا دمای ۵۰-۴۶ درجه سرد و در پتری دیش ریخته می‌شود (از محیط کشت های BHI، TSA یا هر محیط کشتی که از رشد باسیلهای گرم منفی پشتیبانی کند، می‌توان استفاده نمود). با چرخاندن پتری‌دیش، آب را با محیط کشت مخلوط نمائید . پس از سرد شدن و جامد شدن آگار، دیش بطور وارونه و بمدت ۲۴ ساعت در دمای 36±1 درجه سانتی‌گراد و سپس ۲۴ ساعت در دمای23±3 درجه سانتی‌گراد قرار می‌گیرد(مدت انکوباسیون مجموعا ۴۸ ساعت می‌باشد) رشد میکروبی بصورت cfu/mL گزارش می‌شود.

استفاده از لوپ برای کشت آب مجاز نمی‌باشد.

اندازه‌گیری pH برای آب نوع ۳ با استفاده از pH meter و بر اساس دستورالعمل pH meter انجام می‌شود.

در صورت خرید آب ، می‌بایست مشخصات آب از طرف تولیدکننده ارائه گردد. پیشنهاد می‌شود آزمایشگاه در فواصل معین نسبت به کنترل آب خریداری شده اقدام نماید.

باید در نظر داشت انواعی از آب استریل که بصورت ویال عرضه می‌شود، الزاما از کیفیت مورد نیاز آزمایشگاه برخوردار نبوده و باید قبل از استفاده ، میزان هدایت آن بررسی شود.

نکته: حجم ادعاشده ویالهای آب، نباید مبنایی برای به حجم رساندن کنترلها، کالیبراتورها،معرفها و...، باشد. آزمایشگاه می‌بایست صرف نظر از حجم مندرج روی ویال، با استفاده وسایل حجمی مناسب مانند پیپت اقدام به انتقال حجم مورد نیاز نماید.

میکروسکوپ

برای‌حفظ کیفیت عملکرد میکروسکوپ آگاهی از نحوه صحیح نگهداری آن از اهمیت ویژه ای برخوردار می باشد که در زیر به نکاتی در این مورد اشاره می شود:

۱- هنگامی که از میکروسکوپ استفاده نمی‌شود، لامپ آن خاموش و با روکش مناسب پوشانده شود.
۲- بلافاصله پس از استفاده، روغن ایمرسیون از روی عدسی‌های شیئی پاک شود.
۳- قبل و بعد از استفاده از میکروسکوپ، قسمتهای نوری با دستمال مخصوص لنز ،کاغذهای جاذب یا پارچه نرم آغشته به محلولی متشکل از یک حجم اتر و یک حجم ایزوپروپیل الکل، پاک شود.
۴- برای پاک کردن لنزها نباید از گزیلل استفاده شود. لنزها نمی‌بایست در الکل خیسانده شوند.
۵- در حال مشاهده لام ، برای وضوح تصویر ، هیچگاه عدسی‌های شیئی را خیلی پائین نبرید زیرا ممکن است منجر به خراشیدگی اسلاید و صدمه به لنز شود.
۶- عدسی‌های شیئی نباید از میکروسکوپ جدا شوند.
۷- در هوای گرم و مرطوب به منظور جلوگیری از رشد قارچ بر روی لنزها ، می‌توان میکروسکوپ را هر عصر در محفظه‌ای که با یک یا دو لامپ ۴۰ وات گرم شده و محیط خشکی فراهم آورده ، قرار داد. باید توجه داشت دمای ان محفظه نمی‌بایست بیش از ۵ درجه از دمای آزمایشگاه بالاتر باشد.
۸- در هوای گرم و خشک که مشکل اصلی گرد و غبار است ، علاوه بر پوشاندن میکروسکوپ در ساعات غیر کاری، در پایان روز می‌بایست گرد و غبار لنزها را با دمیدن هوا از وسیله‌ای مانند پوار یا با استفاده از برس مخصوص لنز یا قلم موی نقاشی و در صورت لزوم کاغذ مخصوص لنز(Lense paper) تمیز نمود.

فصل دوم

کنترل کیفیت در آزمایشهای بیوشیمی وسایر آزمایشهای کمی (quantitative)

کنترل متغیرها در بخش انجام آزمایش

متغیرهای مرحله انجام آزمایش را می‌توان به دو روش استفاده از نمونه کنترلی و تعمیم نتایج آن به پاسخهای بیماران (کنترل کیفیت آماری) و نیز استفاده از نتایج بیماران (دلتا چک، آزمایشهای مضاعف و...) تحت کنترل قرار داد.

کنترل کیفیت آماری

در کنترل کیفیت آماری ، نمونه کنترلی (بعنوان نماینده یک گروه از نمونه های بیماران) مورد آزمایش قرار گرفته و نتایج آن با مقدار مورد انتظار که اغلب بصورت یک محدوده تعریف شده، مقایسه می‌گردد. اگر نتیجه آزمایش نمونه کنترلی، در محدوده مورد انتظار قراربگیرد، پاسخهای آزمایش بیماران نیز قابل قبول شناخته می شوند و برعکس اگر خارج از محدوده مورد انتظار قرائت شود، احتمال وجود خطا در سیستم آزمایش مطرح شده و طبیعتا پاسخهای بیماران نیز غیرقابل قبول شناخته می‌شوند.

انتخاب مواد کنترلی

در انتخاب مواد کنترلی موارد زیر باید مورد توجه قرار گیرند :

۱. **پایداری** : کنترل می‌بایست برای مدت طولانی پایدار و در عین حال فاقد مواد نگهدارنده مداخله‌گر باشد . در این حالت مصرف کننده این امکان را دارد که مواد کنترلی مورد نیاز خود را برای مدت مشخص، یکجا تهیه نماید. (بهتر است کنترلها برای مصرف یکسال ، خریداری شوند)
۲. **مشابهت با نمونه انسانی مورد آزمایش** : بهتر است کنترل با توجه به نمونه انسانی مورد آزمایش انتخاب گردد. بعنوان مثال کنترلهای با پایه سرم، ادرار ، خون، CSF و ....

کنترلهای با پایه انسانی ارجح می‌باشند ولی به علت احتمال آلودگی با عوامل بیماریزا بعضا کنترلهای با پایه سرم گاوی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند.

۳. **یکنواختی** : ویالهای مختلف کنترل باید هموژن و یکنواخت بوده و غلظت آنالیتهای موجود در آنها یکسان باشد.
۴. **عدم وجود اثرات زمینه‌ای (Matrix effect)** : برای انتخاب سرم کنترل باید همخوانی آن با معرفهای مورد استفاده در نظر گرفته شده واز عدم وجود اثرات زمینه‌ای اطمینان حاصل گردد.
۵. **بسته بندی مناسب** : ویال بدون نشتی بوده و به حجم رساندن و نگهداری کنترل به سهولت انجام شود.
۶. **قیمت ارزان و تعداد زیاد مصرف کنندگان**
۷. **عاری از عوامل بیماریزا** : مثل باکتری ، قارچ ، ویروس و پریون

هر دو نوع کنترلهای لیوفیلیزه یا کنترلهای مایع قابل استفاده می‌باشند اما در زمان انتخاب باید مزایا و معایب هریک در نظر گرفته شود . بعنوان مثال خطا در به حجم رساندن کنترلهای لیوفیلیزه ممکن است منجر به بروز مشکلاتی شود در حالیکه کنترلهای مایع، آماده مصرف هستند. در عین حال مواد موجود در کنترلهای مایع ممکن است در برخی روشها تداخل نموده و باعث خطا شوند.

برای کنترل داخلی کیفیت ، بهتر است حتی‌المکان دو غلظت مختلف از کنترل استفاده شود. انتخاب غلظتهای نزدیک به محدوده تصمیم‌گیری بالینی (Decision level) ارجح می‌باشد. مانند غلظت ۱۲۶ و ۲۰۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر برای گلوکز . برخی پیشنهاد می‌نمایند غلظت کنترلها طوری انتخاب شوند که محدوده گزارشدهی روش آزمایشگاهی (Reportable range) را پوشش دهند. بعنوان مثال اگر بنا بر ادعای سازنده، محدوده گزارشدهی کیت اندازه‌گیری گلوکز ، ۳۰ تا ۴۰۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر است، می توان کنترلهایی با غلظت تقریبی ۴۰ و ۳۸۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر را انتخاب نمود.

مواد کنترلی به دو شکل دارای مقادیر مشخص (assayed) و فاقد مقادیر مشخص(unassayed)موجود و هر دو نوع آنها برای بررسی دقت (precision) قابل استفاده می باشند.

نکته ۱: مواد کنترلی نمی‌توانند بعنوان جایگزین کالیبراتور استفاده شوند .کالیبراتور ماده‌ای است که برای کالیبراسیون روش آزمایشگاهی بکار می‌رود و دار ای مقدار مشخص است درحالی که مواد کنترلی برای کنترل کیفیت روش آزمایشگاهی بکار می‌رود و اغلب دارای محدوده غلظتی می‌باشد .

نکته ۲ : در خریدکالیبراتور و مواد کنترلی به همخوانی معرف باکالیبراتور و کنترل تجاری توجه داشته باشید. این موضوع را می‌توانید از شرکت پشتیبان کیت ومعرف استعلام نمائید.

نکته ۳:به حجم رساندن مواد کنترلی لیوفیلیزه می‌بایست با وسائل حجمی مناسب و طبق دستور سازنده صورت پذیرد.

خطای مجاز

اولین قدم در اجرای فرآیند کنترل داخلی کیفیت در بخش آنالیتیک ، تعیین خطای مجاز می‌باشد. علیرغم تمامی تلاشها، وجود خطا درآزمایشگاهها حتی در بهترین شرایط اجتناب ناپذیرمی‌باشد. بطوریکه حتی اگر در یک آزمایشگاه، یک کارشناس، آزمایش ثابتی را با دستگاه و معرف مشخص بر روی نمونه واحد، به دفعات انجام دهد، اخذ نتایج مشابه و یکسان در تمامی موارد بعید بنظر 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 (برحسب CV% یا SD) و عدم صحت (برحسب Bias یا Bias%) ویا مجموعا خطای کلی مجاز خود را مشخص نماید.

بعنوان مثال اگر عدم دقت مجاز برای کلسترول و بر حسب CV% معادل ۲٪ در نظر گرفته شود ، میزان پراکندگی نتایج برای غلظت mg/dL ۲۰۰ به شکل محاسبه می‌گردد.

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

از محاسبات بالا نتیجه می‌گیریم، به احتمال ۹۵٪ اگر کلسترول یک نمونه با غلظت واقعی mg/dL ۲۰۰ چند بار اندازه‌گیری شود، نتایج در محدوده mg/dL ۸±۲۰۰ یعنی mean±2SD قرار خواهد گرفت.

خطای مجاز باید واقع‌بینانه و بر اساس شرایط آزمایشگاه ، بصورتی انتخاب شود که بتواند میزانی از خطا، که تصمیم‌گیری بالینی را متاثر می‌سازد، شناسایی نماید. در عین حال آنقدر کوچک نباشد که باعث رد کاذب مکرر نتایج گردد.

بعنوان مثال اگر آزمایشگاهی میزان CV% مجاز خود را برای اندازه گیری گلوکز ۸٪ تعریف نماید و نمونه‌ای با غلظت واقعی mg/dL ۱۲۶ داشته باشد، در ۹۵٪ موارد احتمال دارد نتایجی در محدوده mg/dL ۱۴۶-۱۰۶ ارائه دهد که این طیف غلظتی وسیع، مشخصا باعث اشتباه در تصمیم‌گیری پزشک خواهد شد . اگر این آزمایشگاه میزان CV% مجاز خود را به ۱٪ تغییر دهد در غلظت mg/dL ۱۲۶ نتایجی بین mg/dL ۱۲۹-۱۲۳ خواهد داشت که اگرچه برای پزشک مطلوب است، ولی باعث می‌شود سری های کاری مکررا و بطور کاذب مردود (False rejection) شناخته شوند . این امر خود منجر به افزایش دفعات تکرار آزمایش، صرف هزینه و خستگی کارکنان می‌گردد.

روشهاو فرضیه‌های مختلفی که برای تعیین مقادیر خطای مجاز استفاده گردیده ذیلا بطور مختصرمعرفی شده است.

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

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

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

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

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

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

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

۵- **تغییرات بیولوژیک** : دراین روش تغییرات یک پارامتردر مدت زمانی مشخص، در بدن یک فرد و افراد مختلف اندازه گیری و بر اساس ضریب انحراف درون فردی within subject و بین افراد مختلف between subject ، مقادیر CV و Bias محاسبه می‌گردد.

مقادیر خطای مجاز برای هر یک از کمیتها متفاوت بوده و آزمایشگاه باید قبل از اجرای کنترل کیفیت ، با استفاده از یکی از مراجع فوق مقادیر عدم دقت و عدم صحت مورد نیاز خود را تعریف نماید. بعنوان مثال جدول۱-۲ مقادیر عدم دقت مجاز برحسب CV%را برای لیپیدها ، از دیدگاههای مختلف نشان می‌دهد.

جدول۱-۲

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

همانطور که در جدول مشاهده می شود حتی برای یک کمیت، خطاهای مجاز متفاوتی مطرح می‌شود. لذا مجددا تاکید می‌نماید آزمایشگاه می‌بایست براساس نیازها و امکانات خود از هر یک از آنها استفاده نماید.
اهداف کیفیت براساس معیارهای CLIA و تغییرات بیولوژیک در پیوست شماره ۱ آمده و برای کسب اطلاعات بیشتر می‌توان به آدرسهای زیر مراجعه نمود.

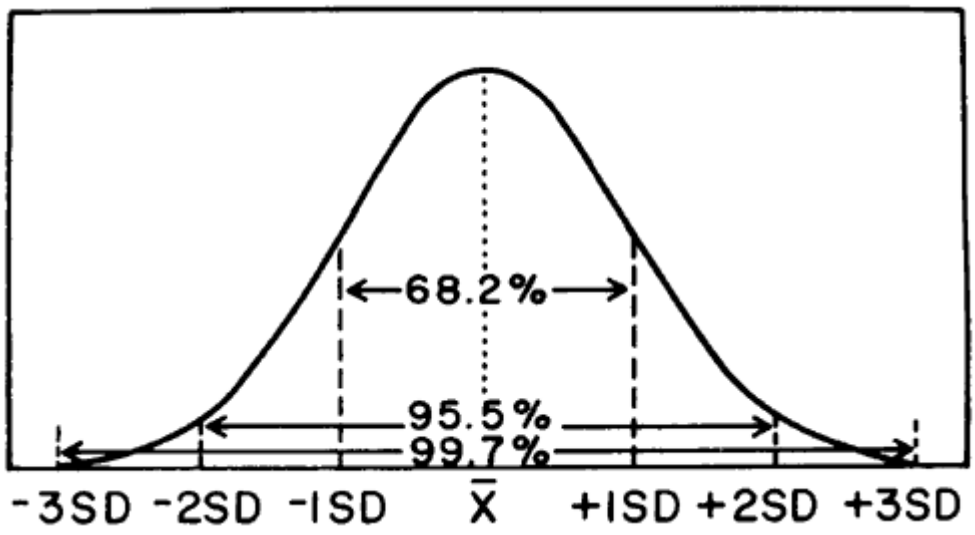
http://www.westgard.com/biodatabase1.htm
http://www.westgard.com/clia.htm
http://www.westgard.com/europe.htm

کلیات نمودار کنترلی

رایجترین روش برای مقایسه نتایج آزمایش نمونه های کنترل با مقدار مورد انتظار، استفاده از نمودار کنترلی است. درنمودار کنترلی ، غلظت حاصله از آزمایش سرم کنترل ، روی نموداری بامحدوده مشخص، علامتگذاری و بصورت گرافیکی و ساده نمایش داده می‌شود. اگر نتایج درون محدوده مشخص شده قرار گیرد، شرایط تحت کنترل و عملکرد سیستم مناسب تشخیص داده می‌شود . مشاهده نتایج خارج از محدوده نشانگر بروز مشکل بوده و لزوم بررسی عملکرد سیستم را مطرح می‌سازد .

برای بدست آوردن محدوده نمودار، نمونه کنترلی به دفعات با استفاده از روش مورد استفاده آزمایشگاه ، آزمایش و سپس میانگین و انحراف معیار نتایج حاصله ، محاسبه می‌گردد.

همانطور که در شکل زیر مشاهده می شود ،بطور معمول در صورتی که نمونه‌ای مکررا آزمایش شود انتظار می‌رود نتایج حاصله ، از توزیعی نرمال (توزیع گوسین)برخوردار باشند. دریک توزیع نرمال ۹۵٪ خوانده ها در محدوده 2 SD ± و ۹۹/۷٪ خوانده‌ها در محدوده 3 SD ± قرارمی‌گیرند .پس احتمال اینکه خوانده ای بطور اتفاقی خارج از محدوده 2 SD ± قرار گیرد حدود ۵٪ (بعبارتی۱ نتیجه بین ۲۰ خوانده) و در مورد محدوده 3 SD ± تنها ۰/۳٪ (۳ نتیجه بین ۱۰۰۰ خوانده) می‌باشد.



برای اینکه نمودار کنترلی مقدار و محدوده مناسبی داشته باشد می‌بایست تاثیر نتایج پرت (Outlier) را به حداقل رساند. زیرا وجود حتی یک خوانده پرت می‌تواند میانگین را جابجا نموده و محدوده چارت را بسیار وسیع نماید.

برای جلوگیری از این مشکل می‌توان نتایج پرت را که بطور معمول نتایج خارج ازمحدوده mean±3SD در نظر گرفته می‌شوند ،حذف نمود. (این محدوده بستگی به تعداد خوانده‌ها داشته و با افزایش تعداد خوانده‌ها افزایش می‌یابد بطوریکه برای تعداد ۳۰ خوانده محدوده mean± 3.14SD و برای ۴۰۰ خوانده محدوده mean ±3.83 SD بعنوان محدوده قابل قبول شناخته شده و نتایج خارج از این محدوده بعنوان نتایج پرت در نظر گرفته می‌شود.)

از آنجائیکه احتمال بدست آوردن تصادفی یک نتیجه خارج از محدودهmean±3SD فقط۰/۰۰۳ (۳ نتیجه بین ۱۰۰۰ نتیجه) می‌باشد ، وجود حتی یک نتیجه پرت (outliers) احتمال وجود مشکل را مطرح کرده و پیگیری را الزامی می‌سازد.

اجرای گام به گام کنترل داخلی کیفیت

۱- با توجه به شرایط آزمایشگاه عدم دقت مجاز بر حسب CV% را مشخص نمائید.

۲- نمونه های کنترلی مناسب را حتی‌المکان در دوغلظت انتخاب کنید.

۳- نمونه‌های کنترلی را به یکی از راههای زیر ، ۲۰ بار آزمایش نمائید تا ۲۰ خوانده بدست آید:

۳-۱بهتر است این تعداد خوانده از تکرار آزمایش در ۲۰ روز کاری (۴ هفته) حاصل گردد.

۳-۲ روش دیگر، انجام آزمایش بصورت دوتایی در ۱۰ روز کاری است.

۳-۳ در صورت عدم امکان اجرای روشهای فوق می‌توان در ۵ روز کاری ، نمونه کنترلی را ۴ باردر هر روز آزمایش نمود.

طولانی شدن این مرحله و آزمایش نمونه کنترلی در روزهای کاری مختلف، باعث می شود با تاثیر متغیرهایی که بطور معمول در آزمایشگاه وجود دارند، نتایج واقعی‌تری بدست آید. هر چه این مرحله کوتاهتر شود تاثیر متغیرها کمتر شده و نتایجی نزدیک به هم حاصل می‌گردند. بدیهی است در این شرایط محدوده چارت بسیار کوچک و غیر واقعی شده وطبیعتا در مراحل بعدی موارد رد کاذب نتایج (False rejection) افزایش می‌یابد.

۴- میانگین ، انحراف معیار و ضریب انحراف را براساس فرمولهای زیرمحاسبه نمائید. انحراف معیار با استفاده از ماشین حساب یا برنامه‌های نرم افزاری یا به روش دستی قابل محاسبه است.

$$mean = \frac{\sum x_i}{n}$$

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

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

CV : ضریب انحراف (Coefficient of variation)

SD: انحراف معیار

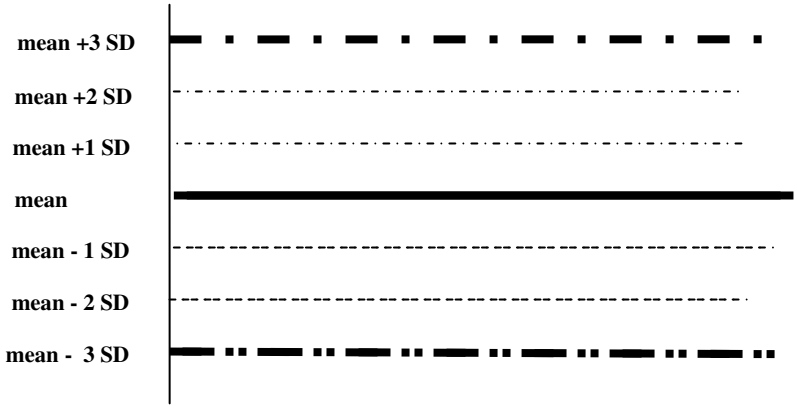
mean : میانگین

n : تعداد خوانده‌ها

x_i: هر تک خوانده

۵- قابلیت تکرارپذیری(SD یا CV%) بدست آمده را با عدم دقت مجازی که قبلا تعیین نموده‌اید، مقایسه نمایید. اگر نتایج در محدوده خطای مجاز قرار داشت ، کار را طبق بند ۶ ادامه دهید . در غیراین صورت عوامل ایجاد خطا را جستجو و پس از رفع مشکل ، مجددا مراحل ۱-۴ را اجرا نمائید. در صورتیکه علیرغم بررسی متغیرها ، مشکل رفع نشده باشد با تولیدکننده فرآورده یا دستگاه تماس بگیرید.

۶- برای هر غلظت از نمونه کنترلی، بااستفاده از میانگین و انحراف معیار، چارت کنترلی را مانند شکل زیر ترسیم نمایید.



۷- در هر سری کاری حتی‌المکان دو کنترل در دو غلظت مختلف را مورد آزمایش قرار داده ونتیجه را روی منحنی مربوطه علامتگذاری نمایید.

بر اساس تعریف(CLSI (NCCLS سری کاری به مدت زمان یا تعداد نمونه‌ای اطلاق می‌گردد که طی آن صحت و دقت سیستم اندازه‌گیری ثابت باشد.

پس تعداد دفعات آزمایش سرم کنترل به مواردی مانند پایداری روش و سیستم مورد استفاده بستگی دارد. اگر سیستمی برای مدت زمان مشخص یا تعداد آزمایش معین پایدار است ، در این فاصله یکبار آزمایش نمونه کنترلی کافی است.

نکته : محدوده ای که در بروشورهای کنترلهای تجاری درج شده نباید برای ترسیم چارت کنترل کیفیت استفاده شود. این محدوده عمدتا براساس آزمایش سرم کنترلها در آزمایشگاههای مختلف تعیین می‌شود و متغیرهای متعددی مانند اختلاف دستگاهها ، شماره ساختهای مختلف کیت و کالیبراتور برروی آن تاثیر

می‌گذارند . در نتیجه محدوده مندرج در بروشور بسیار بزرگتر از محدوده حاصل از عملکرد یک آزمایشگاه می‌باشد.البته در شروع کار ، تا زمانی که تعداد نتایج به حد مطلوب نرسیده ، محدوده سرم کنترل قابل استفاده است.

لازم بذکر است حتی در ابتدای کار، تنها در صورتی می‌توان از محدوده مندرج در بروشور کنترل استفاده نمود که کنترل با روش آزمایشگاهی مورد استفاده همخوانی داشته و این موضوع مورد تائید سازنده معرف یا دستگاه قرار داشته باشد.

نکته : باید توجه نمود که افزایش تعداد کنترلها در هر سری کاری اگرچه می‌تواند باعث تشخیص بهتر خطا شود ولی بعلت افزایش میزان رد کاذب باعث افزایش هزینه می‌گردد. لذا پیشنهاد می‌گردد در هر سری کاری یک یا دو کنترل آزمایش شود.

مثال:

آزمایشگاهی برای اندازه گیری کلسترول کیت جدیدی خریداری نموده و برای ترسیم چارت کنترل کیفیت CV% مجاز را براساس نظر NCEP ۳٪ انتخاب و دو سرم کنترل با غلظتهای نزدیک به غلظت تصمیم گیری (Decision level) را طی ۵ روز کاری ۲۰ بار آزمایش نموده است که نتایج آ ن بشرح زیر می‌باشد.

جدول۲-۲

کنترل ۲

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

کنترل ۱

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

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

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

از آنجائیکه CV% حاصله در محدوده خطای مجاز تعیین شده (3%) قرار دارد، می‌تواند چارت را ترسیم و نتایج کنترلها را روی آن مشخص نماید.

تفسیر نتایج

برای تفسیر نتایج چارت کنترل کیفیت معیارها یا قوانین مختلفی توسط سازمانها یا کارشناسان وضع شده است که براساس آنها نتایج" *تحت کنترل*" یا" *خارج از کنترل*" در نظر گرفته می‌شود . Levey –Jenning ، وستگارد و WHO ۳ نمونه‌ای هستند که در این مجموعه مورد بحث قرار می‌گیرند.

انتخاب هر یک از این قوانین توسط آزمایشگاه مجاز می‌باشد.

۱- چارت کنترلی Levey –Jenning

چارتهای کنترلی برای اولین بار در سال ۱۹۵۰ توسط Levey و Jenning به آزمایشگاهها معرفی شدند. آنها نشان دادند چگونه روشهای کنترلی که توسط Shewhart برای استفاده درصنعت مطرح گردیده بود ، می‌تواند با محاسبه میانگین و محدوده برای روشهای آزمایشگاهی استفاده شود.

برای ترسیم واستفاده از چارت کنترلی Levey –Jenning مراحل زیر را دنبال نمائید :

۱- نمونه های کنترلی را ۲۰ بار آزمایش و میانگین و انحراف معیار را محاسبه نمایید.(مطابق مراحل ۱ تا ۵ در بخش اجرای گام به گام کنترل داخلی کیفیت)

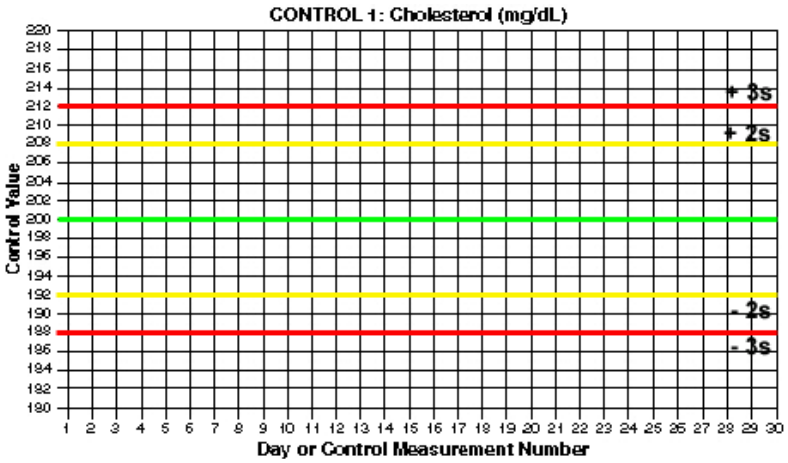
۲- بطور دستی یا با استفاده از نرم افزار یک چارت کنترلی ترسیم کنید بطوریکه محور y مقدار نمونه کنترل بوده و محدوده mean ±4 SD را در بر گیرد.

۳- اگر تعداد کنترلهایی که در سری کاری استفاده می شود ۲ یا بیشتر باشد mean±3 SD را بعنوان محدوده قابل قبول انتخاب کنید. اما اگر در هر سری کاری یک کنترل آزمایش می‌شود محدودهmean± 2SD را ملاک قرار دهید.

۴- میانگین و محدوده مورد قبول خودرا بصورت خطوط افقی ترسیم نموده و خطوط عمودی را مشخصه زمان انجام آزمایش قرار دهید. در هر سری کاری کنترلها را آزمایش و نتیجه را روی چارت علامتگذاری کنید.

۵- مادامیکه نتایج در محدوده مورد انتظارmean ± 3 SD یا mean ± 2 SD (باتوجه به محدوده منتخب) قرار داشته باشد، نتایج تحت کنترل و با خروج از این محدوده خارج از کنترل شناخته می‌شود.

مثال چارت کنترلی Levey –Jenning در مورد کلسترول با میانگین ۲۰۰و انحراف معیار mg/dL ۴



نکته : بعلت سهولت کار بسیاری از آزمایشگاهها از چارت کنترلی Levey–Jenning استفاده می‌نمایند ولی باید در نظر داشت استفاده از هریک از این محدوده‌هایmean±3SD یا mean±2SD دارای معایبی می‌باشد اگر محدوده

mean±3SD انتخاب شود احتمال شناسایی خطا کاهش می یابد در حالیکه رد کاذب (False rejection) کمتر از ۵٪ است. اگر محدوده mean ± 2 SD در نظر گرفته شود ، احتمال تشخیص خطا افزایش می‌یابد اما میزان رد کاذب (False rejection) افزایش می‌یابد.

با افزایش تعداد کنترلهایی که در هر سری کاری آزمایش می‌شوند(n)، میزان رد کاذب افزایش می‌یابد. در صورت استفاده از یک کنترل(n=1) رد کاذب ۵٪ می‌باشد ولی این میزان برای ۲ کنترل(n=2) به ۹٪ و برای ۴ کنترل (n=4) به ۱۸٪ می‌رسد .

بعنوان مثال اگر آزمایشگاهی در هر سری کاری دو غلظت نمونه کنترلی را بصورت دوبل آزمایش نماید، در واقع در هر سری کاری ۴ کنترل را آزمایش کرده و رد کاذب نتایج این آزمایشگاه به ۱۸٪ می‌رسد.

۲- تفسیر چارت کنترلی با قوانین چندگانه وستگارد :

به منظور افزایش احتمال تشخیص خطا و کاهش موارد رد کاذب نتایج، قوانین چندگانه توسط وستگارد و همکاران ارائه گردید. این قوانین طوری طراحی شده اند که ضمن حساس بودن به خطاهای تصادفی و سیستماتیک ، میزان رد کاذب نتایج را به کمتر از ۰/۰۱ می‌رسانند.

برای استفاده از این قوانین، نمونه های کنترلی را ۲۰ بار آزمایش و میانگین و انحراف معیار را محاسبه نمایید. (مطابق مراحل ۱ تا ۵ در بخش اجرای گام به گام کنترل داخلی کیفیت) سپس در هر سری کاری نمونه‌های کنترلی را آزمایش نمائید.

مادامیکه کنترلها در محدوده mean±2SD قرار دارند ، نتایج بیماران را گزارش نمائید ولی به محض اینکه یکی ازکنترلها از محدوده mean±2SD خارج شد ، کار را متوقف و نتایج کنترلها را از نظر وجود یکی از قوانین زیر بررسی نمائید.

- **1_{2s}** یک کنترل خارج از محدوده 2 SD ± بمعنی هشداربوده و لزوم بررسی سایر قوانین را مطرح می‌سازد.
- **1_{3s}** یک کنترل خارج از محدوده 3 SD ± باعث رد نتایج شده و می تواند نشاندهنده خطای راندوم یا شروع خطای سیستماتیک باشد.
- **2_{2s}** دوخوانده متوالی همسو و خارج از محدوده 2SD± باعث رد نتایج شده و به خطای سیستماتیک حساس می‌باشد.
- **R_{4s}** یک خوانده خارج از محدوده 2 SD + و دیگری خارج از محدوده 2 SD - باعث رد نتایج گردیده ونشانگر خطای راندوم می‌باشد.
- **4_{1s}** ۴ خوانده متوالی و همسو، خارج از محدوده 1 SD + یا 1 SD- باعث رد نتایج می‌شود و به خطای سیستماتیک حساس می‌باشد.
- **10_{x}** ۱۰ خوانده متوالی در یک طرف میانگین (بالا یا پائین میانگین و بدون توجه به اندازه انحراف) باعث رد نتایج می‌شود و به خطای سیستماتیک حساس می‌باشد.

لازم به ذکر است که قوانین چندگانه وستگارد بین سریهای کاری مختلف و نیز بین دو غلظت نمونه کنترلی نیز قابل استفاده می‌باشند . بعنوان مثال در مورد قانون2_{2s} ممکن است یک خوانده دیروز و یک خوانده امروز، همسو وخارج از محدوده 2 SD قرار گرفته باشد یا در یک سری کاری، یک خوانده در کنترل ۱ و خوانده دیگر در کنترل۲ (نتایج هر دو کنترل) خارج از محدوده 2SD قرائت گردند.

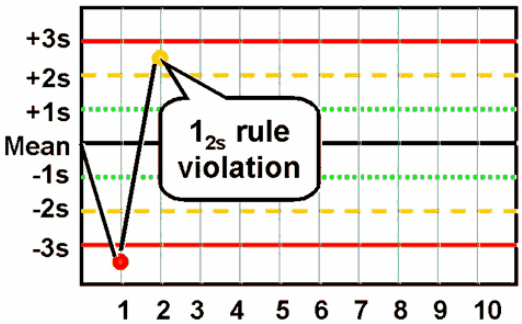
مورد استثنا قانون R_{4s} است که در آن باید دو خوانده بدست آمده از یک سری کاری با یکدیگر 4 SD فاصله داشته باشند. اگر در دو سری کاری متفاوت، نتایج با هم 4 SD فاصله داشته باشند ، این قانون کاربرد ندارد.

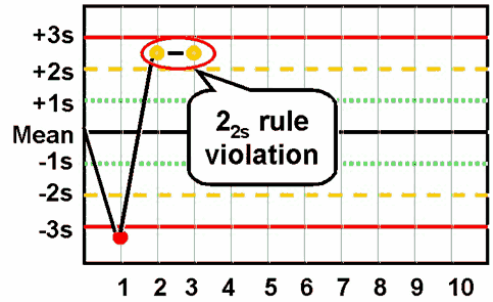
نکته :در سال ۲۰۰۶ با توجه به پیشرفت‌های تجهیزات و نیز کامپیوتری شدن بسیاری از برنامه‌ها، دو تغییر در قوانین وستگارد ایجاد شد.اول اینکه قانون 1_{2s} به عنوان هشدار حذف گردید و پیشنهاد شد قوانین 10_x و 4_{1s} حتی در شرایطی که نتیجه در محدوده ±2SD دارد، اعمال شود. این امر اگر چه منجر به تشخیص سریعتر خطا می‌شود ولی انجام صحیح آن در مواردی که چارت بصورت دستی ترسیم شده بسیار مشکل است. همچنین با توجه به شرایط فعلی برخی آزمایشگاهها، ممکن است استفاده و تفسیر بدرستی انجام نشده و هزینه اجرای کنترل کیفیت را بالا ببرد.لذا مولف توصیه می‌نماید چنانچه چارت بصورت دستی ترسیم می‌شود، مطابق با نظریات قبلی وستگارد، قوانین زمانی بررسی شوند که حداقل یک نتیجه خارج از محدوده mean±2SD قرائت شده باشد.

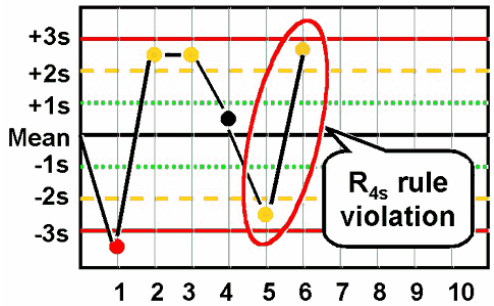
تغییر دوم اینکه در صورت استفاده از ۳ یا ۶ کنترل در هر سری کاری (مضرب ۳) قوانین تفسیر تا حدی متفاوت می‌باشند.

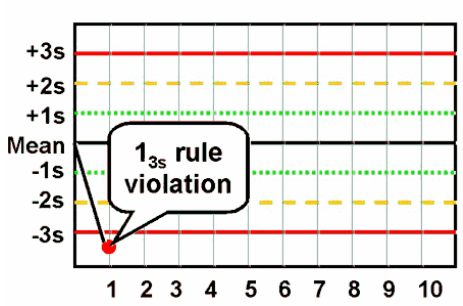
برای کسب اطلاعات بیشتر در مورد تغییرات فوق می‌توان به سایت وستگارد مراجعه نمود.

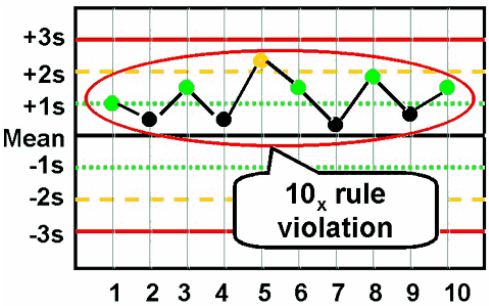
مثال ۱ : در شکلهای زیر قوانین وستگارد با آزمایش یک کنترل در هر سری کاری نمایش داده شده است.

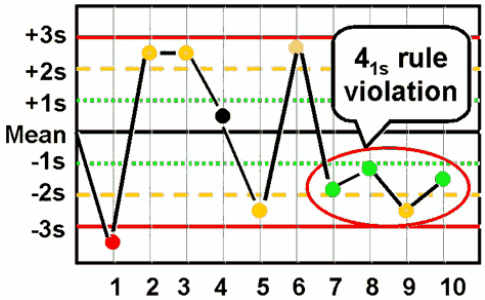




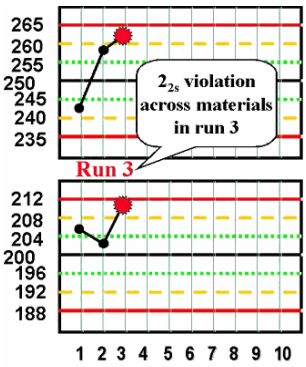




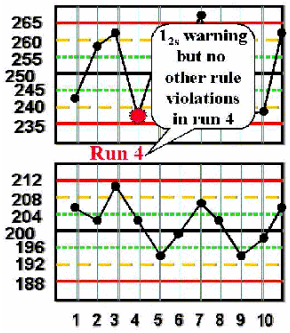




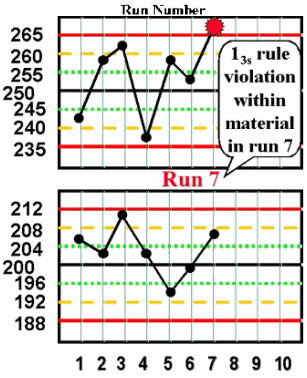
مثال۲ : در شکلهای زیر قوانین وستگارد با آزمایش دو کنترل در هر سری کاری ، نمایش داده شده است.



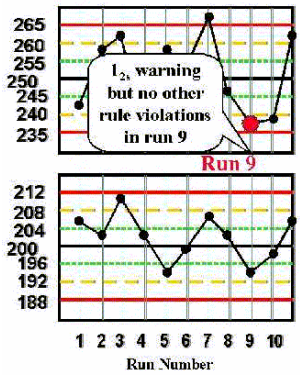
در سری سوم کاری هر دو کنترل خارج از محدوده 2 SD + هستند پس براساس قانون 2_{2s} این سری کاری رد می‌شود.
به احتمال زیاد یک خطای سیستماتیک در این محدوده غلطتی وجود دارد.



در سری چهارم کاری کنترل با غلظت بالا ، خارج از محدوده 2SD- قرار گرفته و احتمال خطا وجود دارد. از آنجاییکه سری کاری قبلی(سری سوم) رد شده است فقط سری چهارم از نظر وجود قوانین 1_{3s} و 2_{2s} و R_{4s} بررسی می‌گردد. با توجه به عدم وجود ۳ قانون نامبرده ، این سری کاری قبول می شود ولی باید به هشدار توجه نمود.



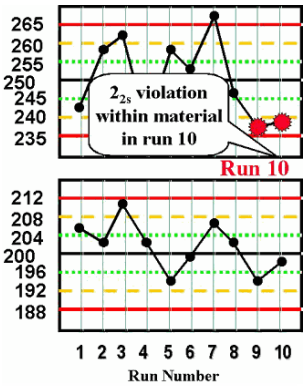
درسری هفتم کاری نتیجه کنترل با غلظت بالا خارج از محدوده 3SD ± قرار گرفته که باعث رد این سری کاری می‌گردد.
به احتمال زیاد یک خطای راندوم وجود دارد.



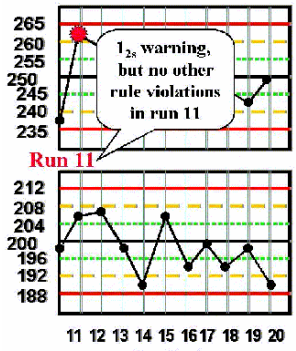
در سری نهم کاری کنترل با غلظت بالا ، خارج از محدوده 2 SD- قرار گرفته و احتمال خطا وجود دارد. چارت از نظر وجود قوانین 1_{3s} و 2_{2s} و R_{4s} بررسی می گردد. با توجه به عدم وجود ۳ قانون نامبرده ، این سری کاری قبول می‌شود ولی باید به هشدار توجه نمود.

در سری دهم کاری در چارت کنترل با غلظت بالا ، دو خوانده متوالی در دو سری کاری متوالی، خارج از محدوده 2SD – قرار گرفته که با توجه به قانون 2_{2s} باعث رد سری دهم می‌گردد.

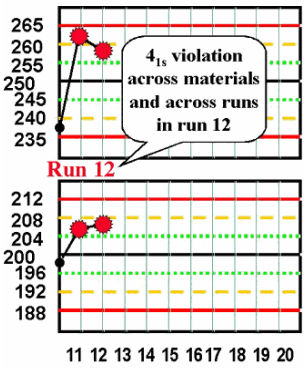
به احتمال زیاد یک خطای سیستماتیک وجود دارد.



در سری یازدهم کاری کنترل با غلظت بالا ، خارج از محدوده 2SD+ قرار گرفته و احتمال خطا وجود دارد. چارت از نظر وجود قوانین 1_{3s} و 2_{2s} و R_{4s} بررسی می‌گردد. با توجه به عدم وجود ۳ قانون نامبرده ، این سری کاری قبول می‌شود ولی باید به هشدار توجه نمود.

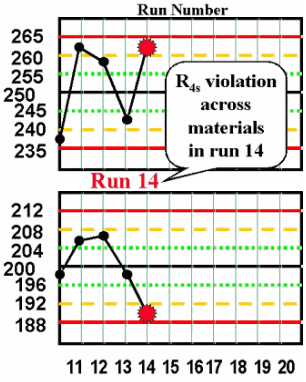


در سری دوازدهم کاری در چارت هر دو کنترل ، دو خوانده متوالی در دو سری کاری متوالی، خارج از محدوده 1SD+ قرار گرفته با اعمال قانون در هر دو غلظت مشاهده می‌گردد که ۴ خوانده متوالی خارج از محدوده1SD+ وجود دارد.علیرغم وجود قانون 4_{1s} ، از آنجاییکه درسری دوازدهم هیچیک از نتایج، خارج از محدوده2SD نیستند ، سری کاری تایید می‌گردد اما باید احتمال وقوع یک خطای سیستماتیک را در نظر داشت.



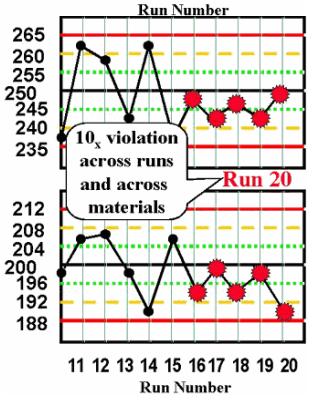
در سری چهاردهم کاری کنترل بالا خارج از محدوده 2SD+ و کنترل دیگر خارج از محدوده 2 SD– قرار گرفته پس با قانون R_{4s} سری کاری رد می‌شود.

به احتمال زیاد یک خطای راندوم وجود دارد.



در سری بیستم کاری بررسی نتایج در سریهای قبلی نشان می‌دهد که ۵ نتیجه در غلظت بالا و ۵ نتیجه در غلظت پائین در یک طرف میانگین قرار گرفته که با قانون 10_x باعث رد سری بیستم می‌گردد.

به احتمال زیاد یک خطای سیستماتیک وجود دارد



قوانین WHO

در کتب مختلفی که با موضوع تضمین کیفیت در آزمایشگاه توسط سازمان جهانی بهداشت چاپ گردیده است، به روشهای گوناگون تفسیر چارتهای کنترلی برمی‌خورید که دو نمونه آن که در دسترس مولفین این مجموعه قرار گرفته با ذکر منبع ذیلا آمده است:

Basic Quality assurance for intermediate and peripheral Laboratories *(2002)*

- وقتی پراکندگی نتایج نزدیک به میانگین و در اطراف آن باشد، عملکرد سیستم قابل قبول است.
- وجود یک خوانده خارج از محدوده mean ± 2 SD نشان می‌دهد که سیستم از کنترل خارج شده و برای یافتن خطا باید اقدام فوری صورت گیرد.
- هفت خوانده پیاپی با سیر صعودی یا نزولی (حتی اگر از میانگین عبور کنند) نشانگر یک اتفاق تدریجی در سیستم بوده که باید شناسایی و اصلاح شود.
- مشاهده یک سری از خوانده‌ها بطور پیاپی و ثابت دریک طرف میانگین نشانگر وجود bias می‌باشد که باید شناسایی و اصلاح گردد.
- پراکندگی زیاد نتایج در اطراف میانگین نشانگر دقت نامناسب اندازه‌گیری است که نیاز به اصلاح دارد.

Quality assurance in Hematology *WHO/ LAB/1998*

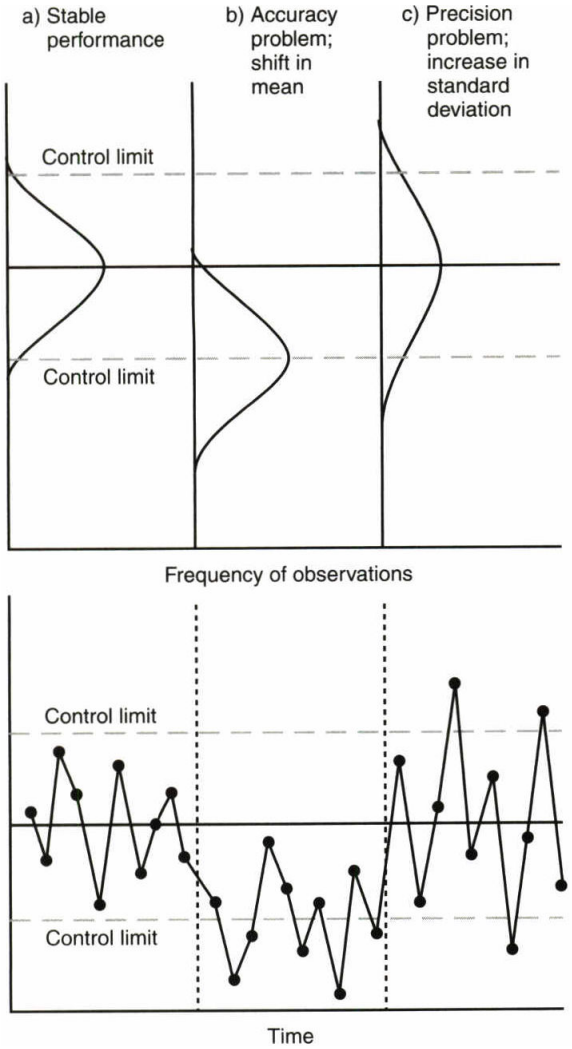
• یک خوانده خارج از محدوده mean± 2 SD	هشدار
• یک خوانده خارج از محدوده mean± 3 SD	غیر قابل قبول (خطای سیستماتیک یا راندوم)
• دو خوانده پیاپی خارج از محدوده mean± 2 SD	غیر قابل قبول (خطای سیستماتیک)
• ۴ خوانده متوالی خارج از محدوده 1 SD + یا 1 SD−	غیر قابل قبول(خطای سیستماتیک)
• ۶ خوانده متوالی یک طرف میانگین	هشدار (خطای سیستماتیک)

توجه :آزمایشگاه می تواند براساس شرایط و سطح کیفیت مورد نیاز خود هر یک از روشهای تفسیر Levy Jenning ، Westgrad یا WHO را انتخاب نماید.

نکته: بطور معمول چارتهای کنترلی هر ماه بازبینی و تمام مقادیرمعتبر برای محاسبه میانگین و انحراف معیار ماه بعد لحاظ می‌شود.

منظور از مقادیر معتبر ، مقادیری از کنترل است که بر اساس روش تفسیربکار گرفته شده قابل قبول بوده و براساس آن نتایج بیماران گزارش شده است .

انواع خطا :



همانطور که قبلا گفته شد در شرایط معمول ، با تکرار آزمایش، انتظـار مـی‌رود نتـایج در دو طـرف میـانگین پخـش شـده و پراکندگی مناسب داشته باشند(منحنی سمت چپ a) .

اگر نتایج بطور ثابت بیشتر یا کمتر از میانگین ، قرائـت شـوند (منحنی وسط b) خطای سیستماتیک رخ داده است که در نتیجه آن میانگین نتایج نیز تغییر می‌یابد .

اگر علیرغم ثابت ماندن میانگین ، پراکندگی نتایج افزایش یابـد ، خطای راندوم یا تصادفی اتفاق افتاده است. این خطا با افـزایش یـافتن انحـراف معیارمـشخص شـده و منحنـی بجـای شـکل زنگوله‌ای،نمای پهنی پیدا می‌کند (منحنی سمت راست c) .

خطاهای ذکـر شـده در طـول زمـان ،روی نمـودار زیـرین نیـز نمایش داده شده است.

اقدامات اصلاحی

صرف نظر از قوانین تفسیر ، قرائت کنترل خارج از محدوده مورد انتظار ، بدین معناست که نتایج بیماران از کیفیت مناسب برخوردار نبوده و نباید گزارش شوند. در این حالت باید مشکل را جستجو و آنرا برطرف نمود.

بسیاری از مراجع علمی معتقدند در یک برنامه کنترل کیفیت که بطور مناسبی طراحی شده ، باید به محض مشاهده خطا ، عامل ایجاد آن را جستجو و پس از رفع، اقدام به آزمایش مجدد کنترل نمود. علیرغم این موضوع اغلب ، به حجم رساندن مجدد یک کنترل تجاری و آزمایش آن ، اولین اقدامی است که پس از مشاهده یک نتیجه نامناسب ، توسط آزمایشگاه صورت می‌گیرد. چرا که احتمال بروز مشکلاتی در خود کنترل تجاری مانند افت غلظت ، آلودگی ، تبخیر یا مسائلی از این دست وجود دارد.در مراحل بعدی باتوجه به نوع خطا (راندوم یا سیستماتیک)سایر موارد ایجاد خطا در نظر گرفته و جستجو می شود.

مثالهایی ازعوامل ایجاد خطا به تفکیک نوع خطا ، ذیلا آمده است:

خطای راندوم :

- دمای ناپایدار
- نوسانات جریان الکتریکی دستگاه قرائت‌کننده

- 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 ...
- اشکال در سیستم قرائت‌کننده
- ...

خطای سیستماتیک

- اشکال درکالیبراسیون مانند درنظرگرفتن ارزش نادرست برای کالیبراتور، تهیه نامناسب، آلودگی ، افت، تغلیظ، تغییرشماره 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 دروسایل انتقال‌دهنده نمونه یا معرف مانند سمپلر
- ....

باید در نظر داشت که برخی مشکلات بوسیله آزمایشگاه قابل حل نبوده و لازم است به شرکت پشتیبان دستگاه یا معرف اطلاع داده شوند.

چارت کنترلی تجمعی **Cumulative Sum** (Cusum) **Control chart**

Cusum روشی است که جمع جبری اختلافات نتایج آزمایش نمونه کنترلی را با میانگینی که در ابتدا تعیین شده بود، بررسی می‌نماید وبه خطاهای سیستماتیک حساس می‌باشد. در شرایط معمول، نتایج کنترلها در اطراف میانگین (بالاتر و پائینتر) 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 می‌شود.

برای اجرا و تفسیر چارت Cusum دو راه وجود دارد:

- V-mask
- محدوده تصمیم گیری (decision limit)

از آنجائیکه روش محدوده تصمیم گیری(decision limit)، ساده‌تر بوده و قابلیت اجرای کامپیوتری نیز دارد ، در این دستورالعمل راجع به این روش توضیح داده می‌شود.

۱- کنترل را ۲۰ بار آزمایش و میانگین وانحراف معیار آن را محاسبه نمائید. (مطابق مراحل ۱ تا ۵ در بخش اجرای گام به گام کنترل داخلی کیفیت)

۲- چارت کنترلی ترسیم نمائید که در آن محور y نشانگر Cusum و خط مرکزی آن Cusum صفر (به منحنی صفحه ۴۲ توجه کنید) باشد.

۳- برای تفسیر Cusum بروش محدوده تصمیم گیری (decision limit) باید دو محدوده را مشخص نمائید

- K_l و K_u که بطور معمول mean ±1 SD در نظر گرفته می‌شود.
- h_l و h_u که محدوده کنترل است و اغلب ±2.7SD برای آن در نظر گرفته می‌شود.

۴- در هر سری کاری یک نمونه کنترل آزمایش و نتیجه آن را با محدوده mean±1SD مقایسه کنید **مادامیکه نتیجه در این محدوده قرار داشت Cusum را اجرا نکنید. در این مرحله علامتگذاری چارت انجام نمی‌شود.**

۵- به محض اینکه کنترل از محدوده mean±1SD خارج شد ، اختلاف نتیجه مشاهده شده را با K_l (mean-1SD) یا K_u (mean+1SD) محاسبه نمائید (این اختلاف در مثال زیر بصورت d_i نمایش داده شده است).Cusum در هر سری از جمع جبری اختلاف جدید(d_i) با جمع جبری قبلی(Csi) بدست می‌آید. عدد بدست آمده ، روی منحنی علامتگذاری می‌شود.

۶- Cusum بر اساس شیب منحنی پیگیری می شود تا زمانیکه

- جهت منحنی عوض شود یعنی علامت جمع جبری از مثبت به منفی یا برعکس از منفی به مثبت تغییر یابد، که در اینجا شرایط تحت کنترل قرار گرفته است.
- مقدار جمع جبری از h_l (±2.7SD) و h_u فراتر رود که در این حالت شرایط از کنترل خارج شده است. لذا Cusum تا زمان شناسایی عوامل ایجاد خطا قطع می‌گردد.

مثال:

آزمایشگاهی تری‌گلیسرید را در نمونه کنترلی اندازه‌گیری نموده و میانگین ۱۰۰ و انحراف معیار ۵ بدست آورده و مطابق موارد ذکر شده دربند ۳ محدوده‌های کاری خود را محاسبه نموده است.

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

سپس در هر سری کاری ، نمونه کنترل را آزمایش ونتایج را در جدول۲-۲ درج نموده است.
اختلاف هر روز با K_l یا K_u بصورت d_i و جمع جبری بصورت ***Csi*** نمایش داده شده است.

جدول۲-۲

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

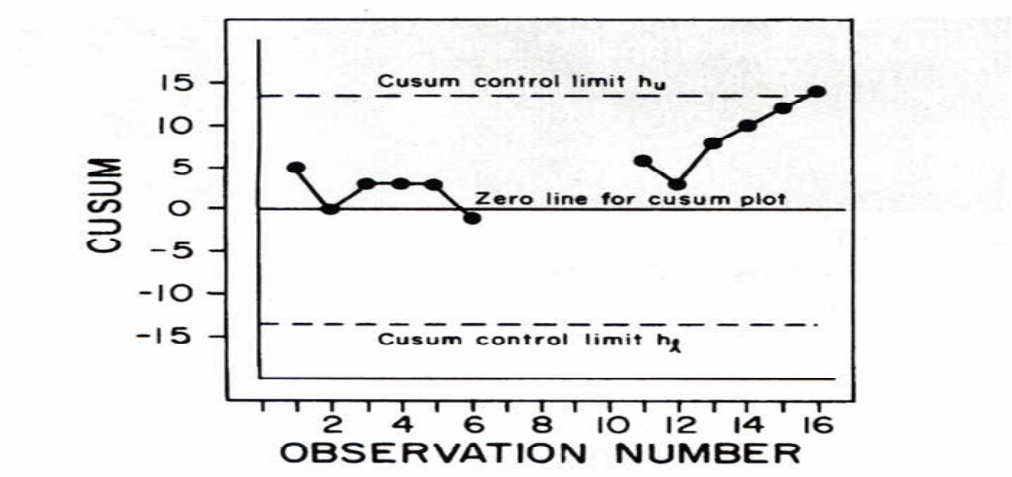
Control Observation Number	Control Value	d_i	CS_i	Comment
1	110	+5	+5	Start cusum calculation
2	100	−5	0	
3	108	+3	+3	
4	105	0	+3	
5	105	0	+3	
6	101	−4	−1	End cusum calculation
7	96			
8	105			
9	101			
10	101			
11	111	+6	+6	Start cusum calculation
12	102	−3	+3	
13	110	+5	+8	
14	107	+2	+10	
15	107	+2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

همانطور که مشاهده می شود در روز اول ، نتیجه کنترل ۱۱۰ قرائت شده که ۵ واحد بیش از K_u (۱۰۵)بوده است لذا Cusum شروع شده و اختلاف d_i بصورت ۵+ نمایش داده شده است. روز دوم کنترل ۱۰۰خوانده شده که ۵ واحد کمتر از K_u (۱۰۵) می‌باشد پس مقدار d_i برابر۵- بوده که با ۵+ جمع جبری(دو عدد داخل بیضی) و ***Csi*** صفر بدست می‌آید. هنوز علامت ***Csi*** عوض نشده پس Cusum ادامه می‌یابد.

Cusum در دو حالت متوقف می گردد :

- وقتی علامت ***Csi*** تغییر یابد . در روز ششم مثال فوق ، علامت ***Csi*** از مثبت به منفی تغییر یافته که نشان می دهد شرایط تحت کنترل در آمده است .
- وقتی مقدار ***Csi*** از حد h_l یا h_u خارج شود . مثال این مورد روز شانزدهم است که در آن ***Csi*** به۱۴ رسیده که بیش از h_u یعنی ۱۳،۵ است. در این حالت شرایط از کنترل خارج شده است. پس باید خطاهای احتمالی شناسایی و رفع گردد.

مثال فوق در منحنی زیر نیزنمایش داده شده است.



Cusum نسبت به چارت کنترلی Levy – Jenning حساسیت بیشتری نسبت به خطای سیستماتیک دارد. این برتری در مورد قوانین چندگانه وستگارد ، صادق نمی‌باشد زیرا قوانین مختلف وستگارد طوری طراحی شده‌اند که خطاهای سیستماتیک و راندوم را شناسایی نمایند.

کنترل کیفیت براساس نتایج آزمایش بیماران

مکانیسمهای QC بر اساس نتایج بیماران اغلب بعنوان مکملی برای روشهای معمول کنترل کیفیت ، طراحی می‌گردند. اگرچه این روشها وقت‌گیر بوده و مقاصد QC را بطور کامل تامین نمی‌نمایند ، اما بعضا موفق به یافتن خطاهایی می شوند که در تکنیکهای معمول QC قابل تشخیص نیستند .

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

۱- نتایج هر بیمار بطور انفرادی

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

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

هماهنگی با علائم بالینی

مقایسه نتایج آزمایشگاهی با علائم بالینی بیمار در آزمایشگاههایی که تعداد زیادی از بیماران را پذیرش می‌کنند ، تقریبا غیر ممکن است .ضمن اینکه افراد مختلف در زمان ابتلا به بیماری واحد ، نتایج آزمایشگاهی یکسانی نداشته و الزاما همیشه علائم بالینی با نتایج آزمایشگاهی هماهنگی کامل ندارد.

این مشکلات، ارزش این روش را محدود به موارد واضحی مانند بدست آمدن بیلی روبین طبیعی در فرد مبتلا به ایکتر می‌نماید.

ازآنجائیکه پزشکان بطور مرتب با این مسائل مواجه هستند ، باید ترتیبی اتخاذ شود که پزشکان ضمن همکاری نزدیک با آزمایشگاه ، مشکلاتی از این قبیل را به آزمایشگاه منتقل نمایند.

هماهنگی با سایر نتایج آزمایشگاهی

اگر یک گروه از آزمایشها در زمان و مکان واحد انجام شود ، مسئول آزمایشگاه می تواند ارتباط آنها را بررسی نماید. مانند ارتباط میزان TSH و T4

آزمایشهای مضاعف (duplicate)در آزمایشگاه

برای این کار نمونه ها در در دو لوله ریخته شده و دوبار آزمایش می شوند . این روش در مواردی که کنترلهای پایدار تجاری در دسترس نمی باشد و یا بعنوان 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 انجام شود، خطای سیستماتیک نیز در آن دخیل و تفسیر آن مشکل می شود.

برای این بررسی در یک آزمایشگاه، تعدادی نمونه بصورت دوبل آزمایش ، اختلافات (d) آنها محاسبه و به توان ۲ رسانده می شود(d^2). سپس انحراف معیار اختلافات بر اساس فرمول زیر بدست می آید.

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

هر جفت جوابی که بیش از 2SD با هم اختلاف داشته باشند غیر قابل قبول شناخته می شوند. مثال این روش در بخش کنترل کیفیت در آزمایشهای خونشناسی آمده است.

دلتا چک با نتایج قبلی

اگرنتایج جدید هر بیمار با نتایج قبلی مقایسه شود، برخی خطاها مانند جابجایی نمونه یا جواب، شناسایی می‌گردد. اساس این روش براین موضوع استوار است که مقادیر آنالیتها در بدن یک فرد در مدت زمانی مشخص ، در محدوده مشخصی تغییر می کند . Ladenson دلتا چک را در مدت زمانی ۳ روز برای تعدادی از آنالیتها بررسی نموده که در جدول۳-۲ آمده است.

جدول۳-۲

Recommended Limits for Delta Checks

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

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

Limit checks

آزمایش بیمارانی که نتایج آنها در محدوده‌ای قرار گرفته که با شرایط فیزیولوژیک منافات دارد باید از نظر احتمال اشتباهات تایپی مانند قرار دادن ممیز در محل اشتباه ، بررسی گردد. مقادیر این محدوده بستگی به متد مورد استفاده دارد.

مثالهایی از این محدوده ها در جدول۴-۲ آمده است.

جدول۴-۲

Recommended Ranges for Limit Checks

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

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

۲- کنترل کیفیت براساس نتایج بیماران متعدد

مطالعات آماری نتایج بیماران بصورت گروهی، در تشخیص خطاهای سیستماتیک (shifts and drifts) مفید می‌باشد اما توانایی شناسایی خطاهای راندوم را نداشته و نمی تواند جایگزین روشهای معمول کنترل کیفیت با مواد پایدارکنترلی گردد. مقادیر حاصله از نتایج هر بیمار علاوه بر متغیرهای بخش آنالیتیک ، تحت تاثیر متغیرهای متعددی مانند شرایط دموگرافیک ، بیولوژیک ، پاتولوژیک و پرآنالیتیک قرار دارد. این مسئله باعث می‌شود کنترل کیفیت بر اساس نتایج بیماران متعدد ومحاسبه میانگین نتایج آنها ، نسبت به بررسی نتایج انفرادی هر بیمار ارجحیت داشته باشد.

میزان تغییرات میانگین یک گروه بیمار با شاخص آماری انحراف معیار از میانگین (Standard error of mean) یا به اختصار SEM بیان می‌شود که خود حاصل تقسیم انحراف معیار نتایج یک گروه بیمار بر مجذور تعداد آنان می‌باشد. بعبارتی هر چه تعداد بیماران مورد بررسی افزایش یابد، میانگین نتایج ، متحمل تغییرات کمتری خواهد بود.

مقادیر میانگین تابعی از مشخصات مراجعین به آزمایشگاه مانند نسبت زن به مرد ، نسبت بیماران بستری در بیمارستان ، ارجاع از کلینیکهای تخصصی و همچنین متغیرهای پرآنالیتیک مانند مدت بسته بودن تورنیکه و نحوه نگهداری نمونه می‌باشد و با تغییر هر یک از این موارد ، دستخوش تغییر می‌شود. از آنجائیکه هیچیک از این پارامترها دربرنامه های معمول QC با کنترلهای پایدار قابل بررسی نیستند، استفاده از نتایج بیماران می‌تواند بعنوان مکملی مناسب برای سایر تکنیکهای کنترلی ، استفاده گردد.

روشهای آماری برای پایش میانگین نتایج بیماران

یکی از راههای استفاده از نتایج بیماران، محاسبه میانگین نرمال average of normal(AON) یا mean of normal است و همانطور که از نام آن مشخص می باشد ، از میانگین نتایج نرمال بدست می‌آید، پس باید ابتدا نتایج غیرطبیعی را براساس محدوده مرجع حذف و سپس میانگین را محاسبه نمود.

همچنین می‌توان پس از گروه بندی افراد بر اساس شرایط، اقدام به محاسبه میانگین نمود که بنام weighted mean شناخته شده و شاخص حساستری برای شناسایی خطاها خصوصا برای تستهایی مانند اندازه گیری پروتئین و آلبومین می‌باشد.

الگوریتمBulls که امروزه بطورگسترده‌ای برای پایش دستگاههای سل‌کانتر بکار می‌رود ، از میانگین متحرک (moving average) برای ارزیابی اندکسهای خونی استفاده می‌نماید .

همانطور که قبلا گفته شد 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 علائم بالینی

این مطالعات اغلب بصورت گذشته‌نگر انجام شده و میزان موارد منفی و مثبت کاذب نتایج آزمایشگاهی را براساس تشخیص نهایی بررسی می‌نماید . این روش کیفیت نتایج آزمایشگاه را در درازمدت ، کنترل می‌کند.

اتومیشین وتجزیه گر خودکار در آزمایشگاه بیوشیمی

اصطلاح اتومیشین در بیوشیمی بالینی توصیف کننده ابزارهایی است که بررسی بیوشیمیایی کمیت ها را با حداقل دخالت تکنولوژیست انجام میدهد.

انواع تجزیه گر خودکار

تجزیه‌گرهای خودکار براساس ماهیت معرف مورد استفاده به تجزیه‌گرهای با معرف مایع و بدون معرف مایع مانند سیستمهای Opus، Vitros ، Kodak Ektachem تقسیم بندی میشوند . سیستمهای با معرف مایع در ایران رایجتربوده و بهمین جهت در این دستورالعمل مورد بحث قرار گرفته‌اند.

ساختمان کلی تجزیه گرهای خودکاربا معرف مایع، شامل قسمتهای زیر میباشد :

منبع نوری، منوکروماتور، محفظه کووت، انکوباتوربرای ایجاد دمای مناسب واکنش، بازوی مکنده معرف، بازوی مکنده نمونه Sample / Reagent probe، دتکتور و واحد اطلاعات و پردازش

این سیستمها براساس روش انتقال نمونه به دو دسته Continuous- flow و Discrete Analyzer تقسیم میشوند. در تجزیه گرهای خودکار Continuous- flow نمونه از طریق بازوی مکنده نمونه(Sample probe) به جریان مداوم معرف وارد میشود ولی در سیستمهایDiscrete نمونه توسط Probe به محفظه واکنش خاص انتقال می‌یابد.

نکات مهم در استفاده از تجزیه گر خودکار بیوشیمی

- آشنائی کامل با دستگاه قبل از شروع به کار
- ایجاد شرایط الزامی برای عملکرد صحیح دستگاه بطور مثال برق مناسب ویا آب با خلوص خاص
- استفاده از برنامه اختصاصی ارائه شده سازنده کیت برای دستگاه مورد استفاده
- عدم استفاده از کنترل به جای کالیبراتور در عمل کالیبراسیون، در کالیبراسیون کمیتها باید به غلظت مناسب کالیبراتور نیز توجه داشت بطور مثال برای کالیبراسیون HDL میباید از کالیبراتورمخصوص همین کمیت استفاده کرد نه از کالیبراتور کلسترول توتال.
- استفاده ازکالیبراتوروکنترل های مورد توصیه سازنده کیت یا استفاده از کالیبراتوروکنترلهای هماهنگ
- عدم تغییر فاکتور اعلام شده سازنده کیت برای آنزیم ،این عمل که ممکن است به منظور تصحیح کنترل قرائت شده صورت گیرد مشکلات احتمالی از قبیل عدم کفایت، ناپایداری معرف و امکان تداخل زمینه سرم کنترل با معرف ویا اشکال در دمای انکوباتور سیستم را پوشانده و مانع یافتن خطای واقعی میگردد .

نگهداری و کنترل کیفیت تجزیه گر خودکار

- برای حفظ کیفیت عملکرد تجزیه گر خودکار لازم است کلیه موارد یاد شده در دستورالعمل همراه جهت نگهداری و سرویس دستگاه رعایت گردد.

برای سرویس و کالیبراسیون سیستم برنامه زمانبندی شده تهیه و سوابق مکتوب اجرای آن نگهداری گردد.

- برای بررسی عملکرد دستگاه پس از هر سرویس و کالیبراسیون انجام تستهای زیر توصیه میشود :

سنجش عملکرد پروبها : تستی انتخاب میشود که برای انجام آن کمترین حجم نمونه و بیشترین حجم معرف برداشت می‌شود . مانند پروتئین در سیستم های RA . سپس یک نمونه کنترل ۳۰ بار مورد اندازه گیری پروتئین قرار

میگیرد .پراکندگی نتایج حاصله برحسب CV% نباید بیش ازمقدار خطای مجاز اندازه گیری پروتئین ویا میزان خطای مجاز ادعا شده سازنده کیت باشد .

دمای انکوباتور : برای بررسی پایداری دمای انکوباتور دستگاه، تستی انتخاب میشود که به تغییرات دما حساس است مانند اندازه گیری آنزیم ALT . سپس یک نمونه کنترل ۳۰ بار مورد سنجش ALT قرار میگیرد. پراکندگی نتایج حاصله برحسب CV% نباید بیش مقدار خطای مجاز اندازه گیریALT ویا میزان خطای مجاز ادعا شده توسط سازنده کیت باشد .

انتقال ناخواستهCarry Over : در دستگاه تجزیه‌گر خودکار ممکن است نمونه یا معرف بطور ناخواسته انتقال یابند.

برای بررسی انتقال ناخواسته معرف، پیشنهاد میگردد از دوتستی که NADH را اندازه گیری می‌نمایند، استفاده شود. بطور مثال آزمایشهای LDHو ALT که یکی افزایش NADH و دیگری کاهش آنرا اندازه گیری میکند .

بدین ترتیب که برروی یک نمونه کنترل دریک سری کارو به ترتیب زیر، ۳۰بار آزمایش LDH و ۱۰ بار ALT انجام میشود .

1. LDH
2. LDH
3. LDH – ALT
4. LDH
5. LDH
6. LDH – ALT
7. ….

30 LDH-ALT

میزان پراکندگی نتایج اندازه‌گیری LDH برحسب CV اندازه گیری میشود.

سپس در یک سری کاری ۳۰بار LDH به تنهایی (بدون همراهی با ALT) اندازه گیری و پراکندگی نتایج حاصله برحسب CV محاسبه میشود.

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

انتقال ناخواسته نمونه با انجام آزمایش برروی نمونه های با غلظت بالا و پایین کمیت های انتخابی، بطور متوالی بررسی میشود .به طور مثال گلوکز با غلظتهای ۵۰ و ۵۰۰ میلیگرم درصد ویا ALT در غلظتهای بالا و پایین انتخاب شده بطور متناوب هریک ازنمونه‌های با غلظتهای پایین(L) و بالا (H) سه بار مورد آزمایش قرار می‌گیرند

H-H-H -L-L-L-H-H-H-L-L-L-…

پراکندگی نتایج غلظتهای پایین مورد محاسبه قرار میگیرد .

سپس در یک سری کاری مجزا، نمونه با غلظت پایین به تنهایی و به دفعات اندازه گیری و پراکندگی نتایج حاصله برحسب CV% محاسبه میشود.

پراکندگی برحسب CV% در حالت اول نباید بیش از پراکندگی حاصله از تکرار همین نمونه به تنهایی و در سری کاری مجزا باشد.در غیر این صورت تداخل در برداشت نمونه وجود داشته است .

- اجرای برنامه کنترل داخلی کیفیت Internal Quality Control برای کلیه کمیت های اندازه‌گیری شده با دستگاه جهت بررسی قابلیت تکرار و عضویت در برنامه ارزیابی خارجی کیفیت EQAS جهت بررسی صحت عملکرد دستگاه تجزیه گر خودکار الزامی است .
- برای بررسی کاملتر عملکرد تجزیه گرهای خودکارمیتوان به دستورالعمل های ECCLSو CLSI رجوع نمود

فصل سوم

اصول کنترل کیفیت در آزمایشهای شایع هماتولوژی

مقدمه ای براصول کنترل کیفی در آزمایشگاه خونشناسی

آزمایشهای هماتولوژی مانند سایر تستهای آزمایشگاهی نیاز به برنامه‌های تضمین کیفیت مناسب دارند. از آنجائیکه بسیاری از آزمایشهای هماتولوژی ، کمی quantitative می‌باشند ، می‌توان از موارد ذکر شده در فصل دوم این مجموعه برای کنترل کیفیت آنها استفاده نمود.

در این فصل ضمن مرور مطالب گذشته ، موارد خاص مربوط به آزمایشهای هماتولوژی مطرح می‌شود.

بنابه توصیه سازمان جهانی بهداشت هر آزمایشگاه هماتولوژی متناسب با شرایط موجود نظیر تعداد کارکنان، تعداد نمونه ها ، تجهیزات بکار رفته، تنوع آزمایشها و... می بایست جهت اجرای برنامه تضمین کیفیت از تعدادی از روشهای کنترل کیفی زیر استفاده نماید:

برنامه های دائمی:

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

برنامه های روزانه:

- استفاده از نمونه کنترل در هر سری کاری
- رسم نمودار کنترل با استفاده از نمونه کنترل
- انجام آزمایشهای مضاعف یا دوتایی duplicate برروی تعدادی از نمونه های بیماران (معمولا ۳-۴ نمونه در هر سری کاری)
- انجام آزمایش بازبینی (Check Test) برروی تعدادی از نمونه های بیماران (آزمایش ۳-۴ نمونه از سری کاری قبلی)
- بررسی تفاوت نتایج یک بیمار با آزمایشهای قبلی خودش (delta check)
- محاسبه میانگین اندکسهای خونی MCV ، MCH ، MCHC در صورت استفاده از سل کانتر
- محاسبه میانگین MCHC در صورت استفاده از روشهای دستی

اصول کار با دستگاههای شمارشگر سلولی اتوماتیک (سل کانتر)

۱- کار با دستگاه سل کانتر نظیر روشن کردن دستگاه ، توجه به گیجهای (gauge) فشار (برحسب نوع دستگاه و در صورت نیاز) ، نگهداری دستگاه (شستشوهای روزانه ، هفتگی ، ماهیانه و سایر موارد لازم) ، خاموش کردن آن و ... می‌بایست بطور کامل مطابق کاتالوگ دستگاه یا آموزش کارشناسان شرکت پشتیبان صورت گیرد . تاریخ وشرح آموزش توسط شرکت پشتیبان می بایست بصورت مستند موجود باشد .

درصورت تعویض کاربر دستگاه ، می بایست از آموزش وی در مورد چگونگی کار با دستگاه و نحوه نگهداری و اصول کنترل کیفی اطمینان حاصل نمود .

۲- کلیه موارد مربوط به نگهداری دستگاه ، از قبیل تاریخ انجام شستشوهای لازم ، تعمیر ، سرویس ویا تعویض محلولها می‌بایست ثبت ونگهداری شوند.

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

۴- در صورت وجود نمونه به تعداد زیاد بهتر است در فواصل آزمایشها ، دستور شستشوی دستگاه اجرا شود.

۵- بطور کلی دستگاههای سل کانتر **هر شش ماه** یکبار می بایست کالیبر شوند ولی انجام این امر در مواردی مانند ابتدای راه‌اندازی، پس از هر بار تعمیر یا سرویس ، قابل قبول نبودن نتایج کنترل کیفی روزانه ، ویا تعویض محلولها (در صورتیکه موجب تغییر مشخص در نتایج خون کنترل و یا نمونه بیماران شده باشد) نیز ضروری می‌باشد.

۶- هر روز قبل از شروع آزمایش بر روی نمونه ها ، می‌بایست نمونه خون کنترل با تاریخ انقضای معتبر با دستگاه آزمایش شده و پس از اطمینان از قابل قبول بودن نتایج آن با استفاده از نمودار کنترل ، نسبت به آزمایش نمونه مراجعین اقدام گردد . (توضیح در مبحث کنترل کیفیت سل کانتر آمده است .)

۷- در صورت عدم وجود خون کنترل و یا برای کامل کردن ارزیابی عملکرد دستگاه ، می‌بایست روزانه از آزمون آماری T-Brittin استفاده شود . (توضیح این روش در مبحث کنترل کیفیت سل کانتر آمده است .)

۸- بررسی عدم دقت وعدم صحت دستگاه بطور منظم انجام گردد.(در مبحث کالیبراسیون و کنترل کیفیت سل کانتر آمده است .)

نکته :جهت رعایت اصول ایمنی و جلوگیری از بروز اشکالات مربوط به نوسانات برق وجود سیم اتصال به زمین و تثبیت کننده نوسانات برق برای سل کانتر ضروری می باشد .

محلول های سل کانتر

۱- محلولهای دستگاه می بایست با تاریخ انقضا و سری ساخت مشخص از شرکت پشتیبان ویا سایر شرکتهای معتبر تهیه شوند

۲- وجود ذرات اضافی و نامحلول در این محلولها باعث تداخل در شمارش زمینه (Background) و خطا در شمارش سلولهای خونی خصوصا پلاکت می گردد.

۳- هنگام تعویض هر محلول تاریخ بازشدن روی آنها ثبت گردد.

۴- هیچگاه ته مانده محلول قبلی به محلول جدید اضافه نشود .

کالیبراسیون و کنترل کیفیت سل کانتر

کالیبراسیون

جهت کالیبراسیون سل کانترها کالیبراتورهای تجارتی وجود دارد که مقادیر هدف یا مورد نظر درآنها با روشهای مرجع کالیبر شده‌اند . این سوسپانسیون سلولهای خونی درصورت داشتن تاریخ انقضای معتبر وتاییدیه های لازم و بشرط رعایت دستورالعملهای کارخانه سازنده برای کالیبراسیون دستگاهها مناسب می باشند .موفقیت روند کالیبراسیون را می توان بوسیله آزمایش نمونه کنترل ، مقایسه نتایج دستگاه با انجام روشهای مرجع بر روی چند نمونه خون و کنترل دقیق میانگینهای متحرک در مورد شاخصهای گلبولهای قرمز تایید نمود .

درصورت عدم دسترسی به کالیبراتورهای تجارتی یاوجود هرگونه شکی نسبت به اعتبار آن **استفاده ازخون کامل جهت کالیبراسیون** ضروری می باشد . برای کالیبراسیون باید از خون طبیعی تازه ، استفاده کرد. برای اینکار پارامترهای حداقل ۳ نمونه خون کامل طبیعی دو بار با روشهای مرجع دستی و دو بارنیز با سل کانتر اندازه‌گیری شده و پس از محاسبه میانگین هر پارامتر با روش دستی و دستگاهی، با استفاده از فرمول زیر فاکتور کالیبراسیون تعیین می گردد.

لازم به ذکر است روشهای مرجع برای اندازه گیری هموگلوبین ، هماتوکریت و شمارش گلبولهای سفید به ترتیب سیان‌مت‌هموگلوبین ، میکروهماتوکریت و استفاده از لام نئوبار می‌باشند . اخیرا در کتب مرجع کولترهای تک کاناله ،به عنوان روش مرجع برای شمارش گلبولهای سفید ، گلبولهای قرمز و پلاکتها عنوان شده اند که بعلت عدم دسترسی به این تجهیزات در کشور ما کماکان از لام نئوبار برای شمارش سلولهای خونی استفاده می شود ولی بعلت خطای زیاد در شمارش گلبولهای قرمز و پلاکتها با این روش ، بهتر است از شرکت پشتیبان برای کالیبراسیون این دو پارامتر استفاده نمود

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

مثال: اگر میانگین اندازه گیری هموگلوبین به روش دستی ۱۴۰ گرم در لیتر وبا سل کانتر ۱۴۵ گرم در لیتر باشد، فاکتور تصحیح کالیبراسیون دستگاه با استفاده از فرمول زیر محاسبه می گردد:

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

در نتیجه ضریب کالیبراسیون دستگاه برای هموگلوبین می بایست ۳/۴۴ ٪ کاهش یابد. بعنوان مثال اگر ضریب کالیبراسیون دستگاه قبلا ۱۰۰ بوده می‌بایست ۳/۴۴ ٪ کاهش یافته و روی ۹۶/۵۶ تنظیم گردد.

در بعضی از انواع سل کانترها مثل گروه سیسمکس ضریب کالیبراسیون جدید با استفاده از فرمول کالیبراسیون مندرج در کاتالوگ ، مستقیما به ترتیب زیر محاسبه می شود:

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

کنترل کیفیت

۱- از نمونه‌های کنترل سلولهای خونی که بطور تجارتی دردسترس می باشند می توان هرروز صبح و به فواصل درطی روزاستفاده و نتایج حاصله را بر روی نمودار ثبت نمود . برای رسم نمودار، می بایست نمونه کنترل ، به دفعات و درفواصل مختلف با دستگاه آزمایش شود تا حداقل ۲۰خوانده برای هر پارامتر حاصل گردد .پس ازمحاسبه میانگین و انحراف معیار های 1SD ± ، 2SD ± و 3SD ± برای هر پارامتر مقادیر آنها بر روی محور عمودی و روزها بر روی محور افقی ثبت می‌گردد. . همانطور که در فصل دوم توضیح داده شد ، تفسیرنمودار کنترل کیفیت با استفاده از قوانین لوی جنینگ ، وستگارد یا WHO صورت می گیرد .

تفسیرنمودار کنترل(توصیه سازمان جهانی بهداشت *WHO/ LAB/1998*)

(1) One control value outside the mean ± 2SD	Warning
(2) One control value outside the mean ± 3SD	Reject:SE or RE
(3) 2 consecutive controls exceed mean ±2SD	Reject:SE
(4) 4 consecutive controls exceed mean +1SD or mean -1SD	Reject:SE
(5)6 consecutive controls on one side of the mean	Warning:SE

SE=Systematic error
RE=Random error

۲- در صورت فقدان خون کنترل و یاجهت کامل شدن روند کنترل کیفیت سل کانترمی توان از نمونه هـای خـون بیماران استفاده نمود .باتوجه به پایداری پارامترهایی نظیرWBC،RBC،Hb ،HCT و اندکسهای خونی درنمونه خون به مدت ۲۴ ساعت دردمای ۴ درجه سانتیگراد، میتوان در روز اول حـداقل ۵ وترجیحـا" ۱۰ نمونـه کـه دارای مقـادیر طبیعـی می‌باشند را پس از آنالیز دریخچال نگهداری نموده ودر روز بعد مجددا" مورد آزمایش قرار داد و وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر نمونه های جفت را با استفاده از آزمون آماری T-Brittin محاسبه نمود

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

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

n تعداد جفتهای مورد بررسی

d اختلاف بین دو خوانده (روز به روز)

SD انحراف معیار اختلافات

مقدار t برای هر متغیر محاسبه گشته که اگر مقدار آن برای ۵ نمونـه از ۲/۷۸ و بـرای ۱۰ نمونـه از ۲/۲۶ بیـشتر باشد ، با اطمینان ۹۵٪ می توان گفت که بین مقـادیر شـمارش شـده در دو روز ، اخـتلاف معنـی دار وجـود دارد . وجـود اختلاف معنی دار برای یک متغیر بیانگر اشکال احتمالی بوده که در صورت تداوم آن جهت رفع اشکال می‌بایـست اقـدامی صورت گیرد.

مثال در صورتیکه نتایج حاصل از اندازه گیری هموگلوبین ۵ نمونه خون با استفاده از یک دستگاه سل کـانتر در دو روز متوالی مطابق جدول زیر باشد، عملکرد دستگاه با کمک فرمول T-Brittin به صورت زیر بررسی می گردد:

$$SD = \sqrt{\frac{91 - \frac{9}{5}}{4}} = 4.72$$

$$tn = \frac{0.6\sqrt{5}}{4.72} = 0.28$$

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

جدول ۱-۳

مقدار هموگلوبین روز اول	مقدار هموگلوبین روز دوم	d	d^2
123	120	-3	9
135	139	4	16
176	181	5	25
155	150	-5	25
142	138	-4	16

$\Sigma d = -3$ $(\Sigma d)^2 = 9$ ۳

$\Sigma (d^2) = 91$ $\bar{d} = \Sigma d / 5 = 3/5 = 0.6$

۳-بررسی عدم دقت (CV) دستگاه بدو صورت انجام می شود .در صورت استفاده از خون کنترل ، می توان بـا استفاده از نتایج حاصله از نمونه کنترل که طی روزهای متوالی با دستگاه آزمایش شده، CV هر پـارامتر را محاسـبه نمود ودر صورت عدم دسترسی به خون کنترل ، می بایست از نمونه های روزانه برای اینکار استفاده کرد بدین ترتیـب که **هر ماه** دو یا بیشتر نمونه را حداقل ده بار با سل کانتر مورد آزمـایش قـرار داده و از نتـایج بدسـت آمـده CV هـر

پارامتر را محاسبه نمود . در صورت عدم مطابقت CV هر پارامتر با ادعای دستگاه که در کاتالوگ مربوطه آمده است تماس با شرکت پشتیبان ضروری می باشد.

مثال : اگرنتایج شمارش گلبولهای سفید یک نمونه توسط دستگاه سل کانتری به قرار زیر باشد ، میزان عدم دقت دستگاه برای شمارش مورد فوق به روش زیر محاسبه می گردد :

جدول ۲-۳

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

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

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

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

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

۴ - درصورت عدم امکان انجام تمامی آزمایشهای بصورت دوتایی (Duplicate) می بایست درهرسری کاری ۴-۳ نمونه به صورت مضاعف (Duplicate) آزمایش شوند تا با بررسی اختلاف خوانده ها از طریق محاسبات آماری از وجود خطاهای تصادفی آگاه شویم . افزایش اختلاف بین دو خوانده بیش از 2SD ، احتمال وجود خطای تصادفی را مطرح می نماید. فرمول زیر طریقه محاسبه SD نمونه های دو تایی را نشان می دهد:

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

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

اندازه گیری اول(g/L)	اندازه گیری دوم (g/L)	d	d^2
۱۲۰	۱۲۲	۲	۴
۱۶۱	۱۶۳	۲	۴
۱۱۰	۱۰۰	۱۰	۱۰۰
۱۴۰	۱۴۰	۰	۰
۱۳۴	۱۳۲	۲	۴
			۱۱۲

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

تفاوت بیشتر از2SD بین دو نتیجه آزمایش در نمونه سوم ، نمایانگر بروز خطای تصادفی و لزوم تکرار آزمایش برروی همان نمونه می باشد.

۵- یکی دیگر از روشهای کنترل کیفیت آزمایش بازبینی (Check Test) است که در صورت نگهداری نمونه ها در دمای مناسب (یخچال) قابل اجرا می باشد .بدین ترتیب که در ابتدای سری کاری یا صبح۳- ۴نمونه پس از آزمایش در یخچال نگهداری شده و در انتهای سری کاری و یا بعداز ظهر مجددا مورد آزمایش قرار گرفته و نتایج حاصل از این دو آزمایش با استفاده از Duplicate testمورد بررسی قرار گرفته که اختلاف نتایج محدوده 2SD قابل قبول می باشد .اگر نمونه ها درست نگهداری شده باشند هرگونه تغییری در نتایج خارج از این محدوده نشاندهنده اشکال درعملکرد دستگاه ویامعرفها می باشد.این آزمایش برای بررسی هموگلوبین مناسب بوده و به میزان کمتر برای شمارش گلبولهای قرمز و سفید کاربرد دارد ولی برای هماتوکریت بخصوص اگر فاصله زمانی آزمایش نمونه ها بیش از ۶ ساعت باشد کارایی ندارد.

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

۶- در مراکز آزمایشگاهی با پذیرش بیمار ّ] تعداد زیاد (حداقل روزی ۱۰۰ بیمار)، استفاده از مقادیر میانگین شاخصهای گلبولی **(MCHC, MCH, MCV)** بدلیل ثابت بودن در فواصل روزها وهفته‌ها، بعنوان روشی جهت ارزیابی کیفی عملکرد دستگاه توصیه می گردد به شرطی که نمونه های مورد آزمایش در روزهای مختلف تفاوت مشخصی با یکدیگر نداشته باشند . برای این منظور لازم است ابتدا نتایج غیر طبیعی حذف گردد سپس میانگین نتایج طبیعی محاسبه گردد. (به صفحه بخش روشهای آماری برای پایش میانگین نتایج بیماران مراجعه کنید) زیرا نتایج بیمارانی که شاخص‌های گلبولی متفاوتی دارند (بعنوان مثال مبتلایان به تالاسمی) میانگین را تغییر داده و ممکن است به غلط این تصور را ایجاد نماید که خطای سیستماتیک بروز کرده است.

وجود تفاوت بیش از ۳٪ بین مقادیر میانگین بدست آمده و مقادیر میانگین اصلی ، نشان دهنده بروز خطا و لزوم بررسی کالیبراسیون دستگاه می باشد.

۷- مقایسه مقادیر بدست آمده از یک نمونه با نتایج قبلی نمونه همان فرد (Delta check) به شرط درنظرداشتن نکاتی نظیر تغییرات فیزیولوژیک و روزانه پارامترهای خونی ، تحت درمان قرارگرفتن فرد به هر دلیل و تغییرات بالینی که باعث تغییرشمارش سلولها می گردند ، بعنوان روشی جهت کنترل کیفی بکار می رود . باتوجه به تغییرات روزانه طبیعی مقادیر خون در یک فرد ، وجود اختلافات واضح بیش از مقادیر ذکر شده در زیر نشان دهنده خطا می باشد .

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

۸- مقایسه نتایج دستگاه سل کانتر با گسترش خون محیطی : در این روش نتایج حاصله از شمارش پلاکت و WBC توسط سل کانتر با تعداد سلولهایی که در لام خون محیطی شمارش شده، مقایسه می‌گردد. در جدول زیر ارتباط میانگین تعداد سلولهای شمارش شده در گسترش خون محیطی با تعداد تخمینی سلولها نشان داده شده است.

بعنوان مثال اگر درگسترش خون محیطی با عدسی شیئی(۴۰×) ۶-۳ گلبول سفید دیده شود ، تعداد گلبولهای سفید بین ۱۰-۷ هزار خواهد بود.

جدول ۳-۳کنترل کیفی میکروسکوپی شمارش سلولهای خونی با استفاده از یک گسترش خونی مناسب

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

دستگاه میکرو هماتوکریت

دستگاه میکروهماتوکریت می بایست دارای مشخصات زیر باشد:

۱- شعاع چرخش بیشتر از ۸ سانتی متر ،

۲- توانایی رسیدن به حداکثر سرعت در عرض ۳۰ ثانیه،

۳- توانایی ایجاد RCF حدود ۱۰-۱۵ هزار g در محیط بمدت حداقل ۵ دقیقه بدون افزایش دما از 45° C.

۴- داشتن زمان سنج اتوماتیک (با قابلیت تنظیم حداقل ۳۰ ثانیه)

RCF=میدان نسبی سانتریفوژ

RPM=دور در دقیقه

RCF= Relative Centrifugal Field
RPM = Revolution Per Minute
$RCF=1.118 \times 10^{-5} \times r \times RPM^{2}$

کنترل کیفی و بررسی کالیبراسیون دستگاه میکروهماتوکریت

برای کنترل کیفی دستگاه توجه به موارد زیر ضروری می باشد:

- سرعت سانتریفوژ
- زمان سنج دستگاه
- حداکثر توان در تجمع سلول ها

سرعت سانتریفوژ(دوردقیقه) وزمان سنج دستگاه بترتیب با تاکومتر کالیبره و کرونومتر قابل بررسی میباشند.

برای بررسی حداکثر توان تجمع سلولی می توان از روش زیر استفاده نمود:

دو نمونه خون تازه حاوی ضد انعقاد K2EDTA که به خوبی مخلوط شده اند انتخاب می‌گردد. نمونه ها به مدت دو دقیقه سانتریفوژ شده و مقادیر آنها ثبت میشود، سپس ۳۰ ثانیه ،۳۰ ثانیه زمان سانتریفوژ را افزوده تا زمانیکه میزان دو هماتوکریت اندازه گیری شده پی در پی بدون تغییر بماند. این زمان به عنوان حداقل زمان لازم جهت متراکم نمودن گلبولهای قرمز در نظر گرفته می شود. این آزمایش بهتر است حداقل با یک نمونه دارای هماتوکریت ۰/۵ یا بیشتر نیز انجام شود .

جدول۶-۱

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

یافته‌های موجود در جدول بالا نشان میدهد زمان لازم جهت متراکم نمودن گلبولهای قرمز برای دستگاه میکروهماتوکریت مورد آزمایش، در نمونه ای با میزان هماتوکریت کمتر از ۰/۵، ۳/۵ دقیقه وبرای نمونه ای با مقدار هماتوکریت بیشتر از ۰/۵ ، ۴/۵ دقیقه می باشد.

در صورتیکه ارزیابی عملکرد دستگاه میکروهماتوکریت بصورت مستقیم امکانپذیر نباشد می‌توان از روش توصیه شده سازمان بهداشت جهانی جهت بررسی توان دستگاه به روش زیراستفاده نمود:

چند نمونه خون با هماتوکریت کمتر از ۰/۵ و حاوی ضدانعقادK2 EDTA (۱/۵میلی گرم برای هر میلی لیتر خون) پس از بیست بار سروته نمودن به صورت دوتایی به مدت ۳ ، ۵ ، ۷، ۹ و ۱۱ دقیقه سانتریفوژ و نتایج ثبت میگردد که در صورت مناسب بودن توان دستگاه (g) نتایج حاصله از دقیقه ۵ به بعد می بایست بدون تغییر باقی بماند .

جهت بررسی ابزار قرائت هماتوکریت می‌توان نمونه‌ای که هماتوکریت آن با خطکش میکروهماتوکریت ۰/۵ قرائت گردیده و طول ستون سلول و پلاسمای حدود ۵ سانتی‌متر دارد را انتخاب کرده و روی خطکش معمولی طوری قرار داد که ابتدای ستون گلبول قرمز روی خط صفر خطکش و انتهای ستون سلول و پلاسما روی ۵ سانتی‌متر قرار گیرد. قرار گرفتن انتهای بالای ستون سلول بر روی خط ۲/۵ سانتی‌متر نشاندهنده صحت قرائت توسط ابزار قرائت هماتوکریت مورد استفاده می‌باشد.

کنترل کیفیت آزمایشهای انعقادی

برای آزمایشهای انعقادی مانند سایر آزمایشهای کمی می بایست از نمونه پلاسما کنترل ودر صورت عدم دسترسی به پلاسما کنترل از مخلوط پلاسمای افراد طبیعی pooled plasma در هر سری کاری استفاده نمود.

نمونه کنترلی باید حتی‌المکان معیارهای مندرج در فصل دوم همین مجموعه (انتخاب مواد کنترلی) را اخذ نماید. استفاده از دو کنترل در دو سطح مختلف مورد توصیه مراجع بین‌المللی می‌باشد.

در صورت عدم دسترسی به کنترل تجاری، می‌توان از مخلوط پلاسمای افراد طبیعی pooled plasma استفاده نمود.نظر به اختلاف غلظت فاکتورهای انعقادی در افراد مختلف و با توجه به لزوم وجود فعالیت انعقادی ۱۰۰٪ ، برای تهیه این نمونه می‌بایست پلاسمای حداقل ۲۰ مرد و زن طبیعی(غیر حامله که OCP نیز مصرف نمی‌کنند)با هم مخلوط شود. پس از اطمینان از عدم آلودگی می‌توان نمونه را در لوله‌های پلاستیکی کوچک تقسیم و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد (دمای کمتر از ۵۰- ارجح می‌باشد) نگهداری نمود.

برای تعیین محدوده pooled plasma ، نمونه تهیه شده ، ۲۰ بار آزمایش و سپس میانگین و انحراف معیار نتایج محاسبه می‌شود. محدوده مورد انتظار mean ± 2SD می‌باشد.

در هر سری کاری می بایست نمونه کنترل یا pooled plasma مانند نمونه بیمار آزمایش و نتیجه آن با محدوده مورد انتظار مقایسه گردد. میزان مجاز پراکندگی نتایج برحسب CV حداکثر ۵٪ می‌باشد.

آزمایشهای انعقادی می بایست بصورت دوتایی انجام شوند. میزان تفاوت دونتیجه حاصله معیاری برای قابل قبول بودن نتایج است. برای این امر میانگین نتایج آزمایشهای دوتایی بر روی نمونه ها محاسبه شده و دو نتیجه‌ای که حداکثر به اندازه ۱۰ ٪ میانگین با هم فاصله داشته باشند، قابل قبول تلقی می‌شود و در غیر این صورت تکرار آزمایش ضروری می باشد .

جدول ۴-۳

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

فصل سوم

کنترل کیفیت آزمایشهای میکروب شناسی

برای کنترل کیفیت در آزمایشگاه میکروب شناسی باید به موارد زیر توجه داشت:

کنترل کیفیت آزمایشهای تعیین حساسیت میکروبی، محیط های کشت، رنگها ومعرفها، ابزار و دستگاهها(لوپ، فور، اتوکلاو وانکوباتور)

نظر به اینکه هدف نهایی کلیه فعالیت های آزمایشگاه میکروب شناسی انتخاب مناسبترین آنتی‌بیوتیک جهت درمان بیمار مبتلا به عفونت میباشد ، بعد ازمبحث شیوه نگهداری و استفاده ازسویه‌های باکتریایی که برای کنترل کیفیت کلیه مواد در آزمایشگاه میکروب شناسی مورد نیازهستند در ابتدا طرز تهیه کدورت۰/۵ مک فارلند برای استانداردسازی سوسپانسیون میکروبی لازم جهت تلقیح در محیط مولر هینتون آگار و نیز روش انجام آزمایشهای تعیین حساسیت میکروبی و کنترل کیفی آنها ذکر گردیده است.

سپس به دلیل قرار داشتن آزمایش های ادراری در زمره شایعترین آزمایشهای روتین، کنترل کیفیت لوپ ادراری آورده شده است.

جزوه حاضر شامل مهم ترین اجزای کنترل کیفیت برای کلیه آزمایشگاههادر هر سطح می‌باشد و سایر مباحث درنوبتهای بعدی ارائه خواهند شد.

نگهداری و استفاده از سویه‌های باکتریایی

برای نگهداری سویه‌های باکتریایی می‌توان از روشهای طولانی مدت و کوتاه مدت استفاده نمود.

نگهداری طولانی مدت

نگهداری طولانی‌مدت باکتریها این امکان را می‌دهد که کلیه سویه‌های میکروبی اعم از هوازی (بارشد سریع ویا سخت رشد) ونیز بیهوازی ، ماهها و حتی سالها به صورت زنده نگهداری شوند. بهترین روشهای نگهداری طولانی مدت شامل لیوفیلیزاسیون (Freeze drying) و نگهداری در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد یا پایین تر (در دیپ فریز یا در نیتروژن مایع) می‌باشد.

۱- نگهداری در دیپ فریز (۵۰- تا ۷۰- درجه سانتی‌گراد یا پایینتر) ویا نیتروژن مایع :

باکتری مورد نظر را روی محیط مغذی مانند پلیت (TSA (Trypticase Soy Agar حاوی ۵٪ خون گوسفند و در مورد میکروارگانیسمهای سخت رشد روی محیط آگار شکلاته کشت دهید. پلیتها را به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۲±۳۵ درجه سانتی‌گراد و در صورت نیاز تحت شرایط CO_2 برای هر باکتری انکوبه نمائید.

بعد از انکوباسیون، خالص بودن و مورفولوژی کلنی‌ها را بررسی نموده و در صورت نیاز، تستهای بیوشیمیایی آنرا انجام دهید. سپس از باکتری رشد یافته ، سوسپانسیون غلیظی در ۱۰۰-۵۰ میلی‌لیتر از یک محیط محافظت‌کننده از سرما (Cryoprotective) تهیه نمائید. این محیط برای جلوگیری از تخریب سلولهای باکتری در شرایط انجماد مورد استفاده قرار می‌گیرد. محیط محافظت‌کننده از سرما می‌تواند Skim milk ، خون گوسفند یا خرگوش دفیبرینه استریل یا Tryptic Soy Broth (TSB) حاوی گلیسرول با غلظت نهایی ۱۵-۱۰٪ باشد.

سپس از سوسپانسیون باکتریایی فوق به مقدارmL ۱- ۰/۵ در ویالهای شیشه‌ای یا پلاستیکی کوچک استریل توزیع کنید . تعداد ویال ذخیره خود را برای مصرف یکسال آماده نمائید.

ویالهای حاوی سویه‌ها را می‌توان در برودت ۵۰- تا ۷۰- درجه سانتی‌گراد به مدت یکسال نگهداری نمود. در صورت عدم دسترسی به فریزر ۷۰- درجه می توان سویه‌های با رشد سریع را در فریزر ۲۰- درجه نیز نگهداری نمود. در این شرایط توجه به نکات زیر ضروری است.

سویه‌های سخت رشد مانند هموفیلوس انفلوآنزا و نیسریا گنوره در این دما قابل نگهداری نمی‌باشند و باید در فریزر ۷۰- درجه نگهداری شوند.

سویه‌های بارشد سریع در این دما عمر کمی دارند و تعداد زیادتری از آنها از بین می‌روند. بنابراین توصیه می‌شود برای اطمینان از حیات سویه‌ها هر چند ماه ، طبق روش زیر کشت داده شوند.

یک ویال از فریزر بیرون آورده و و سریعا زیر آب جاری ولرم محتویات آنرا ذوب نمائید. نمونه را روی محیط آگار خوندار یا شکلاته (در مورد باکتریهای سخت رشد) تلقیح کرده و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۲±۳۵ درجه ودر صورت نیاز در شرایط CO_2 انکوبه نمایید. این باکتری می‌تواند برای آزمایشهای کنترل داخلی کیفیت در آزمایشگاه یا برای تهیه working control بکار رود. قبل از هر اقدام باید از خالص بودن نمونه ، اطمینان حاصل کرد. **ویال مورد استفاده بعد از ذوب شدن باید دور انداخته شده و بهیچوجه مجددا فریز نگردد.**

کشتهای working control : عبارتست ازکشت مجدد از کشت ذخیره فریز شده که برای کنترل کیفیت محیط کشت و.. استفاده می‌شود.

از کشت ذخیره تا ۳ پاساژ پشت سر هم می‌توان انجام داد . پس از آن ، نمونه باید دور انداخته شده و از یک کشت ذخیره فریز شده دیگر برای تهیه کشتهای working control استفاده شود. پاساژهای مکرر(بیش از ۳ پاساژ)، احتمال تغییر فنوتیپی سویه‌ها را افزایش می‌دهد.

برای تهیه working control ، از کشت ذخیره فریز شده ، روی پلیت یا آگار شیبدار تلقیح و آنرا به مدت یک شبانه‌روز تا زمانی که رشد مناسبی بدست آید، انکوبه نمائید. در مورد ارگانیسمهای با رشد سریع این پلیت یا آگار شیبدار را می‌توان در ۸-۲ درجه سانتیگراد یا در دمای اتاق تا مدت ۴ هفته نگهداری نمود. بعد از هر پاساژ، خالص بودن و مورفولوژی کلنی‌ها را بررسی نمائید.

۲- استفاده از روغن معدنی در دمای اتاق :

۱- محیط کشت Brain Heart Infusion Agar (BHIA) را با شیب کم در لوله تهیه نمایید. برای باکتریهای مشکل‌پسند مانند گونوکک ، مننگوکک ، استرپتوکک پنومونیه و هموفیلوس آنفلوانزا ، لازم است محیط شکلات آگار را با افزودن ۵٪ خون گوسفند به محیط فوق پس از خروج از اتوکلاو و رسیدن به دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و قرار دادن در بن‌ماری ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه تهیه نمود.

۲- روغن معدنی (یا پارافین مایع) را در حرارت خشک (۱۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یکساعت) استریل نمائید.

۳- میکروب مورد نظر را روی محیط کشت دهید.

۴- بعد از بدست آوردن کشت کافی ، روغن استریل را به مقدار cc ۱ روی سطح محیط بریزید.

۵- در صورت نیاز به کشت مجدد ، نمونه از سطح آگار (زیر روغن) برداشته می‌شود.

۶- بعد از ۱۲-۶ ماه تجدید کشت نمایید.

۳- کشت عمقی و نگهداری در دمای اتاق :

این روش فقط برای باکتریهایی که مشکل‌پسند نیستند مانند استافیلوکک وخانواده انتروباکتریاسه بکار می‌رود.

۱- یک محیط کشت آگار بدون کربوهیدرات مانند TSA را باعمق زیاد در لوله تهیه نمایید.

۲- باکتری را بصورت کشت عمقی در در این محیط تلقیح نمایید.

۳- این محیط را ۲۴ ساعت در اتو ۳۵ درجه انکوبه نمائید.

۴- در لوله را با درپیچ یا چوب پنبه ببندید.

۵- لوله در پیچ‌دار را در پارافین مایع فرو ببرید به گونه‌ای که کاملا در لوله را بپوشاند.

۶- کشتها را در حرارت اتاق نگهداری نمائید.

۷- هرساله سوش موردنظر را تجدید نمائید.

۴- کشت عمقی در محیط سیستین تریپتیکیس آگار (CTA) برای نیسریا و استرپتوکک :

۱- محیط CTA را در لوله تهیه نمایید .

۲- باکتری را بطو عمقی در این محیط کشت دهید.

۳- محیط را بمدت ۲۴ ساعت در اتو ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.

۴- در لوله را با چوب‌پنبه یا در پیچ ببندید.

۵- لوله در پیچ‌دار را در پارافین مایع فرو ببرید به گونه‌ای که کاملا در لوله را بپوشاند.

۶- برای نیسریا لوله را در ۳۵ درجه نگهداری و هر دو هفته کشت را تجدید نمائید . برای استرپتوکک لوله را در حرارت اتاق نگهداری کرده و هر ماه تجدید کشت کنید.

۵- محیط کشت Cooked meat برای باکتریهای بیهوازی :

۱- باکتری را در لوله‌های حاوی محیط Cooked meat کشت دهید.

۲- محیط را بمدت ۲۴ ساعت در اتو ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.

۳- در لوله را با چوب‌پنبه یا در پیچ ببندید.

۴- کشتها را در حرارت اتاق نگهداری نمائید.

۵- هردو ماه کشت را تجدید نمائید.

نگهداری کوتاه مدت

کشتهای working control که برای کارهای روتین روزانه استفاده می‌شوند ، به روشهای زیر تهیه می‌شوند:

- **باکتریهای با رشد سریع**

۱- سوش مورد نظر را در سطح محیط TSA لوله‌ای درپیچ‌دار کشت دهید.

۲- محیط را بمدت ۲۴ ساعت در اتو ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.

۳- پس از رشد کامل، لوله را در یخچال نگهداری کنید

۴- هر ماه کشت را تجدید نمائید.

- **استرپتوککها**

۱- سوش مورد نظر را در سطح آگار خوندار شیبدار(لوله‌ای درپیچ‌دار) کشت دهید.

۲- محیط را بمدت ۲۴ ساعت در اتو ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.

۳- پس از رشد کامل، لوله را در یخچال نگهداری کنید. (جهت استرپتوکک پنومونیه ، محیط را در دمای اتاق نگهداری کنید.)

۴- هر ماه کشت را تجدید نمائید.

- **مننگوکک و هموفیلوس**

۱- سوش مورد نظر را در سطح محیط آگار شکلاته لوله‌ای یا پلیت کشت دهید.

۲- محیط را بمدت ۲۴ ساعت در اتو ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.

۳- پس از رشد کامل، لوله را در حرارت اتاق نگهداری کنید

۴- هر۲ هفته کشت را تجدید نمائید.

- **گونوکک**

۱- سوش مورد نظر را در سطح محیط آگار شکلاته کشت دهید.

۲- محیط را بمدت ۲۴ ساعت در اتو ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.

۳- نمونه را در **دمای ۳۵ درجه** نگهداری نمایید.

۴- هر۲ روز یکبار کشت را تجدید نمائید.

تهیه کدورت نیم‌مک‌فارلند

برای استاندارد کردن غلظت تلقیح برای آزمایش تعیین حساسیت، باید از استاندارد سولفات باریم (BaSo4) که برای تهیه آن به روش زیر عمل می‌شود ، استفاده نمود.

۰/۵ میلی‌لیتر از کلرور باریم (BaCl2) 0.048 mol/L (W/V $BaCl_2/H_2O$ 1.175%) را به ۹۹/۵ میلی‌لیتراسید سولفوریک mol/L 0.18 (1% V/V) اضافه کنید و با هم زدن مداوم یک سوسپانسیون تهیه نمائید.

چگالی صحیح استاندارد با تعیین جذب این سوسپانسیون توسط اسپکتروفتومتر در کووت به قطر ۱ سانتی‌متر تعیین می‌شود. جذب در ۶۲۵ نانومتر باید بین ۰/۰۸ تا۰/۱۳ باشد.

از سوسپانسیون حاصله ۶-۴ میلی لیتر در لوله‌های درپیچ‌دار هم اندازه با لوله‌های سوسپانسیون باکتریایی ریخته می‌شود.

در لوله‌ها محکم بسته شده و در دمای اتاق نگهداری می‌شوند.

قبل از هر بار استفاده ، استاندارد با ورتکس مکانیکی به شدت همزده می‌شوند تا کدورت یکنواختی بدست آید.

در صورت مشاهده ذرات بزرگ ، باید استانداردتازه‌ای جایگزین شود.

استاندارد سولفات باریم ، باید بصورت ماهانه جایگزین گردیده یا جذب آن اندازه‌گیری شود.

کنترل کیفیت دیسک های آنتی بیوتیک جهت انجام آزمایش تعیین حساسیت میکروبی به روش *disk diffusion agar*

هدف

هدف از برنامه کنترل کیفی پایش و ارزیابی موارد زیر می باشد :

- صحت و دقت روش انجام آزمایش تعیین حساسیت
- مواد و وسایل به کار برده شده در این آزمایش
- عملکرد افرادی که آزمایش را انجام داده و نتایج بدست آمده را قرائت می نمایند.

به منظور دست یابی بهینه به این اهداف در دسترس داشتن سویه های کنترل کیفی تهیه شده از مراکز معتبر ضروری است .

سویه های کنترل کیفی پیشنهادی توسط CLSI عبارتند از:

Enterococcus faecalis ATCC 29212

Escherichia coli ATCC 25922

Escherichia coli ATCC 35218

Haemophilus influenzae ATCC 49247

Haemophilus influenzae ATCC 49766

Klebsiella pneumoniae ATCC 700603

Neisseria gonorrhoeae ATCC 49226

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Streptococcus pneumoniae ATCC 49619

E.coli ATCC 35218 فقط به عنوان یک میکروارگانیسم کنترلی برای ترکیبات ممانعت کننده بتالاکتاماز، مثل ترکیبات حاوی کلاولانیک اسید، سولباکتام یا تازوباکتام پیشنهاد می شود .

Enterococcus faecalis ATCC 29212 (یا *E.faecalis ATCC 33186*) برای ارزیابی محیط مولر هینتون آگار با دیسک تری متوپریم / سولفامتوکسازول استفاده می شود. درمحیط کشت قابل قبول ، هاله عدم رشد واضحی به قطر *mm* ۲۰ یا بزرگتر ایجاد می شود در حالیکه در محیطهای کشت غیر قابل قبول ، هاله عدم رشد ایجاد نمی شود یا در داخل هاله ، رشد کم مشاهده می شود و یا هاله ای با قطر کمتر از *mm* ۲۰ ایجاد میگردد. این کار به منظور بررسی مقادیر غیر قابل قبول تیمیدین در محیط کشت مزبور است .

Enterococcus faecalis ATCC 29212 همچنین برای کنترل دیسکهای آمینو گلیکوزید با دوز بالا به کار می رود.

Klebsiella pneumoniae ATCC 700603 به عنوان یک سویه کنترلی برای آزمایشات *ESBL* به کار برده می شود .

کنترل کیفیت قطر هاله عدم رشد سویه کنترلی/ دیسک آنتی بیوتیکی

سویه های کنترل کیفی را باید به روش استاندارد آزمایش *disk diffusion* و با استفاده از همان مواد و روشی که برای سویه های جدا شده از نمونه های کلینیکی استفاده می شود آزمایش و نتایج را با جداول ۳ و ۳A CLSI (ضمیمه ۳) مقایسه و بررسی نمود . محدوده قطر هاله عدم رشد قابل قبول برای هر سویه کنترلی نسبت به یک دیسک آنتی بیوتیکی در جداول فوق فهرست شده است .

چنانچه تغییر در میانگین قطر هاله عدم رشد ناشی از خطا در روش انجام آزمایش نباشد ، احتمالا" ناشی از تغییر در حساسیت ذاتی باکتری نسبت به آن آنتی بیوتیک می باشد. در این صورت لازم است کشت تازه از سوش کنترل تهیه شود .

آزمایش کنترل کیفیت را باید درچه فواصل زمانی انجام داد ؟

الف _ انجام آزمایش روزانه

برای هر سویه کنترلی با یک دیسک آنتی بیوتیکی باید ۲۰ روز متوالی آزمایش تعیین حساسیت انجام و نتایج با مقادیر قابل قبول اشاره شده در جداول فوق مقایسه گردد . بر اساس ضریب اطمینان ۹۵٪ تنها یک مورد از ۲۰ نتیجه قرائت شده می تواند خارج از محدوده کنترل باشد (به ضمیمه ۲مراجعه کنید) . چنانچه بیشتر از یک مورد خارج از محدوده کنترل باشد نیاز به اقدامات اصلاحی خواهد بود ، که در ادامه توضیح داده می شود.

ب _ انجام آزمایش هفتگی

– در صورتیکه تنها یک مورد از ۲۰ نتیجه قطر هاله عدم رشد برای هر سویه کنترلی/ دیسک آنتی بیوتیکی خارج از محدوده قابل قبول مندرج در جداول ۳ و ۳A(ضمیمه ۳) قرار گیرد ، کنترل کیفی روزانه را به هفتگی تغییر دهید(به ضمیمه ۲ مراجعه کنید) .

– آزمایش کنترل کیفی هفتگی را یکبار در هفته و هم چنین زمانیکه یکی از عوامل آزمایش (مانند سری ساخت آگار یا دیسکهای تهیه شده از یک سازنده) تغییر کند، انجام دهید .

اگر هر یک از نتایج کنترل کیفی هفتگی خارج از محدوده قابل قبول باشد ، انجام اقدامات اصلاحی مورد نیاز است .

اقدامات اصلاحی (Corrective actions)

الف _ نتایج خارج از محدوده قابل قبول به دلیل خطاهای مشهود و واضح شامل:

-استفاده از دیسک اشتباه

-استفاده از سویه کنترلی اشتباه

-آلودگی واضح سویه

-استفاده غیرعمدی از دما و شرایط اشتباه انکوباسیون

بوجود آمده است . دراین حال باید دلیل ایجاد خطا مکتوب و پس از اصلاح آزمایش دوباره تکرار شود . اگر نتایج گزارش شده در محدوده مورد نظر قرار گرفت ، عملیات اصلاحی بیشتری مورد نیاز نمی باشد .

ب _ عامل ایجاد نتایج خارج از محدوده کنترل نامشخص است. در این حال باید اقدامات اصلاحی فوری بشرح زیر انجام شود.

-آزمایش را جهت یک سویه کنترلی / دیسک آنتی بیوتیکی برای ۵ روز متوالی تکرار و همه نتایج را ثبت کنید .

-اگر اندازه هر ۵ قطرهاله مطابق جداول ۳ و ۳A(ضمیمه ۳) و در محدوده قابل قبول باشد ، عملیات اصلاحی بیشتری مورد نیاز نمی باشد .

- اگر اندازه هر یک از ۵ قطر هاله عدم رشد خارج از محدوده قابل قبول باشد ، به عملیات اصلاحی اضافی نیاز است .

-آزمایشهای کنترلی روزانه باید ادامه داده شود تا به دلیل نهایی مشکل پی برده شود .

عملیات اصلاحی اضافی :

وقتی عملیات اصلاحی فوری مشکل را حل نکرد ، احتمالاً خطای مشاهده شده بعلت بروز یک اشکال کلی در سیستم و نه یک خطای تصادفی ایجاد شده است . در این حالت باید موارد بیشتری بررسی شوند.مانند:

-اندازه گیری و ثبت صحیح قطر هاله های عدم رشد

- رعایت تاریخ انقضا و شرایط نگهداری دیسکها و مواد مورد استفاده (دور از رطوبت و در دمای مناسب)

- مناسب بودن دما و اتمسفر انکوباتور

- تغییرنیافتن یا آلوده نبودن سویه های کنترل

- مطابقت صحیح سوسپانسیون تلقیح با استاندارد نیم مک فارلند

- استفاده از پلیت کشت تازه برای تلقیح (پلیت کشت باید تازه بوده و مدت زمان انکوباسیون آن بیشتر از ۲۴ ساعت ، نباشد.)

وقتی مشکل بر طرف شد ، می‌توان کنترل کیفی هفتگی را برقرار کرد.

نگهداری دیسکهای آنتی بیوتیکی

- دیسکها باید در یخچال$^{\circ}$C ۸ و پایین تر ، یا در فریزر$^{\circ}$C ۱۴- و پایین تر تا زمان مصرف نگهداری شوند.

– تمامی دیسکهای گروه بتالاکتام مانند پنی سیلین ، آمپی سیلین ، کربنی سیلین ، تیکارسیلین ، اگزاسیلین و نسل اول ، دوم و سوم سفالوسپورین ها و ... باید در فریزر نگهداری شوند ، و فقط می توان مقداری از آن را بر اساس کار روزانه آزمایشگاه حداکثر به مدت یک هفته در یخچال نگهداری نمود .

– بعضی آنتی بیوتیکهای حساس مثل ایمیپنم ، سفاکلر و ترکیبات کلاولانیک اسید یا سولباکتام اگر تا هنگام مصرف در فریزر نگهداری شوند ، پایداری بیشتری خواهند داشت .

– دیسکها باید در ظروف دارای درپوش محکم و حاوی مواد جاذب رطوبت نگهداری شوند .

– دیسکهای آنتی بیوتیکی باید یک تا دو ساعت قبل از استفاده از یخچال یا فریزر خارج شوند تا به درجه حرارت اتاق برسند .

روش تعیین حجم لوپ

برای شمارش کلنی‌های بدست آمده از کشت نمونه‌های بالینی بویژه ادرار به منظور تشخیص عفونت لازم است از لوپهای استاندارد با حجم معین استفاده شود. آزمایشگاه می‌بایست همواره از لوپهای کالیبره جهت کشت نمونه‌های ادراری استفاده وتعداد کلنی‌های موجود در هر میلی‌لیتر ادرار(CFU/ml) را گزارش نماید.

برای بررسی حجم لوپ از روشهایی مانند رنگسنجی و توزین استفاده می‌شود. ساده ترین روش برای بررسی حجم لوپ استفاده از روش رنگسنجی از طریق اسپکتروفتومتر یا فتومتر به کمک مواد رنگی مانند متیلن بلو ، کریستال ویوله و اوانس بلو می‌باشد. در این دستورالعمل روش رنگسنجی با استفاده از اوانس بلو توضیح داده شده است.

ابزار و مواد مورد نیاز تعیین حجم لوپ با استفاده از ماده رنگی اوانس بلو

۱–پودر اوانس بلو (Evans Blue) .این ماده به صورت پودر تجاری قابل‌دسترس بوده و به آسانی در آب حل می‌شود.

۲–آب مقطر

۳–لوله آزمایش

۴–پیپت یا سمپلر

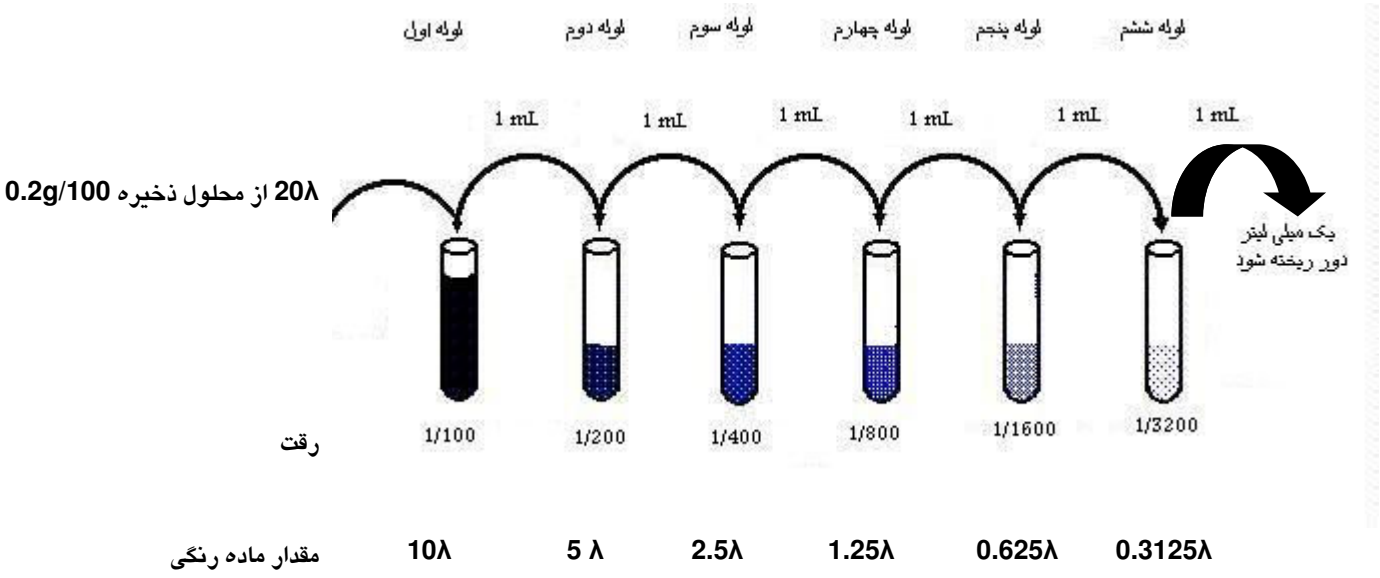
۵–اسپکتروفتومتر یا فتومتر کالیبره

۶–کاغذ میلیمتری

روش انجام

۱– 20mg از پودر رنگی اوانس بلو را در ۱۰ میلی لیترآب حل نمایید. غلظت این محلول 0.2g/100 می‌باشد.

۲- ۶ لوله آزمایش انتخاب کرده ، در لوله اول 2ml ودر هر یک از لوله‌های باقیمانده 1ml آب مقطر بریزید. 20 لاندا (0.02 ml) از محلول ذخیره اولیه (0.2g/100) برداشته در لوله اول ریخته و کاملا مخلوط نمایید. سپس 1ml از لوله اول برداشته و در لوله دوم بریزید ، از لوله دوم ، در لوله سوم و این عمل را تا آخر ادامه دهید. در انتها یک میلی لیتر از لوله ششم را برداشته و دور بریزید . به این ترتیب ۶ محلول خواهید داشت که رقت نهایی بدست آمده در هر یک و میزان ماده رنگی موجود در آن بشرح زیر خواهد بود.



۳- میزان جذب نوری (OD) هر یک از۶ محلول حاصله را به کمک اسپکتروفتومتر در طول موج 620nm بدست آورید.

۴- جهت تعیین حجم لوپ مورد بررسی ، ۱۰ لوله آزمایش برداشته و در هر یک ۱ میلی‌لیتر آب مقطر بریزید.

۵- لوپ تحت کنترل را بطور کاملا عمودی وارد محلول ذخیره اولیه نموده ، از محلول رنگی برداشته و در لوله‌های آزمایش فرو برید . این کار را ۱۰ بار تکرار و در فواصل لوپ را روی کاغذ خشک کن قرار دهید تا کاملا خشک شود. از سوزاندن لوپ خودداری نمایید.

۶- بعد از مخلوط کردن ، جذب هریک از لوله‌ها را در طول موج 620nm قرائت نمائید.

۷- بر روی کاغذ میلی‌متری نموداری ترسیم نمایید که در آن ، محور افقی نشانگر رقتهای تهیه شده و محور عمودی نمایانگر جذب نوری هر رقت باشد. (مشابه ضمیمه ۴)

۸- با قرار دادن میانگین جذب بدست آمده از لوپ کنترلی، روی محور عمودی می‌توان ضریب رقت لوپ کنترلی را از روی محور افقی بدست آورد.

جهت تعیین تعداد کلنی در هر میلی‌لیتر ادرار ، باید تعداد کلنی‌های بدست آمده از کشت روی پلیت را در عکس ضریب رقت لوپ ، ضرب کرد. بطور مثال اگر ضریب رقت لوپ مجهول ۱/۱۰۰ و تعداد کلنی‌های روی پلیت ۵۰۰ عدد باشد ، باید ۵۰۰ را در ۱۰۰ ضرب و نتیجه را بصورت cfu/ml ۵۰/۰۰۰ گزارش نمود.

روشهای دیگری نیز برای بررسی میزان حجم برداشتی توسط لوپ باکتریولوژی وجود دارد که از بین آنها می‌توان به روش توزینی مندرج در کتاب

Diagnostic microbiology ,Elmer W.Koneman, 5th edition, page 96

اشاره کرد که در آن با استفاده از ترازوی بسیار حساس تغییرات وزن دیسک کاغذی بعد از افزودن یک لوپ آب مقطر روی آن، محاسبه می‌گردد.

اتوکلاو

اگر چه اتوکلاو بهترین وسیله برای استریلیزاسیون است، باید تصدیق کنیم که طولانی شدن مرحلهٔ گرمایی، سبب کاهش کیفیت مواد مغذی در محیط های کشت کمپلکس محتوی قند، مواد معدنی و فلزی می شود و در نتیجه به محیط های کشت زیان وارد می کند. بنابراین در چرخهٔ استریلیزاسیون باید از زمان کوتاهتر و دمای بالاتر استفاده کنیم تا علاوه بر آنکه آسیب کمتری به محیط کشت وارد می شود، برای ارگانیسم نیز کشنده تر باشد.

چرخهٔ استریلیزاسیون

- مرحلهٔ ۱ : زمان بالا رفتن دما در محفظهٔ اتوکلاو (۲۰ °C–۱۲۱°C)
- مرحلهٔ ۲ : زمان نفوذ گرما به داخل ظرف محیط کشت (<۱۰۰°C – ۱۲۱°C)
- مرحلهٔ ۳ : زمان نگهداری در دمای مقرر (۱۲۱°C)
- مرحلهٔ ۴ : زمان پایین آمدن دمای محفظه (۸۰°C–۱۲۱°C)

انواع استریلیزاسیون

- استریلیزاسیون محیط های کشت و محلول ها
- استریلیزاسیون مواد مصرفی آلوده
- استریلیزاسیون مواد خشک بسته بندی شده

استریلیزاسیون محیط های کشت و محلولها

- بهتر است از لوله و ارلن درپیچ دار استفاده شود. بیشتر از ۲/۳ آنها را پر نکنید. درپیچ آنها را شل کنید.
- از قرار دادن اشیاء بر روی یکدیگر بپرهیزید. باید فاصلهٔ اشیاء از یکدیگر و از دیواره های اتوکلاو حداقل ۵ سانتی متر باشد تا بخار جریان یابد.
- درب اتوکلاو را ببندید. زمان و دما را طبق دستور شرکت سازنده (معمولاً ۱۵ دقیقه در ۱۲۱°C) تنظیم کنید.
- در بعضی از محیط های کشت که به دمای بالا حساس هستند (محتوی مقدار قند بالا یا عوامل مهار کننده مثل دزوکسی کولات سدیم یا نمکهای صفراوی هستند) تحت تأثیر دمای بالا، pH محصول نهایی کاهش می یابد.
- دمای استریلیزاسیون به دمای چمبر اتوکلاو برمیگردد نه به دمای محیط کشت. زمان لازم برای رسیدن به این دما باید در حد ممکن کوتاه باشد.

- چرخهٔ استریلیزاسیون باید متناسب با زمان نفوذ گرما در نظر گرفته شود. برای مثال محتویات یک ظرف یک لیتری محیط کشت باید طی ۱۵ دقیقه از زمان رسیدن محفظه به دمای ۱۲۱°C، به این دما برسد.

استریلیزاسیون مواد مصرفی آلوده

- مواد مصرفی آلوده را جدا نموده و در کیسه های قابل اتوکلاو شدن قرار دهیدو بر روی آنها برچسب Biohazardنصب کنید.
- برای اطمینان از نفوذ بخار به همهٔ قسمتهای کیسه، یا گرهٔ آنرا شل کنید یا قبل از محکم کردن گره، یک پیمانه (۰/۳ لیتر) آب به آن اضافه کنید. بیش از ۳/۴ کیسه را پر نکنید.
- برای جلوگیری از مسدود شدن آبگذر اتاقک اتوکلاو توسط آگار مذاب، کیسه ها را داخل سطل قرار دهید.
- زمان لازم برای استریلیزاسیون زباله، ۶۰-۳۰ دقیقه در ۱۲۱°Cیا ۳۰-۱۵ دقیقه در ۱۳۴ °Cمی باشد.
- وقتی آگار ذوب شده، سفت شد آنرا مثل زبالهٔ طبیعی دور بریزید. اما محیط کشت محتوی سلنیت را باید بصورت زبالهٔ مخصوص منهدم کنید.

استریلیزاسیون مواد خشک بسته بندی شده

- بسته ها را طوری در اتوکلاو قرار دهید که حداکثر چرخش بخار در بین آنها ایجاد شود و با دیواره های اتوکلاو نیز تماسی نداشته باشند.
- زمان لازم برای استریلیزاسیون مواد خشک بسته بندی شده ، ۲۵ دقیقه با خروج سریع بخار یا ۳۰ دقیقه بدون خروج بخار در دمای ۱۲۱°Cمی باشد.

نحوهٔ نگهداری

- روزانه: صفحهٔ کف اتوکلاو را از سوراخ آبگذر اتاقک جدا کرده، تمیز کنید. لوازم فرعی مثل طبقات و سینی ها را با آب و صابون بشویید. سطح آب ژنراتور را کنترل کنید.
- هفتگی: آبگذر و درزها را تمیز کنید. سوپاپ اطمینان را بررسی کنید.
- ماهانه: آب دستگاه را تعویض نمایید.
- هر ۳ ماه: داخل و خارج دستگاه و قسمت بیرونی آبگذر را تمیز کنید.
- هر ۶ ماه: دستگاه توسط نمایندهٔ سرویس تعمیر، بازرسی شود.

کنترل کیفیت

تست شیمیایی:

- نوار کاغذی TST: سه عامل زمان، بخار و دما را کنترل می کند و از زرد به بنفش تغییر رنگ می دهد. در هر سری کاری از این نوار استفاده کنید.
- برچسب Sterility-Record: علاوه بر سنجش استریلیتی، امکان ثبت تاریخ استریلیزاسیون، نام فرد استریل کننده و نام محیط کشت بر روی این برچسب وجود دارد. در هر سری کاری از این برچسب استفاده کنید.

تست بیولوژیک:

استفاده از ویال حاوی اسپور باسیلوس استئاروترموفیلوس ATCC 7953 بطور هفتگی توصیه می شود.

ایمنی

- از دستکش مقاوم به حرارت و محافظ چشم استفاده کنید.
- بعد از آنکه فشار اتاقک اتوکلاو به صفر و دمای آن به حدود $۶۰\ ^{\circ}C$ رسید کنار درب اتوکلاو بایستید و آنرا باز کنید. منتظر بمانید تا ظروف کمی خنک شوند، سپس آنها را حمل کنید.
- هرگز در هنگام روشن بودن دستگاه اقدام به بارگذاری یا خارج نمودن وسایل و مواد ننمایید.
- هرگز در هنگام روشن بودن دستگاه و اتصال آن به پریز اقدام به تمیز نمودن آن نکنید.
- هرگز پیچ های محکم کنندهٔ درب را در هنگام کار دستگاه شل و سفت نکنید.

فور(اون)

اون برای استریل کردن موادی که نمی توانند بطور کامل تحت نفوذ بخار قرار گیرند، اما می توانند دمای بالای مورد نیاز مثل $۱۸۰^{\circ}C$ - ۱۶۰ را تحمل کنند، به کار می رود. اون بویژه برای ظروف شیشه ای مثل لوله آزمایش، پتری دیش، پی پت و نیز برای آلات فلزی مثل پنس، اسکالپل و قیچی به کار می رود.

اون باید دارای فن (جهت چرخش هوای متراکم در سراسر اتاقک)، نشانگر درجه حرارت، ترموستات و تایمر، طبقات مشبک، قفل داخلی درب و عایق بندی مناسب جداره ها باشد.

استریلیزاسیون در اون

۱- برای بسته بندی وسایل فوق‌الذکر جهت استریل نمودن آنها در اون میتوان از فویل آلومینیومی یا کاغذ کرافت و سربطریهای پنبه ای استفاده نمود.

۲- باید دقت شود که کاغذ و پنبه نسوزند چون پنبهٔ نیم سوز مواد ضد باکتری فرّاری را متصاعد می کند.

۳- حدود ۲ سانتی متر از انتهای فوقانی پی پتها را با پنبهٔ غیر جاذب ببندید و آنها را در ظروف فلزی قرار داده، درب آنها را ببندید.

۴- درپوش لوله های آزمایش را با کاغذ آلومینیومی بپوشانید و آنها را بطور عمودی در جا لوله ای قرار دهید. درپوش، لبهٔ لوله را از آلودگی از طریق هوا در طی ذخیره سازی حفظ می کند.

۵- در صورتی می توان بطری های درپیچ دار را در اون استریل نمود که درپوش و آستری آنها از موادی مثل فلز، پلی‌پروپیلن یا لاستیک سیلیکون ساخته شده باشد تا در دمای استریلیزاسیون از شکل طبیعی خارج نشود.

۶- پودر، روغن، چربی و گریس مثل Petroleum Jelly را در ظرف شیشه ای یا فلزی ودر اندازه های کوچک که از وزن ۱۰ گرم یا عمق یک سانتی متر تجاوز نکند، استریل نمایید.

۷- قبل از قرار دادن ظروف شیشه ای در اون، از خشک بودن آنها مطمئن شوید. مواد را به گونه ای در اون قرار دهید که هوای داغ در اطراف و مابین آنها در جریان باشد.

۸- زمان نگهداری استریلیزاسیون از زمانی آغاز می شود که اتاقک به دمای استریل انتخابی برسد و نیز مدتی هم بیشتر درنظر گرفته می شود تا همهٔ قسمتهای اتاقک و مواد داخل آن به دمای مورد نظر برسند($۱۸۰^{\circ}C$-۱۶۰ به مدت ۲ ساعت).

۹- به دلیل عایق بودن دستگاه، چند ساعت طول می کشد تا اشیاء داخل آن خنک شود، مگر آنکه مجهز بـه فـن باشد. درب اون را باز نکنید تا اتاقک، ظروف و مواد داخل آن تا دمای حدود ۶۰°C خنک شوند. اگر هـوای سـرد ناگهـان وارد دستگاه شود ممکن است ظروف شیشه ای ترک بخورند.

نحوهٔ نگهداری :

بطور ماهانه داخل آن تمیز وهر ۶ ماه توسط نمایندهٔ سرویس تعمیر، بازرسی شود.

کنترل کیفیت :

تست شیمیایی: ویال شیشه ای Browne و مشاهدهٔ تغییر رنگ مناسب از قرمز به سبز. از این ویـال در هرسـری کاری استفاده کنید.

تست بیولوژیک: استفاده از نوار کاغذی حاوی اسپور باسیلوس سـوبتیلیس واریتـهٔ نـایجر ATCC 9372 بطـور هفتگی توصیه می شود.

ایمنی:

استفاده از دستکش مقاوم به حرارت و محافظ چشم.

انکوباتور

انکوباتور محفظه عایق بندی شده ایست که برای نگهداری دما و رطوبت کنترل شده محیط برای رشد میکروارگانیسم ها نیاز است . بعضی انکوباتورها برای نگهداری میزان دلخواه از CO_2 برای میکروارگانیسم هایی که دی اکسید کربن دوست (Capnophilic) هستند ، تجهیز شده اند .

الف _ انکوباتورهای بدون CO_2 :

- تنظیم کننده دما را روی دمای مورد نظر قرار دهید.
- وقتی درجه حرارت به دمای مورد نظر رسید ، دما را در هر روزکاری که از انکوباتور استفاده می‌شود، روی برگه QC ثبت کنید.
- نمونه ها را به طور ایمن روی سینی ها یا قفسه ها قرار دهید .
- می توانید با قراردادن یک تشتک پر از آب متناسب با اندازه اتاقک در کف انکوباتور ، محیط مرطوب ایجاد نمایید .

ب _ انکوباتورهای CO_2 دار :

- سطح دما و CO_2 در برگه QC در هر روز استفاده ثبت می شوند .

نکته :

در صورت اتمام کپسول گاز CO_2 ، تا زمان شارژ مجدد آن می توانیم جهت انکوباسیون نمونه های نیازمند CO_2 از کندل جار بصورت جایگزین استفاده نماییم .

نحوه نگهداری :

- همه انکوباتورها باید به طورماهانه با محلول صابون ملایم تمیز شوند .
- به منظور رعایت موارد ایمنی ، کپسولهای CO_2 باید به صورت ایستاده با زنجیر سنگین به دیوار محکم شود. زمانیکه از سیلندرها استفاده نمی شود ، سوپاپها و درپوشها باید ، به طور محکم بسته شوند . سیلندرهای خالی را روی حمل کننده سیلندر گازبه طور محکم با زنجیر نگهداری کنید . هرگز سیلندرهای گاز را در دمای بالاتر از ($۵۲^{O}C$) $۱۲۵^{O}F$ نگهداری نکنید . سیلندرها را در وضعیت افقی قرار ندهید .

الف _ انکوباتورهای بدون CO_2 :

زمانیکه دمای انکوباتور خارج از محدوده قابل قبول برای واحد مورد نظر باشد ، باید اقدامات اصلاحی باید مطابق موارد ذیل انجام شود :

- منبع برق ، پریز برق و Circuit Panel را بررسی کنید .
- دمای تنظیمی (Set Point) را بررسی کنید .
- اگر دستگاه هنوز درست کار نمی کند ، به نماینده سرویس دهنده اطلاع دهید .

ب _ انکوباتورهای CO_2 دار :

یک کشت از نیسریا گونوره در انکوباتور قرار دهید . هر روز آن را پاساژ داده و رشدش را بررسی نمایید . این ارگانیسم به CO_2 نیاز کامل دارد .

نکات مهم برای کنترل کیفیت آزمایشهای انگل‌شناسی

برای اطمینان از درستی آزمایشهای انگل‌شناسی باید مراحل جمع‌آوری نمونه ، آماده‌سازی، نگهداری معرفها و ارائه گزارش نهایی تحت کنترل بوده و آزمایش به روش استاندارد انجام شود. برای دستیابی به موارد ذکر شده رعایت نکات ذیل ضروری می‌باشد :

- مراحل جمع‌آوری نمونه باید به روش استاندارد انجام شود.
- انجام آزمایش کامل مدفوع و گزارش کامل از نظر رنگ، قوام، خون، موکوس، غذای هضم نشده ، WBC، RBC و...ضروری می‌باشد.
- کیفیت معرفها باید در موقع استفاده یا بصورت هفتگی بررسی گردد. محلولها باید عاری از هر گونه آلودگی باکتریایی یا قارچی باشند.
- محلول ید به رنگ چای پررنگ بوده و در صورت کمرنگ شدن باید دور ریخته شود.

برای کنترل کیفیت محلول ید می‌بایست نمونه مدفوع حاوی گلبول سفید و عاری از انگل را با محلول ید مورد آزمون، رنگ‌آمیزی نمود. اگر گلبولهای سفید توانایی جذب رنگ ید را داشته باشند، تک‌یاخته‌ها نیز قادر به جذب محلول ید خواهند بود. در رنگ آمیزی با محلول ید، سیتوپلاسم تک‌یاخته باید به رنگ زرد طلایی و مواد نشاسته‌ای به رنگ قهوه‌ای و کروماتین هسته به رنگ قهوه‌ای روشن تا تیره مشاهده شود.

- جهت کنترل کیفیت آزمایش تغلیظ با فرمالین- اتیل استات (اتر) و روش سولفات روی باید به نکات زیر توجه داشت :

۱. برداشت نمونه از قسمتهای مناسب مدفوع (قسمتهای حاوی موکوس ، خون ، ...) انجام پذیرد.
۲. مواد و محلولها به‌روش استاندارد تهیه شوند.
۳. سرعت و زمان سانتریفوژ رعایت شود.
۴. گسترش با غلظت مناسب تهیه شود.
۵. لوله محتوی رسوب تا پایان مراحل انجام آزمایش و گزارش نهایی نگهداری شود.

معرفهای مورد استفاده باید در زمان آزمایش، بررسی گردند. محلول سرم فیزیولوژی ، سولفات روی و فرمالین باید شفاف و بدون آلودگی مرئی باشند.

برای کنترل کیفیت آزمایش تغلیظ، باید نمونه‌های مثبت شناخته شده تغلیظ و کیفیت مطلوب ارگانیسمها بررسی گردد. این اقدام می‌بایست حداقل هر سه ماه (خصوصا پس از کنترل سرعت سانتریفوژ) انجام پذیرد.

وزن مخصوص سولفات روی ، باید بطور ماهانه بررسی شود. وزن مخصوص در نمونه‌های تازه ۱/۱۸و در نمونه‌های نگهداری شده در فرمالین ۱/۲۰ می‌باشد. در غیر اینصورت با اضافه کردن سولفات روی یا آب مقطر تنظیم می‌شود. در صورت خرید سولفات روی، باید نمونه‌های شناخته شده حاوی انگل ، مورد آزمایش قرار گرفته و کیفیت مطلوب انگلها بررسی گردد.

- در مرحله گزارش نهایی باید تمامی سطح لامل با عدسی با بزرگنمایی ۱۰× بررسی گردد. در صورت عدم مشاهده مورد مشکوک در بزرگنمایی ۱۰× ، حداقل ۱/۳ لام با بزرگنمایی ۴۰× بررسی گردد.

از آنجائیکه تک‌یاخته‌ها باعث انعکاس نور می‌شوند، نباید برای بررسی، از نور زیاد استفاده شود.

توجه :نظر به اهمیت کیفیت عملکرد سانتریفوژ و میکروسکوپ در آزمایشهای انگل‌شناسی باید به نگهداری و کنترل کیفیت این تجهیزات توجه ویژه داشت.

کنترل کیفیت آزمایشهای کیفی Qualitative

آزمایشهای کیفی برای مقاصد غربالگری ، تشخیصی و تائیدی طراحی می‌شوند. لذا در صورت استفاده از این روشها بایدبه نکات ذیل توجه نمود :

۱- آزمایشهای غربالگری که برای غربالگری جامعه یا زیرگروهی از آن بکار می‌روند و معمولا بعلت حساسیت بالا دارای موارد مثبت کاذب فراوانی هستند لذا در صورت مثبت شدن باید مورد تائید قرار گیرند مانند VDRL

۲- آزمایشهای تشخیصی براساس مشاهدات بالینی برای تشخیص بیماری یا شرایط خاص بکار می‌روند مانند کشتهای میکروبی . باتوجه به نوع آزمایش ممکن است پس از مثبت شدن به آزمایشهای تائیدی نیاز داشته باشند.

همچنین با توجه به مسئله مهم اشتراک آنتی‌ژنی و واکنشهای متقاطع در آزمایشهای سرولوژیک، بعضا پس از مثبت شدن، انجام آزمایشهای تائیدی الزامی می‌باشد. بعنوان مثال اشتراک آنتی‌ژنتی بروسلا با فرانسیسلا تولارنسیس ، ویبریوکلرا و یرسینیا آنتروکولیتیکا ، گاها انجام آزمایشهای تائیدی را برای تشخیص بروسلوز الزامی می‌سازد.

۳- آزمایشهای تائیدی برای تائید آزمایشهای غربالگری یا تشخیصی بکار می‌روند وبا توجه به اختصاصی بودن و positive predictive value بالا به پزشک اجازه می‌دهند تا تصمیم قطعی را اتخاذ نماید. مثالهای این گروه ABS – FTA برای تائید VDRL ، RIBA برای تشخیص هپاتیت C وروش Neutralization برای هپاتیتB هستند.

برای اطمینان از کیفیت آزمایشهای کیفی باید به موارد زیر توجه داشت.

- در هر سری کاری از کنترلهای مثبت و منفی استفاده شود . بهتر است علاوه بر کنترلهای داخل کیت ، نمونه‌های مثبت و منفی دیگر (کنترل تجاری یا نمونه انسانی)نیز آزمایش شوند.
- شرایط نگهداری و استفاده از کیت مطابق با دستورالعمل همراه و مندرجات روی جعبه رعایت گردد.
- عواملی که در واکنش اتصال آنتی‌ژن آنتی‌بادی دخالت دارند ،مانند PHمحیط، بافرمناسب ، 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 حتی‌المکان بصورت تازه تهیه شوند.
- معرفها از نظر اتوآگلوتیناسیون و تغییر رنگ بررسی شوند.
- نمونه‌گیری و نگهداری نمونه بر اساس نوع آزمایش بنحو مناسب انجام گردد.
- در مورد آزمایش IF از کونژوگه مناسب استفاده و نتیجه نهایی بر اساس نظر دو نفر اعلام شود.

ضمائم

ضمیمه شماره ۱

جداول زیر بر گرفته از کتاب Tietz و شامل مقادیر عدم دقت مجاز برای برخی کمیتها بر اساس معیارهای CLIA و Fraser می‌باشد.

درستون اول با عنوان Analyte اسامی کمیتها نوشته شده است.

در ستون دوم با عنوان Decision level xc غلظتی از آنالیت که به لحاظ بالینی ارزش دارد و انحراف معیار مجازبرای آن غلظت محاسبه شده، آمده است.

ستون سوم محدوده مجاز خطا را به درصد و براساس معیارهای CLIA نشان می‌دهد.

ستون چهارم مقدار انحراف معیارمجاز را براساس معیارهای CLIA نشان می‌دهد. که خود از تقسیم عدد مندرج در ستون ششم بر ۴ بدست می‌آید. برای مثال فوق 10 : 4 = 2.5

ستون پنجم مقدار انحراف معیار مجاز را بر اساس نظریه Fraser نشان می‌دهد. این مقدار برای ALT معادل 6.1 می‌باشد.

ستون ششم محدوده مجاز خطا را به غلظت و براساس معیارهای CLIA نشان می‌دهد. بعنوان مثال خطای مجاز برای ALT در غلظت50U/L معادل 20% است. که این مقدار خود برابر 10U/L (ستون ششم) می‌باشد.

50 × 20% = 10

برای محاسبه CV% از فرمول زیر استفاده می‌شود.

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

بر این اساس CV% مجاز برای ALT بر اساس معیارهای CLIA معادل۵٪ =۵۰÷ ۱۰۰ ×۲/۵ و بر اساس نظریه Fraser معادل ۱۲٪= ۵۰÷۱۰۰×۶/۱ خواهد بود.

بدیهی است که آزمایشگاه با توجه به توانایی و نیاز خود، می‌بایست حتی‌المکان کوچکترین خطای مجاز را انتخاب نماید.

ضمیمه شماره ۱

Analytical Goals

Analyte	Decision Level, x_c	Acceptable Performance, CLIA '88[104]	Precision Goals (Maximum SD)		Fixed-Limit Goals (Maximum Total Error) CLIA '88
			$x_c \times$ CLIA/4	Fraser[a]	
Routine Chemistry					
Alanine aminotransferase[b]	50 U/L	20%	2.5	6.1	10
Albumin	3.5 g/dL	10%	0.09	0.06	0.35
Alkaline phosphatase	150 U/L	30%	11	4.8	45
Amylase	100 U/L	30%	7.5	4.8	30
Aspartate aminotransferase[b]	30 U/L	20%	1.5	1.8	6.0
Bicarbonate	20 mmol/L			0.46[c]	
	30 mmol/L			0.69[c]	
Bilirubin, total[b]	1.0 mg/dL	0.4	0.10	0.13	0.40
	20 mg/dL	20%	1.0	2.6	4.0
Blood gas, PCO_2	35 mm Hg	5 mm Hg	1.3	0.84	5.0
	50 mm Hg	5 mm Hg	1.3	1.2	5.0
Blood gas, PO_2	30 mm Hg	3 SD[d]	0.75 SD[d]		3 SD[d]
	80 mm Hg	3 SD	0.75 SD		3 SD
	195 mm Hg	3 SD	0.75 SD		3 SD
Blood gas, pH	7.35	0.04	0.01	0.01[e]	0.04
	7.45	0.04	0.01	0.01[e]	0.04
Calcium, total[b]	7.0 mg/dL	1.0	0.25	0.07	1.0
	10.8 mg/dL	1.0	0.25	0.11	1.0
	13.0 mg/dL	1.0	0.25	0.13	1.0
Chloride[b]	90 mmol/L	5.0%	1.1	0.54	4.5
	110 mmol/L	5.0%	1.4	0.66	5.5
Cholesterol, total[b]	200 mg/dL	10%	5.0	6.0	20
Cholesterol, high-density lipoprotein	35 mg/dL	30%	2.6	1.3	10.5
	65 mg/dL	30%	4.9	2.3	19.5
Creatine kinase[b]	200 U/L	30%	15	23	60
Creatine kinase, MB isoenzyme	13 µg/L	3 SD	0.75 SD	1.2	3 SD
Creatinine	1.0 mg/dL	0.30	0.08	0.02	0.30
	3.0 mg/dL	15%	0.11	0.07	0.45

Analyte	Decision Level, x_c	Acceptable Performance, CLIA '88[104]	Precision Goals (Maximum SD) $x_c \times$ CLIA/4	Fraser[a]	Fixed-Limit Goals (Maximum Total Error) CLIA '88
Routine Chemistry—Cont'd					
Glucose[b]	50 mg/dL	6.0	1.5	1.7	6.0
	126 mg/dL	10%	3.15	4.2	12.6
	200 mg/dL	10%	5.0	6.6	20
Iron	150 µg/dL	20%	7.5	20	30
Lactate dehydrogenase	300 U/L	20%	15	13	60
Lactate dehydrogenase isoenzymes	100 U/L	30%	7.5	3.8	30
Magnesium	2.0 mg/dL	25%	0.13	0.04	0.50
Phosphate, inorganic	4.5 mg/dL			0.19	
Potassium[b]	3.0 mmol/L	0.50	0.13	0.07	0.50
	6.0 mmol/L	0.50	0.13	0.14	0.50
Protein, total[b]	7.0 g/dL	10%	0.18	0.10	0.70
Sodium[b]	130 mmol/L	4.0	1.0	0.52	4.0
	150 mmol/L	4.0	1.0	0.60	4.0
Triglycerides	160 mg/dL	25%	1	17	40
Urea nitrogen[b]	27.0 mg/dL	9%	0.6	1.7	2.4
Uric acid	6.0 mg/dL	17%	0.25	0.26	1.02
Endocrinology and Related Markers					
11-Deoxycortisol	8.0 µg/L			0.86[f]	
17-OH Progesterone	0.5 µg/L			0.073[c]	
Aldosterone	15 ng/dL			2.2	
	30 ng/dL			4.4	
Androstenedione	260 ng/dL			15	
CA 15-3	25 U/mL			0.73	
CA 125	35 U/mL			2.4	
CA 549	11 U/mL			0.5	
Carcinoembryonic antigen	5 ng/mL			0.23	
Chorionic gonadotropin	25 IU/L	3 SD	0.75 SD		
	10,000 IU/L	3 SD	0.75 SD		
Cortisol	5 µg/dL	25%	0.31	0.53	1.25
	30 µg/dL	25%	1.88	3.15	7.5
C-peptide	37 µg/L			1.7	
Dehydroepiandrosterone sulfate	2000 µg/L			34	
	4500 µg/L			77	
Estradiol	60 ng/L			6.8	
	450 ng/L			51	
Follicle-stimulating hormone	10 U/L			0.51	
	95 U/L			4.8	
Luteinizing hormone	6 U/L			0.44	
	55 U/L			4.0	
Prolactin	15 µg/L			0.53[c]	
	200 µg/L			7.0[c]	
Prostate-specific antigen	2 µg/L			0.14	
T_3 uptake	25%	3 SD	0.75 SD		3 SD

Analyte	Decision Level, x_c	Acceptable Performance, CLIA '88[104]	Precision Goals (Maximum SD)		Fixed-Limit Goals (Maximum Total Error) CLIA '88
			$x_c \times$ CLIA/4	Fraser[a]	
Endocrinology and Related Markers—Cont'd					
Testosterone	90 ng/dL			4.0	
	1000 ng/dL			44	
Thyroid-stimulating hormone	0.3 mIU/L	3 SD	0.75 SD	0.030	3 SD
	5.0 mIU/L	3 SD	0.75 SD	0.50	3 SD
Thyroxine, free	0.8 ng/dL	3 SD	0.75 SD	0.023[c]	3 SD
	4.0 ng/dL	3 SD	0.75 SD	0.11[c]	3 SD
Thyroxine, total	3.0 µg/dL	1.0	0.25	0.09	1.0
	13 µg/dL	20%	0.65	0.39	2.6
Transferrin	375 mg/dL			5.6	
Triiodothyronine	80 ng/dL	3 SD	0.75 SD	3.5	3 SD
	200 ng/dL	3 SD	0.75 SD	8.8	3 SD
Toxicology and Therapeutic Drug Monitoring					
Alcohol, blood	0.10 g/dL	25%	0.006		0.025
Carbamazepine	8 mg/L	25%	0.50	0.51[f]	2.0
	12 mg/L	25%	0.75	0.77[f]	3.0
Digoxin	0.8 µg/L	0.20	0.05	0.03[f]	0.20
	2.0 µg/L	20%	0.10	0.08[f]	0.40
Ethosuximide	40 mg/L	20%	2.0	2.0[g]	8.0
	100 mg/L	20%	5.0	4.9[g]	20.0
Gentamicin	10 mg/L	25%	0.6		2.5
Lead, blood	10 µg/dL	4.0	1.0		4.0
	40 µg/dL	4.0	1.0		4.0
Lithium	0.5 mmol/L	0.3	0.08	0.02[f]	0.3
	1.5 mmol/L	20%	0.08	0.06[f]	0.3
Phenobarbital	15 mg/L	20%	0.75	0.33[f]	3.0
	40 mg/L	20%	2.0	0.88[f]	8.0
Phenytoin	10 mg/L	25%	0.6	0.36[f]	2.5
	20 mg/L	25%	1.2	0.72[f]	5.0
Primidone	5 mg/L	25%	0.3	0.56[g]	1.3
	12 mg/L	25%	0.75	1.36[g]	3.0
Procainamide	4 mg/L	25%	0.25		1.0
	20 mg/L	25%	1.25		5.0
Quinidine	7 mg/L	25%	0.45		1.8
Theophylline	10 mg/L	25%	0.63	1.1[f]	2.5
	20 mg/L	25%	1.2	2.2[f]	5.0
Valproate	50 mg/L	25%	3.1	3.2[f]	12.5
	100 mg/L	25%	6.2	6.4[f]	25
Hematology					
Cell identification		90% consensus			
Erythrocyte count	4.5 M/µL	6%	0.07	0.07	0.27
	5.9 M/µL	6%	0.09	0.09	0.35
Fibrinogen	150 mg/dL	20%	7.5	8	30
Hematocrit	35%	6%	0.53%	0.49%	2.1%
	50%	6%	0.75%	0.70%	3.0%

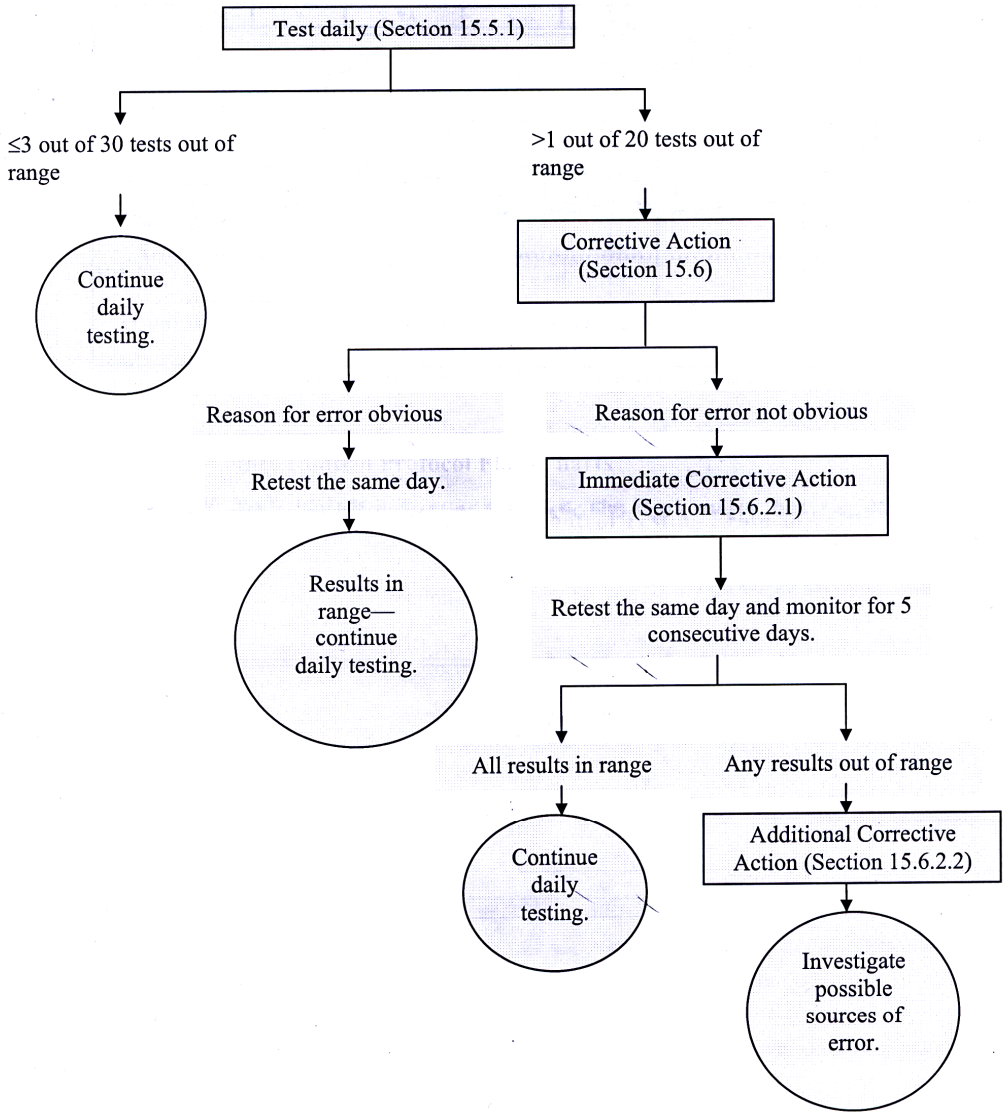
Analyte	Decision Level, x_c	Acceptable Performance, CLIA '88[104]	Precision Goals (Maximum SD)		Fixed-Limit Goals (Maximum Total Error) CLIA '88
			$x_c \times$ CLIA/4	Fraser[a]	
Hematology—Cont'd					
Hemoglobin	12 g/dL	7%	0.21	0.17	0.84
	17 g/dL	7%	0.30	0.24	1.19
Leukocyte count	3.5 K/μL	15%	0.13	0.19	0.52
	11 K/μL	15%	0.41	0.58	1.65
Partial thromboplastin time	40 s	15%	1.5		6.0
Platelet count	50 K/μL	25%	3.12	2.3	12.5
	500 K/μL	25%	31.2	23	125
Prothrombin time	INR 3.6	15%	INR 0.14		INR 0.54
White cell differentiation		3 SD			3 SD
Immunology					
Alpha$_1$- antitrypsin	80 mg/dL	3 SD	0.75 SD		3 SD
Alpha-fetoprotein	10 μg/L	3 SD	0.75 SD		3 SD
Antinuclear antibody		2 Titers or ±	1 Titer		
Antistreptolysin O		2 Titers or ±	1 Titer		
Antihuman immunodeficiency virus		R/N	R/N		
Complement C3	100 mg/dL	3 SD	0.75 SD	2.6	3 SD
Complement C4	20 mg/dL	3 SD	0.75 SD	0.9	3 SD
Hepatitis (HB_sAg, anti-HB_c, HB_eAg)		R/N	R/N		
IgA	400 mg/dL	3 SD	0.75 SD	10	3 SD
IgE	200 IU/mL	3 SD	0.75 SD		3 SD
IgG	500 mg/dL	25%	31	12	125
	2000 mg/dL	25%	125	46	500
IgM	300 mg/dL	3 SD	0.75 SD	9.0	3 SD
Infectious mononucleosis		2 Titers or ±	1 Titer		
Rheumatoid factor		2 Titers or ±	1 Titer		
Rubella		2 Titers or ±	1 Titer		

R/N, Reactive/nonreactive.

ضمیمه شماره ۲

Appendix A. Quality Control Protocol Flow Charts

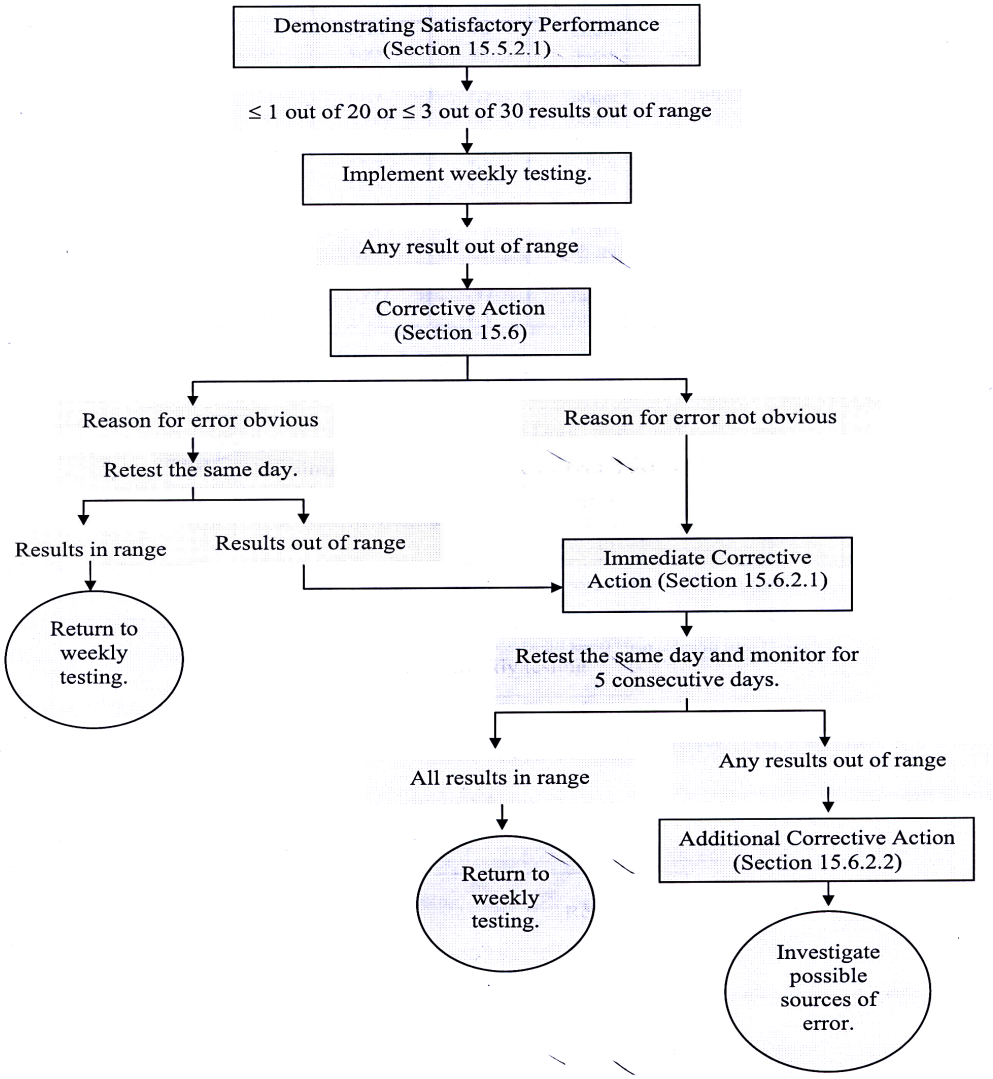
Disk Diffusion Daily Quality Control Testing Protocol



©Clinical and Laboratory Standards Institute. All rights reserved.

Appendix A. (Continued)

Disk Diffusion Weekly Quality Control Testing Protocol



©*Clinical and Laboratory Standards Institute. All rights reserved.*

ضمیمه شماره ۳

Table 3. Acceptable Limits for Quality Control Strains Used to Monitor Accuracy of Disk Diffusion Testing of Nonfastidious Organisms (Using Mueller-Hinton Medium Without Blood or Other Supplements)

Antimicrobial Agent	Disk Content	*Escherichia coli* ATCC® 25922[a]	*Staphylococcus aureus* ATCC® 25923	*Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853	*Escherichia coli* ATCC® 35218[b]
Amikacin	30 µg	19-26	20-26	18-26	-
Amoxicillin-clavulanic acid	20/10 µg	18-24	28-36	-	17-22
Ampicillin	10 µg	16-22	27-35	-	6
Ampicillin-sulbactam	10/10 µg	19-24	29-37	-	13-19
Azithromycin	15 µg	-	21-26	-	-
Azlocillin	75 µg	-	-	24-30	-
Aztreonam	30 µg	28-36	-	23-29	-
Carbenicillin	100 µg	23-29	-	18-24	-
Cefaclor	30 µg	23-27	27-31	-	-
Cefamandole	30 µg	26-32	26-34	-	-
Cefazolin	30 µg	21-27	29-35	-	-
Cefdinir	5 µg	24-28	25-32	-	-
Cefditoren	5 µg	22-28	20-28	-	-
Cefepime	30 µg	31-37	23-29	24-30	-
Cefetamet	10 µg	24-29	-	-	-
Cefixime	5 µg	23-27	-	-	-
Cefmetazole	30 µg	26-32	25-34	-	-
Cefonicid	30 µg	25-29	22-28	-	-
Cefoperazone	75 µg	28-34	24-33	23-29	-
Cefotaxime	30 µg	29-35	25-31	18-22	-
Cefotetan	30 µg	28-34	17-23	-	-
Cefoxitin	30 µg	23-29	23-29	-	-
Cefpodoxime	10 µg	23-28	19-25	-	-
Cefprozil	30 µg	21-27	27-33	-	-
Ceftazidime	30 µg	25-32	16-20	22-29	-
Ceftibuten	30 µg	27-35	-	-	-
Ceftizoxime	30 µg	30-36	27-35	12-17	-
Ceftobiprole	**30 µg**	**30-36**	**26-34**	**24-30**	-
Ceftriaxone	30 µg	29-35	22-28	17-23	-
Cefuroxime	30 µg	20-26	27-35	-	-
Cephalothin	30 µg	15-21	29-37	-	-
Chloramphenicol	30 µg	21-27	19-26	-	-
Cinoxacin	100 µg	26-32	-	-	-
Ciprofloxacin	5 µg	30-40	22-30	25-33	-
Clarithromycin	15 µg	-	26-32	-	-
Clinafloxacin	5 µg	31-40	28-37	27-35	-
Clindamycin[c]	2 µg	-	24-30	-	-
Daptomycin[d]	30 µg	-	18-23	-	-
Dirithromycin	15 µg	-	18-26	-	-
Doripenem	10 µg	28-35	33-42	29-35	-
Doxycycline	30 µg	18-24	23-29	-	-
Enoxacin	10 µg	28-36	22-28	22-28	-
Ertapenem	10 µg	29-36	24-31	13-21	-
Erythromycin[c]	15 µg	-	22-30	-	-
Fleroxacin	5 µg	28-34	21-27	12-20	-
Fosfomycin[e]	200 µg	22-30	25-33	-	-
Garenoxacin	5 µg	28-35	30-36	19-25	-
Gatifloxacin	5 µg	30-37	27-33	20-28	-
Gemifloxacin	5 µg	29-36	27-33	19-25	-
Gentamicin[f]	10 µg	19-26	19-27	16-21	-
Grepafloxacin	5 µg	28-36	26-31	20-27	-
Imipenem	10 µg	26-32	-	20-28	-
Kanamycin	30 µg	17-25	19-26	-	-
Levofloxacin	5 µg	29-37	25-30	19-26	-
Linezolid	30 µg	-	25-32	-	-
Lomefloxacin	10 µg	27-33	23-29	22-28	-
Loracarbef	30 µg	23-29	23-31	-	-
Mecillinam	10 µg	24-30	-	-	-

ضمیمه شماره ۳/ادامه

Table 3. (Continued)

Antimicrobial Agent	Disk Content	*Escherichia coli* ATCC® 25922[a]	*Staphylococcus aureus* ATCC® 25923	*Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853	*Escherichia coli* ATCC® 35218[b]
Meropenem	10 µg	28-34	29-37	27-33	-
Methicillin	5 µg	-	17-22	-	-
Mezlocillin	75 µg	23-29	-	19-25	-
Minocycline	30 µg	19-25	25-30	-	-
Moxalactam	30 µg	28-35	18-24	17-25	-
Moxifloxacin	5 µg	28-35	28-35	17-25	-
Nafcillin	1 µg	-	16-22	-	-
Nalidixic acid	30 µg	22-28	-	-	-
Netilmicin	30 µg	22-30	22-31	17-23	-
Nitrofurantoin	300 µg	20-25	18-22	-	-
Norfloxacin	10 µg	28-35	17-28	22-29	-
Ofloxacin	5 µg	29-33	24-28	17-21	-
Oxacillin	1 µg	-	18-24	-	-
Penicillin	10 units	-	26-37	-	-
Piperacillin	100 µg	24-30	-	25-33	12-18
Piperacillin-tazobactam	100/10 µg	24-30	27-36	25-33	24-30
Quinupristin-dalfopristin	15 µg	-	21-28	-	-
Rifampin	5 µg	8-10	26-34	-	-
Sparfloxacin	5 µg	30-38	27-33	21-29	-
Streptomycin[f]	10 µg	12-20	14-22	-	-
Sulfisoxazole[g]	250 µg or 300 µg	15-23	24-34	-	-
Teicoplanin	30 µg	-	15-21	-	-
Telavancin	30 µg	-	16-20	-	-
Telithromycin	15 µg	-	24-30	-	-
Tetracycline	30 µg	18-25	24-30	-	-
Ticarcillin	75 µg	24-30	-	21-27	6
Ticarcillin-clavulanic acid	75/10 µg	24-30	29-37	20-28	21-25
Tigecycline	15 µg	20-27	20-25	9-13	-
Tobramycin	10 µg	18-26	19-29	19-25	-
Trimethoprim[g]	5 µg	21-28	19-26	-	-
Trimethoprim-sulfamethoxazole[g]	1.25/23.75 µg	23-29	24-32	-	-
Trospectomycin	30 µg	10-16	15-20	-	-
Trovafloxacin	10 µg	29-36	29-35	21-27	-
Vancomycin	30 µg	-	17-21	-	-

NOTE: Information in boldface type is considered tentative for one year.

Footnotes

a. ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection.
b. Careful organism maintenance is required; refer to M2-A9, Section 15.3.
c. When disk approximation tests are performed with erythromycin and clindamycin, *S. aureus* ATCC® BAA-977 (containing inducible *ermA*-mediated resistance) and *S. aureus* ATCC® BAA-976 (containing *msrA*- mediated macrolide-only efflux) are recommended for quality assessment purposes (e.g., training, competency assessment, or test evaluation). *S. aureus* ATCC® BAA-977 should demonstrate inducible clindamycin resistance (i.e., a positive D-zone test), while *S. aureus* ATCC® BAA-976 should not demonstrate inducible clindamycin resistance. *S. aureus* ATCC® 25923 should be used for routine quality control (e.g., weekly or daily) of erythromycin and clindamycin disks using standard Mueller-Hinton agar.
d. Some lots of Mueller-Hinton agar are deficient in calcium and give small zones.
e. The 200-µg fosfomycin disk contains 50 µg of glucose-6-phosphate.
f. For control limits of gentamicin 120-µg and streptomycin 300-µg disks, use *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212 (gentamicin: 16 to 23 mm; streptomycin: 14 to 20 mm).
g. These agents can be affected by excess levels of thymidine and thymine. See M2-A9, Section 7.1.4 for guidance should a problem with quality control occur.

ضمیمه شماره ۳/ادامه

Table 3A. Acceptable Limits for Quality Control Strains Used to Monitor Accuracy of Disk Diffusion Testing of Fastidious Organisms

Antimicrobial Agent	Disk Content	*Haemophilus influenzae* ATCC® 49247[a]	*Haemophilus influenzae* ATCC® 49766	*Neisseria gonorrhoeae* ATCC® 49226	*Streptococcus pneumoniae* ATCC® 49619[b]
Amoxicillin-clavulanic acid[c]	20/10 µg	15-23	-	-	-
Ampicillin	10 µg	13-21	-	-	30-36
Ampicillin-sulbactam	10/10 µg	14-22	-	-	-
Azithromycin	15 µg	13-21	-	-	19-25
Aztreonam	30 µg	30-38	-	-	-
Cefaclor	30 µg	-	25-31	-	24-32
Cefdinir	5 µg	-	24-31	40-49	26-31
Cefditoren	5 µg	25-34	-	-	27-35
Cefepime	30 µg	25-31	-	37-46	28-35
Cefetamet	10 µg	23-28	-	35-43	-
Cefixime	5 µg	25-33	-	37-45	16-23
Cefmetazole	30 µg	16-21	-	31-36	-
Cefonicid	30 µg	-	30-38	-	-
Cefotaxime	30 µg	31-39	-	38-48	31-39
Cefotetan	30 µg	-	-	30-36	-
Cefoxitin	30 µg	-	-	33-41	-
Cefpodoxime	10 µg	25-31	-	35-43	28-34
Cefprozil	30 µg	-	20-27	-	25-32
Ceftazidime	30 µg	27-35	-	35-43	-
Ceftibuten	30 µg	29-36	-	-	-
Ceftizoxime	30 µg	29-39	-	42-51	28-34
Ceftobiprole[d]	**30 µg**	**28-36**	**30-38**	-	**33-39**
Ceftriaxone	30 µg	31-39	-	39-51	30-35
Cefuroxime	30 µg	-	28-36	33-41	-
Cephalothin	30 µg	-	-	-	26-32
Chloramphenicol	30 µg	31-40	-	-	23-27
Ciprofloxacin	5 µg	34-42	-	48-58	-
Clarithromycin	15 µg	11-17	-	-	25-31
Clinafloxacin	5 µg	34-43	-	-	27-34
Clindamycin	2 µg	-	-	-	19-25
Daptomycin[e]	30 µg	-	-	-	19-26
Dirithromycin	15 µg	-	-	-	18-25
Doripenem	10 µg	21-31	-	-	30-38
Enoxacin	10 µg	-	-	43-51	-
Ertapenem	10 µg	20-28	27-33	-	28-35
Erythromycin	15 µg	-	-	-	25-30
Fleroxacin	5 µg	30-38	-	43-51	-
Garenoxacin	5 µg	33-41	-	-	26-33
Gatifloxacin	5 µg	33-41	-	45-56	24-31
Gemifloxacin	5 µg	30-37	-	-	28-34
Grepafloxacin	5 µg	32-39	-	44-52	21-28
Imipenem	10 µg	21-29	-	-	-
Levofloxacin	5 µg	32-40	-	-	20-25
Linezolid	30 µg	-	-	-	25-34
Lomefloxacin	10 µg	33-41	-	45-54	-
Loracarbef	30 µg	-	26-32	-	22-28
Meropenem	10 µg	20-28	-	-	28-35
Moxifloxacin	5 µg	31-39	-	-	25-31
Nitrofurantoin	300 µg	-	-	-	23-29
Norfloxacin	10 µg	-	-	-	15-21
Ofloxacin	5 µg	31-40	-	43-51	16-21
Oxacillin	1 µg	-	-	-	≤ 12[f]
Penicillin	10 units	-	-	26-34	24-30
Piperacillin-tazobactam	100/10 µg	33-38	-	-	-
Quinupristin-dalfopristin	15 µg	15-21	-	-	19-24
Rifampin	5 µg	22-30	-	-	25-30

Table 3A. (Continued)

Antimicrobial Agent	Disk Content	*Haemophilus influenzae* ATCC® 49247[a]	*Haemophilus influenzae* ATCC® 49766	*Neisseria gonorrhoeae* ATCC® 49226	*Streptococcus pneumoniae* ATCC® 49619[b]
Sparfloxacin	5 µg	32-40	-	43-51	21-27
Spectinomycin	100 µg	-	-	23-29	-
Telavancin	30 µg	-	-	-	17-24
Telithromycin	15 µg	17-23	-	-	27-33
Tetracycline	30 µg	14-22	-	30-42	27-31
Tigecycline	15 µg	23-31	-	30-40	23-29
Trimethoprim-sulfamethoxazole	1.25/23.75 µg	24-32	-	-	20-28
Trospectomycin	30 µg	22-29	-	28-35	-
Trovafloxacin	10 µg	32-39	-	42-55	25-32
Vancomycin	30 µg	-	-	-	20-27

Disk Diffusion Testing Conditions for Clinical Isolates and Performance of Quality Control

Organism	*Haemophilus influenzae*	*Neisseria gonorrhoeae*	Streptococci and *Neisseria meningitidis*
Medium	*Haemophilus* Test Medium	GC agar base and 1% defined growth supplement. The use of a cysteine-free growth supplement is not required for disk diffusion testing.	MHA supplemented with 5% defibrinated sheep blood
Inoculum	Direct colony suspension	Direct colony suspension	Direct colony suspension
Incubation Characteristics	5% CO_2; 16 to 18 hours; 35 °C	5% CO_2; 20 to 24 hours; 35 °C	5% CO_2; 20 to 24 hours; 35 °C

NOTE: Information in boldface is considered tentative for one year.

Footnotes

a. ATCC is a registered trademark of American Type Culture Collection.

b. Despite the lack of reliable disk diffusion interpretive criteria for *S. pneumoniae* with certain β-lactams, *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 49619 is the strain designated for quality control of all disk diffusion tests with all *Streptococcus* spp.

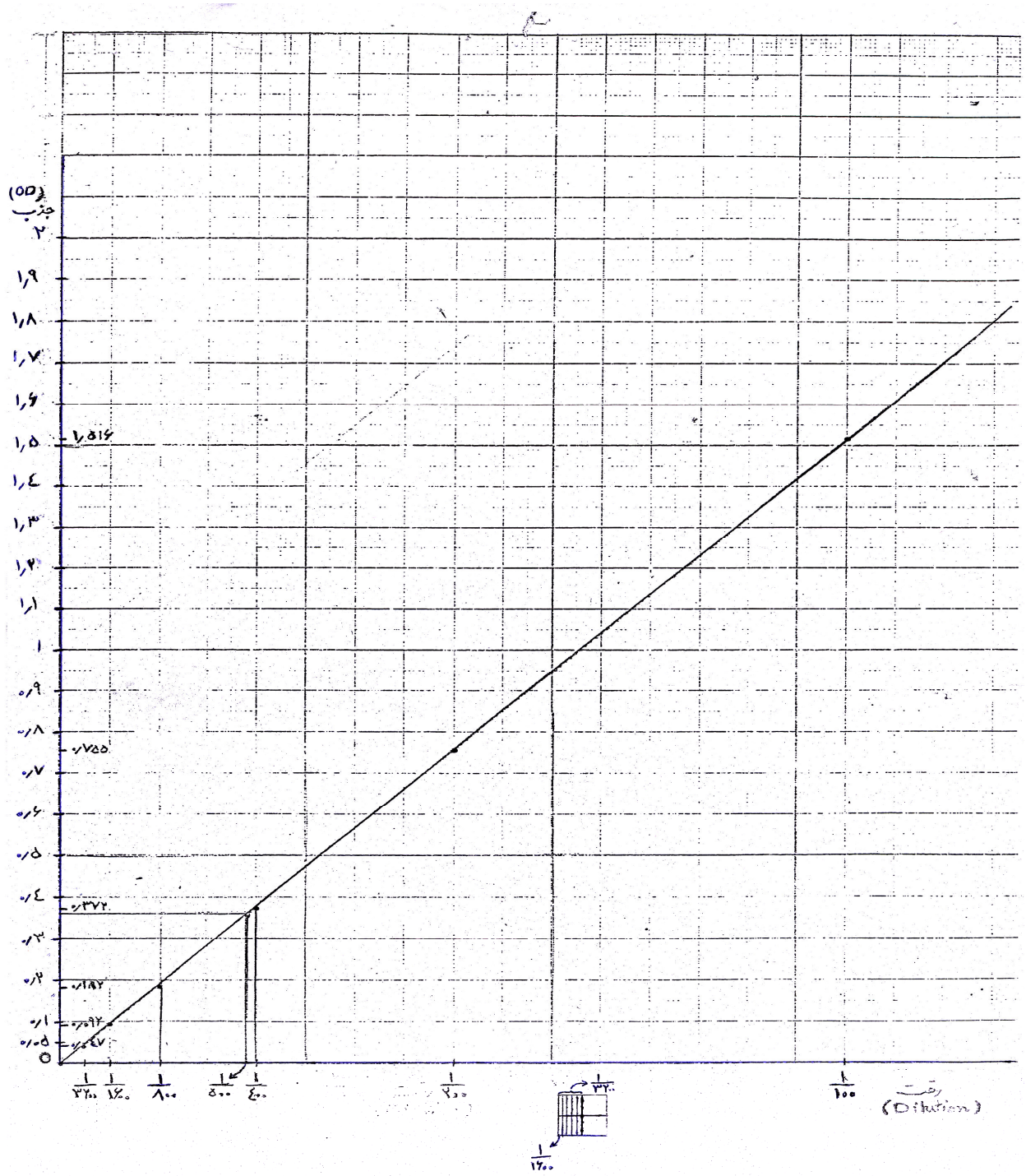
c. When testing *Haemophilus* on HTM, the acceptable limits for QC strain *E. coli* ATCC® 35218 are 17 to 22 mm for amoxicillin-clavulanic acid **when incubated in ambient air**.

d. Either *H. influenzae* ATCC® 49247 or 49766 may be used for routine quality control testing.

e. Some lots of Mueller-Hinton agar are deficient in calcium and give small zones.

f. Deterioration in oxacillin disk content is best assessed with QC organism *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923, with an acceptable zone diameter of 18 to 24 mm.

ضمیمه شماره ۴



References

1. *Burtis C.A , Ashwood E.R , Burns D.E , TIETZ Textbook of clinical chemistry and molecular diagnostic , Fourth edition , Saunders , 2006 , pp.485-523*

2. *Burtis C.A , Ashwood E.R ,TIETZ Textbook of clinical chemistry, Third edition , Saunders , 1999, pp3-16*

3. *McPhersonR.A, PincusM.R , Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, SAUNDERS ELSEVIER ,2006,pp.99-110*

4. *Fraser C.G, Generation and application of analytical goals in laboratory medicine, Ann.1st.super.sanita. vol.27,N.3(1991).pp.369-376*

5. *Badrick T , Quality leadership and quality control, Clin Biochem Rev Vol 24 August 2003/pp.81-3*

6. *Ricos C, Alvarez V, Cava F, Garcia-Lario JV, Hernandez A, Jimenez CV, Minchinela J, Perich C, Simon M. "Current databases on biologic variation: pros, cons and progress." Scand J Clin Lab Invest 1999;59:491-500*

7. *Westgard J .O , QC - THE IDEA, 2000 available from www.westgard.com*

8. *Westgard J.O , MULTIRULE AND "WESTGARD RULES": WHAT ARE THEY? 2005 available from www.westgard.com*

9. *Westgard J .O , "Westgard Rules" Multirule Worksheets, 2006, available from www.westgard.com*

10. *Barry P.L, QC - THE LEVEY-JENNINGS CONTROL CHART 2000 available from www.westgard.com*

11. *NCCLS Document C24-A2 Vol. 19 No. 5 Statistical Quality Control for Quantitative Measurements: Principles and Definitions; Approved Guideline—Second Edition, February 1999*

12. *NCCLS Document EP13- R Laboratory Statistic – Standard deviation : A Report, Agust 1995*

13. *NCCLS Document M2-A8.volume 23, Performance Standards For Antimicrobial Susceptibility Tests. Approved Guidline,Eighth Edition, 2004*

14. *NCCLS Document C03-A3;. Preparation and Testing of Reagent Water in the Clinical laboratory , Approved Guideline. 3rd ed. ,1997*

15. *Heuck , El- Nageh ,Basic Quality assurance for intermediate and peripheral Laboratories,Second edition, WHO Regional Publications, 2002*

16. *Lewis S.M ,Quality Assurance in Hematology , WHO/ LAB/1998*

17. *Guidelines on Standard Operating Procedures for HAEMATOLOGY-Microscope-WHO Regional Office for South-East Asia 2007 Last update : 27 April 2006*

18. *BAIN.B.J , BLOOD CELLS, A Practical Guide, 3th edition, 2002*

19. *Dacie ,Lewis, PRACTICAL HEMATOLOGY, 10th edition, 2006*

20. *NCCLS Document EP12-A Vol. 22 No 14 User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline 2002*

21. *Isenberg ,Essential Procedures for Clinical Microbiology -1998*

22. Koneman Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology ; Fifth Edition ;Wiliams& Wilkins , 1997

23. Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology ; WHO ; 1992

24. Basic Laboratory Procedures in Clinical Parasitology ; WHO ; 1991

25. NCCLS Document M28-A2 Procedures for the Recovery and Identification of Parasites From the Intestinal Tract; Approved Guideline—Second Edition, 2005