



آزمایشگاه مرجع سلامت

# کنترل کیفیت در آزمایشگاههای پزشکی

گردآورنده:  
دکتر فریده رضی

نویسندگان:

دکتر فریده رضی

دکتر پریسا داهیم

آزرم نامی

دکتر فریناز راشدمرندی

منیژه وظیفه دوست

سیمین سحابی

دکتر قاسم خسروانی

دکتر محمد رهبر

دکتر سهیلا حکمت یزدی

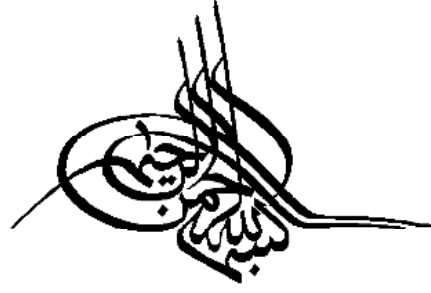
مهناز صارمی

رقیه صبوریان

دکتر سید عباس حسینی تقوی

دکتر شهلا فارسی





آزمایشگاه مرجع سلامت

# کنترل کیفیت در آزمایشگاههای پزشکی

گردآورنده :  
دکتر فریده رضی

نویسندگان :  
دکتر فریده رضی، دکتر پریسا داهیم، آزر م نامی، دکتر فریناز راشدمرندی،  
منیژه وظیفه دوست، سیمین سحابی، دکتر قاسم خسروانی،  
دکتر محمد رهبر، دکتر سهیلا حکمت یزدی، مهناز صارمی،  
رقیه صبور یان، دکتر سید عباس حسینی تقوی

انتشارات نوید شیراز

مجموعه‌ای که در پیش رو دارید با موضوع تضمین کیفیت در آزمایشگاه با تاکید بر کنترل کیفیت در بخش انجام آزمایش (آنالیتیک) تدوین و در آن مطالب پایه مانند کنترل کیفیت تجهیزات مورد استفاده در آزمایشگاه و کنترل داخلی کیفیت بصورت کاربردی و خلاصه بیان شده است.

بدیهی است برای دستیابی به اطلاعات بیشتر می توان به مراجع مورد استفاده که در انتهای دستورالعمل آمده است، مراجعه نمود.

## کنترل کیفیت در آزمایشگاههای پزشکی

دکتر فریده رضی و ...

طرح جلد: کانون تبلیغاتی کلید □ لیتوگرافی و چاپ: واصف □ تیراژ: ۳۰۰۰ جلد  
چاپ اول: ۱۳۸۸ □ حق چاپ محفوظ

ناشر: انتشارات نوید شیراز

دفتر شیراز-تلفن ۶۲-۲۲۲۶۶۶۱-۲۲۲۹۶۷۶-۰۷۱۱ □ ص.پ.: ۷۱۳۶۵/۶۶۶

دفتر تهران-تلفن ۵۹۴۵-۸۸۹۰۵۹۴۵-۸۸۹۲۱۵۲۲-۰۲۱

پست الکترونیکی: [info@navidshiraz-pub.com](mailto:info@navidshiraz-pub.com)

وب سایت: [www.navidshiraz-pub.com](http://www.navidshiraz-pub.com)

شابک: ۹۷۸-۹۶۴-۳۵۸-۸۵۷-۱ ISBN: 978-964-358-857-1

## فهرست مطالب

مقدمه	۹
فصل اول : کنترل کیفیت تجهیزات آزمایشگاهی	۱۱
میکروپیپت	۱۳
فتومتر	۲۲
سانتریفوژ	۲۸
بن ماری	۳۱
یخچال	۳۲
ترازو	۳۲
سیستمهای تخلیص آب	۳۳
میکروسکوپ	۳۶
تجزیه گرهای خودکار	۳۷
فصل دوم : کنترل کیفیت آزمایشهای بیوشیمی و سایر آزمایشهای کمی Quantitative ..	۴۱
کنترل کیفیت آماری	۴۳
انتخاب مواد کنترلی	۴۳
خطای مجاز	۴۵
کلیات نمودار کنترلی	۴۸

۴۹	اجرای گام به گام کنترل کیفیت آماری
۵۲	تفسیر نتایج
۵۳	چارت کنترلی Levey – Jenning
۵۵	چارت کنترلی با تفسیر قوانین چندگانه و ستگارد
۶۱	قوانین WHO
۶۲	انواع خطا
۶۳	اقدام اصلاحی
۶۴	چارت کنترلی تجمعی Cumulative Sum (Cusum) Control Chart
۶۷	کنترل کیفیت بر اساس نتایج بیماران
۶۷	نتایج هر بیمار بطور انفرادی
۶۸	هماهنگی با علائم بالینی
۶۸	هماهنگی با سایر نتایج آزمایشگاهی
۶۸	آزمایشهای مضاعف در آزمایشگاه
۶۹	دلتا چک با نتایج قبلی
۶۹	Limit Check
۷۰	کنترل کیفیت بر اساس نتایج بیماران متعدد
۷۱	روشهای آماری برای پایش میانگین نتایج بیماران
۷۱	هماهنگی با تشخیص نهایی
۷۳	<b>فصل سوم : نکات در مورد کنترل کیفیت در آزمایشگاه خون شناسی</b>
۷۵	مقدمه ای بر اصول کنترل کیفی در آزمایشگاه خونشناسی
۷۷	اصول کار با دستگاههای شمارشگر سلولی اتوماتیک (سل کانتر)
۷۸	محلولهای سل کانتر
۷۸	کالیبراسیون و کنترل کیفیت سل کانتر
۸۵	میکروهماتوکریت
۸۷	آزمایشهای انعقادی

فصل چهارم : نکات مهم در کنترل کیفیت آزمایشهای میکروبیشناسی .....	۸۹
نگهداری و استفاده از سویه های باکتریایی .....	۹۱
کنترل کیفیت محیط های کشت .....	۹۶
تهیه نیم مک فارلند .....	۱۰۲
کنترل کیفیت دیسک های آنتی بیوتیک جهت انجام آزمایش تعیین حساسیت میکروبی به روش <i>disk diffusion agar</i> .....	۱۰۳
روش تعیین حجم لوپ .....	۱۰۷
اتوکلاو .....	۱۱۰
فور .....	۱۱۳
انکوباتور .....	۱۱۵
نکات مهم در کنترل کیفیت آزمایشهای انگل شناسی .....	۱۱۷
نکات مهم در کنترل کیفیت آزمایشهای کیفی Qualitative .....	۱۱۹
ضمائم .....	۱۲۱



## 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 می باشد. تضمین کیفیت طیف وسیعی از فعالیتها را در بر می گیرد که اجرای آنها در یک قالب منسجم منجر به رسیدن آزمایشگاه به کیفیت مطلوب می گردد.

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

- تغییرات بیولوژیک / فیزیولوژیک در بدن فرد
- مواد مداخله گر مانند داروها
- متغیرهای پیش از انجام آزمایش مانند جمع آوری ، انتقال، آماده سازی و نگهداری نمونه

- متغیرهای حین انجام آزمایش
- متغیرهای پس از انجام آزمایش

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

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، آماده‌سازی و نگهداری نامناسب (سانتریفوژ یا دمای نامناسب نگهداری و ...)، 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 می‌شود. 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 و سایر آزمایشهای کمی، کنترل کیفیت در آزمایشهای خونشناسی، کنترل کیفیت در آزمایشهای میکروب‌شناسی، کنترل کیفیت آزمایشهای کیفی و انگل‌شناسی به‌مراه ضوابط تدوین شده است.

توضیحات مربوط به تجهیزات و ابزار رایج مورد استفاده در آزمایشگاه در بخش کنترل کیفیت تجهیزات و دستگاههایی که عموماً 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 مکتوب و نگهداری گردد.

## **فصل اول :**

### **کنترل کیفیت تجهیزات آزمایشگاهی**

اولین قدم برای استفاده صحیح از تجهیزات آزمایشگاهی، مطالعه کامل کاتالوگها و عمل به دستورالعملهای نگهداری و کنترل کیفیت مندرج در آن می باشد. مطالبی که در ذیل آمده است، جنبه عام داشته و جایگزین دستورالعمل سازنده نمی باشد.

### میکرو پیت / 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 می کنیم 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 ۱-۳ ثانیه با فشار تا توقف دوم، باقیمانده محلول را نیز کاملاً خارج می نماییم. جهت رسیدن به حداکثر دقت و صحت برای سمپلرهای با حجم ۱۰ میکرولیتر و بیشتر، توصیه می شود قبل از انتقال حجم نمونه، ۲ الی ۳ بار عمل برداشت و تخلیه از نمونه تکرار شده تا کاملاً 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، می بایست خودداری نمود.

**نکات مهمی که در کار با سمپلر می بایست 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 نیاز خشک 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 از طریق بررسی دقت و صحت عملکرد میکرو پیپت در برداشت حجم مورد انتظار حاصل میشود ، نقش مهمی در برنامه های تضمین کیفیت ایفا میکند. 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 ترازوهای 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 و نیز قابلیت تکرار آن کنترل می‌شود.

#### مواد و ابزار مورد نیاز:

۱- ماده رنگی:

- رنگ سبز خوراکی
- یا

- پارانیتروفنل

Paranitrophenol (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>3</sub>), 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 پارانیتروفنل.

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 ۴۰۱ یا ۴۰۵ برای پارانیتروفنل و 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 هر دو محلول ذخیره (stock) ذیلا بیان شده است . قابل ذکر است در سالهای اخیر رنگ سبز خوراکی بعضا بصورت ناهمگون و یا محلول عرضه شده که در این موارد، دستورالعمل زیر کاربرد نداشته و بهتر است از پارانیتروفنل استفاده شود. بطور معمول سمپلرها به سه گروه تقسیم می شوند:

الف) ۱۰۰-۱۰۰۰ میکرولیتر

ب) ۱۰-۱۰۰ میکرولیتر

پ) حجمهای کمتر از ۱۰ میکرولیتر

برای هریک از گروههای فوق می بایست 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 هر گروه از سمپلرها :

سمپلرهای گروه الف (۱۰۰-۱۰۰۰ میکرولیتر): ۱۵/۵ میلی گرم پودر رنگ سبز در ۱۰۰ میلی

لیتر آب مقطر حل شود. ( غلظت رنگ در محلول ذخیره این گروه، ۱۵/۵ میلی گرم درصد است)

سمپلرهای گروه ب ( ۱۰-۱۰۰ میکرولیتر): ۱۵۵ میلی گرم پودر رنگ سبز در ۱۰۰

میلی لیتر آب مقطر حل شود.( غلظت رنگ در محلول ذخیره این گروه، ۱۵۵ میلی 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 یا ۱۵۵۰ میلیگرم 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 می شود. ( غلظت رنگ در محلول ذخیره این گروه، ۴۲ میلی گرم در لیتر است)

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

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

## ارزیابی دقت

برای بررسی دقت عملکرد سمپلر و عبارتی سنجش مقدار عدم دقت یا قابلیت تکرار، ابتدا محلول ذخیره رنگی مناسب طبق روش ذکر شده 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) و یا 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 مقطر برای سبز خوراکی و سود برای پارانیتروفنل) قرائت می گردد. همانگونه که قبلا ذکر شد طول موج انتخابی برای قرائت جذب نوری رنگ سبز خوراکی ۶۲۰ یا ۶۳۰ نانومتر و برای پارانیتروفنل ۴۰۱ یا ۴۰۵ نانومتر میباشد.

## ۱۸ \_\_\_\_\_ کنترل کیفیت در آزمایشگاههای پزشکی

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

جدول (۱-۱)

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

سپس میانگین و انحراف معیار خوانده های جذب نوری (OD) ۱۰لوله ، محاسبه و ضریب انحراف خوانده ها (CV%) بدست می آید.

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

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

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

CV : ضریب انحراف (Coefficient of variation)

SD : انحراف معیار

mean : میانگین جذب نوری لوله ها

n : تعداد خوانده ها

$x_i$  : جذب نوری هر لوله

در صورت انتقال صحیح حجم آب و یا 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 خوانده ها (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) و یا (۱/۱۱)

بدین منظور با پی پت کلاس A، مقداری از محلول رنگی ذخیره (متناسب با گروه حجمی سمپلر 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 ۱۰۰- ۱۰ ) 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 کلاس A، ۱ میلی لیتر از رنگ ذخیره (گروه ب) به آن اضافه و مخلوط نمائید.

#### کنترل صحت گروه الف (سمپلرهای ۱۰۰۰-۱۰۰) 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، ۱۰ میلی لیتر از رنگ ذخیره (گروه الف) به آن اضافه و مخلوط نمائید.



## ۲۰ \_\_\_\_\_ کنترل کیفیت در آزمایشگاههای پزشکی

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

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

$$Bias \% = \frac{expected - observed}{expected} \times 100$$

*expected*: میانگین جذب نوری ۳ خوانده از محلول 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 فناوری ابزار آزمایشگاهی و بهبود کیفیت عملکرد ابزار، مقادیر عدم صحت و عدم دقت ادعائی سازندگان میکرو پیپتها نیز بسیار کاهش یافته است.

با توجه به مختصات کیفیتی بسیاری از میکرو پیپتها، حداکثر میزان قابل قبول عدم دقت  $CV\% = 2\%$  و حداکثر میزان قابل قبول عدم صحت  $Bias\% = 3\%$  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 می نمایند ( Fixed Volume سمپلرهای ) در صورت وجود Bias غیرقابل قبول، می توان با استفاده از اطلاعات مندرج در راهنمای 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 ۱۰۰ میکرو لیتر (۱٪ تغییر ) ، در حجم ۱۰ میکرو لیتر نیز 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 می پذیرد ولی مطالب ذیل در مورد بیشتر انواع سمپلر صادق می باشد.

- 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 ضد عفونی کردن ، محلول ۶۰٪ ایزوپروپانل توصیه می شود. برخی از انواع سمپلر نیز قابل اتوکلاو هستند.

- پس از شستشوی سطوح خارجی و تمیز کردن 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 خوردندگی 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 می گیرند عبارتند از خطی 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. بعلا تأثیر متغیرهایی از قبیل خطای رقت ، کاهش پایداری ، تغییرات pH و تأثیرات دما در محلولها، باید در استفاده از این روش ، عوامل یاد شده را تحت کنترل گرفت. در صورت امکان، استفاده از فیلترهای شیشه ای solid glass filter مانند دیدمیوم، جایگزینی برای روش قبل میباشد ( این فیلترها از طریق شرکت های 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 ۳۴۰ نانومتر از محلول دی کرومات 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 هموگلوبین ۱۷۰ g/l به ۵ میلی لیتر درابکین ، محلولی با جذب نوری حدود ۲/۰۹ بدست می آید .) اگر میزان هموگلوبین نمونه کم باشد حجم 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 و ۱/۱۶) و جذب نوری محلول ذخیره و رقتهای تهیه شده در طول موج یاد شده در مقابل بلانک درابکین، قرائت می گردد تا ۵ خوانده بدست آید . جذبهای نوری قرائت شده به عنوان مقدار مشاهده شده (Observed) در نظر گرفته می شود .

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 :

جذب نوری	رقت
۰/۴	۱/۴
x	۱/۲

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 می گردد .

$$Bias = \frac{expected - observed}{expected} * 100$$

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

جدول ۱-۲

(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

برای بررسی خطی بودن در طول موج ۴۰۵ نانومتر از محلول پارانیتروفنل ۰/۰۸ میلی مول در لیتر استفاده می گردد . 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.

$$0.13911 \times 0.08 = 0.011288 \text{ گرم} = 11.11288 \text{ میلی گرم} \sim 11.1 \text{ میلی گرم}$$

این محلول جذبی در حدود ۲ خواهد داشت و با تهیه رفتهای مختلف در سود (Na OH) ۰/۰۱ نرمال می توان خطی بودن در محدوده جذب 0.1 تا 2 را در طول موج ۴۰۵ نانومتر و در مقابل بلانک سود، بررسی نمود. بطور مثال با تهیه محلولهایی با غلظت 0.02 ، 0.04 ، 0.06 ، 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



جدول ۱-۳

غلظت محلول پارانیتروفنل $\mu\text{mol/L}$	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 ۳۴۰ نانومتر از محلول دی کرومات پتاسیم استفاده می شود.

برای تهیه محلول، پودر دی کرومات پتاسیم را در oven با حرارت ۱۱۰ درجه سانتی گراد به مدت یکساعت خشک کرده و 200 میلی گرم آن را با اسید سولفوریک ۰/۰۱ نرمال به حجم ۱ لیتر برسانید. این محلول را بعنوان ذخیره در شیشه تیره نگهداری نمایید. محلول ذخیره جذبی در حدود ۲ خواهد داشت و با تهیه رقتهای مختلف در اسید سولفوریک ۰/۰۱ نرمال، می توان 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 50 ، 100 ، 150 ، 200 ، 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	$x$

جدول ۴-۱

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

میزان عدم صحت مجاز در هر رقت حداکثر ۵٪ پیشنهاد می شود . 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 اسپکتروفتومتر 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 می گردد . جذب نوری در محدوده ۰/۰۰۵ ± ۰/۵۳۶ نشاندهنده صحت فتومتریک دستگاه می باشد.

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

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

### ۳- صحت طول موج

ارزیابی صحت طول موج به منظور ارزیابی ادعای سیستم در تاباندن 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 سیان مت هموگلوبین (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 می گردد. (لازم بذکر است پس از هر تغییر طول موج ، باید جذب نوری دستگاه با محلول بلانک صفر گردد .) بر اساس طول موج و میزان جذب ، یک منحنی رسم می گردد که در صورت وجود صحت طول موج ، حداکثر جذب نوری را در ۵۴۰ نانومتر نشان خواهد داد.

نکته : بررسی صحت طول موج با استفاده از روش گفته شده برای فتومتر امکانپذیر نمی باشد. این بررسی می بایست 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 می دهد، عدم پایداری مقدار جذب خوانش شده در طول زمان می باشد.

برای بررسی ، ابتدا دستگاه را با درابکین صفر نموده و پس از ریختن محلول سیان مت هموگلوبین در کووت و بستن درب آن با پارافیلیم ، جذب نوری این محلول هر ۵ تا ۱۵ دقیقه یکبار (بمدت یکساعت) قرائت می گردد. حداکثر تغییر مجاز در جذبهای نوری قرائت شده طی این مدت  $0.005 \pm$  می باشد .

بعنوان مثال اگر جذب محلولی در ابتدا 1.259 باشد در مدت یکساعت می تواند در محدوده  $1.259 \pm 0.005$  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 می کند (مثل استن یا نیتريت سدیم در طول موجهای خاص ) در مسیر عبور نور قرار داده می شود . در این حالت می بایست ترانس میتانس 0 % ( جذب بی نهایت و غیر قابل خوانش) باشد زیرا نور از محلول عبور نکرده و به دتکتور نمی رسد.

برای بررسی انوار ناخواسته محلول آبی ۵۰ گرم در لیتر سدیم نیتريت 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 می نمایند ، از بین پارامترهای گفته شده تنها می توانند 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 و یا سوسپانسیون ، از قسمتهای سنگینتر آن جدا میشود .

اساس عمل سانتریفوژ، حرکت دورانی حول یک محور ثابت است . نیروی سانتریفوژ یا Relative Centrifugal Force(RCF) بستگی به شعاع و سرعت دوران داشته ، با فرمول زیر محاسبه و واحد آن نیز بر اساس ضریبی از g (gravity) بیان میشود . ( بطور مثال  $g \times 500$  )

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

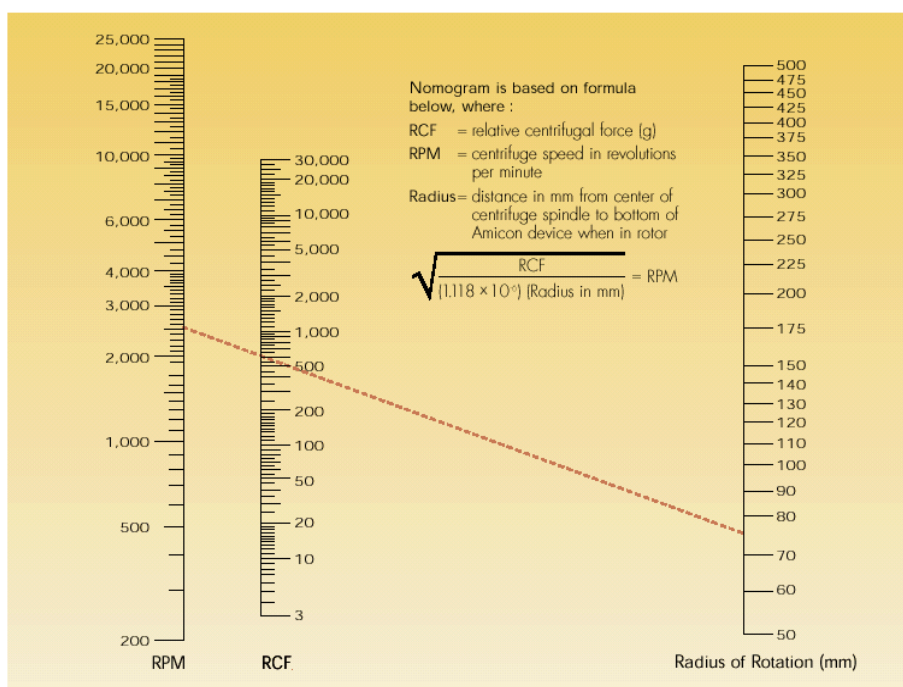
مقدار تجربی قراردادی  $1.118 \times 10^{-5}$

شعاع سانتریفوژ بر حسب سانتیمتر = r

مقدار شعاع، از مرکز چرخش سانتریفوژ (محور) تا انتهای لوله درون سانتریفوژ اندازه گیری میشود.

سرعت چرخش بر حسب دور در دقیقه  $\text{rpm} =$

نیروی سانتریفوژ RCF را میتوان به وسیله نمودارم نیز تعیین نمود.



در این حالت با کشیدن خطی که از شعاع سانتریفوژ و g مورد انتظار عبور می کند و ادامه آن، سرعت بدست می آید. بعنوان مثال در شکل فوق برای بدست آوردن قدرت 500g در سانتریفوژی که شعاع آن ۷۵ میلی متر 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.



## ۳۰ ————— کنترل کیفیت در آزمایشگاههای پزشکی

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 می باشند. سرعت این نوع سانتریفوژ ، می تواند نسبت به مورد قبلی بیشتر باشد ولی در زمان چرخش بعلت مقاومت به هوا ، درون آن گرمای بیشتری ایجاد شده و دما بالا می رود. 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 لوله ها و حجم نمونه ها هنگام استفاده از سانتریفوژ از نکات اساسی در استفاده صحیح سانتریفوژ میباشد . بطور معمول وزن لوله های حاوی نمونه که مقابل هم قرار گرفته اند نباید بیش از ۱٪ متفاوت باشند. وزن مجموع لوله های حاوی نمونه نباید از وزن تعیین شده سازنده برای سرعت خاص ، تجاوز نماید .
- لازم است درب لوله های حاوی خون قبل از سانتریفوژ بسته شود تا از پخش آئروسول 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

## ۳۱ **کنترل کیفیت تجهیزات آزمایشگاهی**

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 می شود 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 زمان سنج را در زمانهای مختلف تنظیم و با کرومومتر مقایسه کنید. اعداد حاصله نباید بیش از ۱۰٪ با زمان مورد انتظار متفاوت باشد.

کنترل دما: برخی سانتریفوژها 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 اندازه گیری کمیتی مورد نظر است که به دما حساس میباشد، بهتر است از سانتریفوژ یخچال دار استفاده شود. برای کنترل دما، می توان در لوله آزمایش، آب مقطر ریخته و دمای آنرا تعیین نمود. سپس لوله در سانتریفوژ قرار گرفته و دستگاه با دور مشخص روشن می شود. پس از مدت مقرر، دمای آب داخل لوله مجدداً 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 می شود. برای استفاده مناسب از بن ماری باید به موارد زیر توجه داشت.

- ۱- سطح آب در بن ماری باید بالاتر از سطح مایعات انکوبه شده باشد.
- ۲- آب بن ماری باید مرتباً تعویض گردد تا از رشد میکروبها جلوگیری بعمل آید.
- ۳- برای جلوگیری از ایجاد رسوب بهتر است از آب مقطر برای پر کردن بن ماری استفاده شود. در صورت ایجاد رسوب می توان از اسید کلریدریک رقیق برای از بین بردن رسوبها استفاده نمود.
- ۴- برای اطمینان از دمای بن ماری می بایست دمای آب، روزانه بوسیله دماسنجی غیر از دماسنج درون بن ماری، کنترل گردد.
- ۵- در مورد بن ماری هایی که فاقد سیرکولاتور آب می باشند ، لازم است در چهار گوشه بن ماری دماسنجهای دقیق قرار گرفته و نتایج آن با دماسنج درون بن ماری مقایسه گردد.
- ۶- میزان خطای مجاز دما برای آزمایشهای نقطه پایانی (end point)  $\pm 0.5$  می باشد.

### یخچال

- برای استفاده صحیح از یخچال باید به موارد زیر توجه داشت :
- ۱- یخچالها باید طوری قرار گیرند که هوای کافی از مبرد که عموماً در پشت یخچال است ، عبور نماید.
  - ۲- دمای یخچال باید روزانه دو بار در ساعات مشخص، اندازه گیری 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، مرتباً بررسی شود.

### ترازو

عواملی مانند دما، رطوبت ، نیروی جاذبه و هوا می توانند در اندازه گیری 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 اندازه گیری 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 می شود. 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 می شود.
  - ۸- برای اطمینان از صحت اندازه گیری لازم است علاوه بر کالیبراسیون داخلی ، در فواصل زمانی مشخص با استفاده از وزنه های کالیبره با وزن معین، صحت عملکرد را بررسی کرد یا از طریق مراجع کالیبراسیون معتبر ، اقدام به کالیبراسیون دستگاه نمود.

### سیستم های تخلیص آب

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

برای تهیه آب از روشهای تقطیر ، اسموز معکوس و دیونیزه کردن استفاده می شود. 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 نمی نمایند ، 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 جدول ۵-۱ آمده است.

جدول ۵-۱

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 µm)	P	P	P	E	E	P
Ultrafiltration	P	P	P	E	E	P

E : Excellent    G : Good    P : Poor

موارد استفاده از انواع آب بشرح زیر می باشد.

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

جدول ۶-۱

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 <sup>3</sup>	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 <sub>2</sub> /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 نوع II و III را می توان در ظروف بوروسیلیکات یا پلی اتیلن 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 کندانکتومتر استفاده می‌شود که میزان هدایت آب را اندازه می‌گیرد. هدایت با مقاومت نسبت عکس دارد ( $\text{Conductivity} = 1/\text{resistance}$ ). مقاومت برای آب نوع I، II و III به ترتیب  $10 \text{ M}\Omega/\text{cm}$ ، ۲ و  $0.1$  می‌باشد پس هدایت به ترتیب معادل  $10 \text{ }\mu\text{S}/\text{cm}$ ،  $0.5$  و  $10$  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  $10$  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  $8-2$  درجه امکانپذیر است. بعد از مخلوط کردن آب (که با  $10$  بار سروته کردن بدست می‌آید)،  $1$  میلی لیتر از آب در پتری دیش ریخته می‌شود. سپس محیط کشت ذوب شده تا دمای  $50-46$  درجه سرد و در پتری دیش ریخته می‌شود (از محیط کشت های TSA، BHI یا هر محیط کشتی که از رشد باسیلهای گرم منفی پشتیبانی کند، می‌توان استفاده نمود). با چرخاندن پتری دیش، آب را با محیط کشت مخلوط نمائید. پس از سرد شدن و جامد شدن آگار، دیش بطور وارونه و بمدت  $24$  ساعت در دمای  $36 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد و سپس  $24$  ساعت در دمای  $23 \pm 3$  درجه سانتی‌گراد قرار می‌گیرد (مدت انکوباسیون مجموعاً  $48$  ساعت می‌باشد) رشد میکروبی بصورت cfu/mL گزارش می‌شود.

نکته: 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

برای حفظ 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 گزلیل 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 آن 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.

### اتومیشین و تجزیه 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

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

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

منبع نوری، منوکروماتور، محفظه کووت، انکوباتور برای 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 سیستمهای Discrete 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 و یا 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 کمیتهای باید به غلظت مناسب کالیبراتور نیز توجه داشت بطور مثال برای کالیبراسیون HDL میباید از کالیبراتور مخصوص همین کمیت استفاده کرد نه از کالیبراتور کلسترول توتال.
- استفاده از کالیبراتور و کنترل های مورد توصیه سازنده کیت یا استفاده از کالیبراتور و کنترل های 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 و یا 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 از مقدار خطای مجاز اندازه گیری پروتئین و یا 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

## کنترل کیفیت تجهیزات آزمایشگاهی

۳۹

مورد سنجش ALT قرار میگیرد. پراکندگی نتایج حاصله برحسب CV% نباید بیش از مقدار خطای مجاز اندازه گیری ALT و یا میزان خطای مجاز ادعا شده توسط سازنده کیت باشد. انتقال ناخواسته Carry Over : در دستگاه تجزیه گر خودکار ممکن است نمونه یا معرف بطور ناخواسته انتقال یابند.

برای بررسی انتقال ناخواسته معرف، پیشنهاد میگردد از دوتستی که NADH را اندازه گیری می نمایند، استفاده شود. بطور مثال آزمایشهای LDH و 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، ۳۰ بار 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 اندازه گیری LDH برحسب CV اندازه گیری میشود. سپس در یک سری کاری ۳۰ بار LDH به تنهایی ( بدون همراهی با ALT) اندازه گیری و پراکندگی نتایج حاصله برحسب CV محاسبه میشود. CV% در حالت اول (آزمایش LDH و ALT) باید معادل یا کمتر از حالت دوم (اندازه گیری 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 و یا ALT در غلظتهای بالا و پایین انتخاب شده بطور متناوب هریک از نمونه های با غلظتهای پایین (L) و بالا (H) سه بار مورد آزمایش قرار می گیرند

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

#### ۴۰ \_\_\_\_\_ کنترل کیفیت در آزمایشگاههای پزشکی

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 اندازه گیری 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 خودکار میتوان به دستورالعمل های ECCLS و CLSI رجوع نمود.

## **فصل دوم :**

**کنترل کیفیت در آزمایشهای بیوشیمی و سایر**

**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 قرار بگیرد، پاسخهای آزمایش بیماران نیز قابل قبول شناخته می‌شوند و برعکس اگر خارج از محدوده مورد انتظار قرائت شود، احتمال وجود خطا در سیستم آزمایش مطرح شده و طبیعتاً 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 می گیرند.

۳. یکنواختی: ویالهای مختلف کنترل باید هموزن 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 نشی 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 پرپتون

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

## کنترل کیفیت در آزمایشهای بیوشیمی و سایر آزمایشهای کمی \_\_\_\_\_ ۴۵

گزارشدهی کیت اندازه‌گیری گلوکز ، ۳۰ تا ۴۰۰ میلی گرم در دسی لیتر است، می توان کنترلهایی با غلظت تقریبی ۴۰ و ۳۸۰ میلی گرم در دسی لیتر 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 دارای مقدار مشخص است درحالی که ماده کنترلی برای کنترل کیفیت روش آزمایشگاهی بکار می‌رود و اغلب دارای محدوده غلظتی می‌باشد .

نکته ۲: در خرید کالیبراتور و مواد کنترلی به همخوانی معرف با کالیبراتور و کنترل تجاری توجه داشته باشید. این موضوع را می‌توانید از شرکت پشتیبان کیت و معرف استعلام نمایید.

نکته ۳: به حجم رساندن مواد کنترلی لیوفیلیزه می‌بایست با وسایل 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 در آزمایشگاهها 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 ۲۰۰ mg/dL به شکل زیر محاسبه می گردد.

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

از محاسبات بالا نتیجه می گیریم، به احتمال ۹۵٪ اگر کلسترول یک نمونه با غلظت واقعی ۲۰۰ mg/dL چند بار اندازه گیری شود، نتایج در محدوده  $200 \pm 8$  mg/dL یعنی  $mean \pm 2SD$  قرار خواهد گرفت.

خطای مجاز باید واقع بینانه و بر اساس شرایط آزمایشگاه ، بصورتی انتخاب شود که بتواند میزانی از خطا، که تصمیم گیری بالینی را متاثر می سازد، 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 نمونه ای با غلظت واقعی ۱۲۶ mg/dL داشته باشد، در ۹۵٪ موارد احتمال دارد نتایجی در محدوده ۱۴۶-۱۰۶ mg/dL ارائه دهد که این طیف غلظتی وسیع، مشخصا باعث اشتباه در تصمیم گیری پزشک خواهد شد . اگر این آزمایشگاه میزان CV% مجاز خود را به ۱٪ تغییر دهد در غلظت ۱۲۶ mg/dL نتایجی بین ۱۲۹-۱۲۳ mg/dL خواهد داشت که اگرچه برای پزشک مطلوب است، ولی باعث می شود سری های کاری مکرر و بطور کاذب مردود (False rejection) شناخته شوند . این امر خود منجر به افزایش دفعات تکرار آزمایش، صرف هزینه و خستگی کارکنان می گردد.

روشها و فرضیه های مختلفی که برای تعیین مقادیر خطای مجاز استفاده گردیده دیلا بطور مختصر معرفی 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 می گردد.

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



## کنترل کیفیت در آزمایشهای بیوشیمی و سایر آزمایشهای کمی \_\_\_\_\_ ۴۷

از آنجاییکه محدوده مرجع تحت تاثیر عوامل مختلفی مثل گروه مورد بررسی ، مشخصات روش آزمایشگاهی و غیره 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 Improvements 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 ( NCEP ) National cholesterol education program می باشد. مقادیر حاصل از این روش برای تعداد محدودی از آزمایشها قابل دستیابی می باشد.

۵- تغییرات بیولوژیک : در این روش تغییرات یک پارامتر در 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 می گردد.

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 جدول ۱-۲ مقادیر عدم دقت مجاز برحسب CV% را برای لیپیدها، از دیدگاههای مختلف نشان می دهد.

جدول ۱-۲

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 می شود. لذا مجددا تاکید می نماید آزمایشگاه می بایست 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 می توان به آدرسهای زیر مراجعه نمود.

<http://www.westgard.com/biodatabase1.htm>

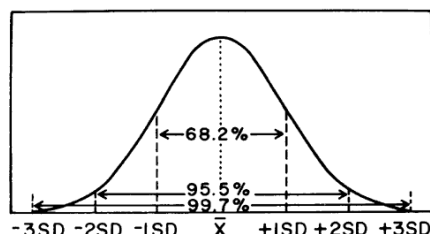
<http://www.westgard.com/clia.htm>

<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. در نمودار کنترلی، غلظت حاصله از آزمایش سرم کنترل، روی نموداری بامحدوده مشخص، علامتگذاری و بصورت گرافیکی و ساده نمایش داده می شود. اگر نتایج درون محدوده مشخص شده قرار گیرد، شرایط تحت کنترل و عملکرد سیستم مناسب تشخیص داده می شود. مشاهده نتایج خارج از محدوده نشانگر بروز مشکل بوده و لزوم بررسی عملکرد سیستم را مطرح می سازد.

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 می گردد. همانطور که در شکل مشاهده می شود، بطور معمول در صورتی که نمونه ای مکررا آزمایش شود انتظار می رود نتایج حاصله، از توزیعی نرمال (توزیع گوسین) برخوردار باشند. در یک توزیع نرمال ۹۵٪ خوانده ها در محدوده  $\pm 2\text{ SD}$  و ۹۹/۷٪ خوانده ها در محدوده  $\pm 3\text{ SD}$  قرار می گیرند. پس احتمال اینکه خوانده ای بطور اتفاقی خارج از محدوده  $\pm 2\text{ SD}$  قرار گیرد حدود ۵٪ (بعبارتی ۱ نتیجه بین ۲۰ خوانده) و در مورد محدوده  $\pm 3\text{ SD}$  تنها ۰/۳٪ (۳ نتیجه بین ۱۰۰۰ خوانده) می باشد.



برای اینکه نمودار کنترلی مقدار و محدوده مناسبی داشته باشد می‌بایست تاثیر نتایج پرت (Outliers) را به حداقل رساند. زیرا وجود حتی یک خواننده 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 از محدوده  $\text{mean} \pm 3\text{SD}$  در نظر گرفته می‌شوند، حذف نمود. (این محدوده بستگی به تعداد خواننده‌ها داشته و با افزایش تعداد خواننده‌ها افزایش می‌یابد بطوریکه برای تعداد ۳۰ خواننده محدوده  $\text{mean} \pm 3.14\text{SD}$  و برای ۴۰۰ خواننده محدوده  $\text{mean} \pm 3.83\text{SD}$  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 محدوده  $\text{mean} \pm 3\text{SD}$  فقط ۰/۰۰۳ (۳ نتیجه بین ۱۰۰۰ 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  $\text{CV}\%$  را مشخص نمایید.
- ۲- نمونه های کنترلی مناسب را حتی‌المكان در دو غلظت انتخاب کنید.
- ۳- نمونه های کنترلی را به یکی از راههای زیر، ۲۰ بار آزمایش نمایید تا ۲۰ خواننده بدست آید:
  - ۳-۱) بهتر است این تعداد خواننده 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 بار در هر روز آزمایش نمود.

## ۵۰ \_\_\_\_\_ کنترل کیفیت در آزمایشگاههای پزشکی

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 واقعی تری بدست آید. هر چه این مرحله کوتاهتر شود تاثیر متغیرها کمتر شده و نتایجی نزدیک به هم حاصل می گردند. بدیهی است در این شرایط محدوده چارت بسیار کوچک و غیر واقعی شده و طبیعتاً در مراحل بعدی موارد رد کاذب نتایج (False rejection) افزایش می یابد.

۴- میانگین، انحراف معیار و ضریب انحراف را براساس فرمولهای زیر محاسبه نمایید.

انحراف معیار با استفاده از ماشین حساب یا برنامه های نرم افزاری یا به روش دستی قابل محاسبه است.

$$\text{mean} = \frac{\sum x_i}{n}$$
$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \text{mean})^2}{n - 1}}$$
$$CV\% = \frac{SD * 100}{\text{mean}}$$

CV : ضریب انحراف (Coefficient of variation)

SD: انحراف معیار

mean : میانگین

n : تعداد خوانده ها

$x_i$  : هر تک خوانده

۵- قابلیت تکرارپذیری (SD یا CV%) بدست آمده را با عدم دقت مجازی که قبلاً تعیین نموده اید، 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، مجدداً مراحل ۴-۱ را اجرا نمایید. در صورتیکه علیرغم بررسی متغیرها، مشکل رفع نشده باشد با تولیدکننده فرآورده یا دستگاه تماس بگیرید.

۶- برای هر غلظت از نمونه کنترلی، با استفاده 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 و نتیجه 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:** محدوده‌ای که در بروشورهای کنترل‌های تجاری درج شده نباید برای ترسیم چارت کنترل کیفیت استفاده شود. این محدوده عمدتاً براساس آزمایش سرم کنترل‌ها در آزمایشگاههای مختلف تعیین می‌شود و متغیرهای متعددی مانند اختلاف دستگاهها، شماره ساختهای مختلف کیت و کالیبراتور بر روی 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 تأیید سازنده معرف یا دستگاه قرار داشته باشد.

## ۵۲ \_\_\_\_\_ کنترل کیفیت در آزمایشگاههای پزشکی

نکته: باید توجه نمود که افزایش تعداد کنترلها در هر سری کاری اگرچه می تواند باعث تشخیص بهتر خطا شود ولی بعلاوه افزایش میزان رد کاذب باعث افزایش هزینه می گردد. لذا پیشنهاد می گردد 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 آن بشرح زیر می باشد.

کنترل ۱					کنترل ۲				
روز اول	200	207	190	205	روز اول	247	263	261	257
روز دوم	205	197	204	205	روز دوم	250	251	254	258
روز سوم	196	209	196	197	روز سوم	255	260	239	256
روز چهارم	202	200	204	196	روز چهارم	243	253	236	249
روز پنجم	190	196	200	198	روز پنجم	254	244	250	257

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

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

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

### 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.

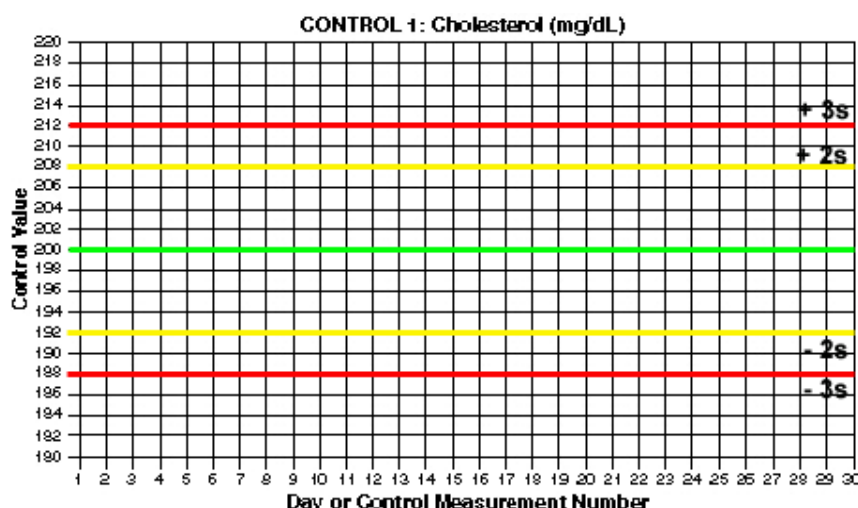
#### ۱- چارت کنترلی Levey –Jenning

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 در صنعت مطرح گردیده بود ، می‌تواند با محاسبه میانگین و محدوده برای روشهای آزمایشگاهی استفاده شود.

برای ترسیم و استفاده از چارت کنترلی Levey –Jenning مراحل زیر را دنبال نمایید :

- 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  $\pm 4 SD$  mean را در بر گیرد.
- ۳- اگر تعداد کنترلهایی که در سری کاری استفاده می شود ۲ یا بیشتر باشد  $\pm 3SD$  mean را بعنوان محدوده قابل قبول انتخاب کنید. اما اگر در هر سری کاری یک کنترل آزمایش می‌شود محدوده  $\pm 2SD$  mean را ملاک قرار دهید.
- ۴- میانگین و محدوده مورد قبول خود را 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 انتظار  $\pm 3 SD$  mean یا  $\pm 2 SD$  mean ( 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 ۲۰۰ و انحراف معیار ۴ mg/dL



نکته : بعلت سهولت کار بسیاری از آزمایشگاهها از چارت کنترلی Levey-Jenning استفاده می نمایند ولی باید در نظر داشت استفاده از هریک از این محدوده های  $\text{mean} \pm 3\text{SD}$  یا  $\text{mean} \pm 2\text{SD}$  دارای معایبی می باشد اگر محدوده  $\text{mean} \pm 3\text{SD}$  انتخاب شود احتمال شناسایی خطا کاهش می یابد در حالیکه رد کاذب ( False rejection ) کمتر از ۰.۵٪ است. اگر محدوده  $\text{mean} \pm 2\text{SD}$  در نظر گرفته شود ، احتمال تشخیص خطا افزایش می یابد اما میزان رد کاذب ( False rejection ) افزایش می یابد.

با افزایش تعداد کنترلهایی که در هر سری کاری آزمایش می شوند (n)، میزان رد کاذب افزایش می یابد. در صورت استفاده از یک کنترل (n=1) رد کاذب ۰.۵٪ می باشد ولی این میزان برای ۲ کنترل (n=2) به ۰.۹٪ و برای ۴ کنترل (n=4) به ۰.۱۸٪ می رسد .

بعنوان مثال اگر آزمایشگاهی در هر سری کاری دو غلظت نمونه کنترلی را بصورت دابل آزمایش نماید، در واقع در هر سری کاری ۴ کنترل را آزمایش کرده و رد کاذب نتایج این آزمایشگاه به ۰.۱۸٪ می رسد.



## 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 نمونه های کنترلی را آزمایش نمایید.

مادامیکه کنترلها در محدوده  $\text{mean} \pm 2\text{SD}$  قرار دارند، نتایج بیماران را گزارش نمایید ولی به محض اینکه یکی از کنترلها از محدوده  $\text{mean} \pm 2\text{SD}$  خارج شد، کار را متوقف و نتایج کنترلها را از نظر وجود یکی از قوانین زیر بررسی نمایید.

1  $2s$  یک کنترل خارج از محدوده  $\pm 2 \text{ SD}$  بمعنی هشدار بوده و لزوم

بررسی سایر قوانین را مطرح می‌سازد.

1  $3s$  یک کنترل خارج از محدوده  $\pm 3 \text{ SD}$  باعث رد نتایج شده و

می تواند نشاندهنده خطای راندوم یا شروع خطای سیستماتیک باشد.

2  $2s$  دوخوانده متوالی همسو و خارج از محدوده  $\pm 2\text{SD}$  باعث رد نتایج

شده و به خطای سیستماتیک حساس می‌باشد.

R  $4s$  یک خوانده خارج از محدوده  $2 \text{ SD} +$  و دیگری خارج از محدوده

$2 \text{ SD} -$  باعث رد نتایج گردیده و نشانگر خطای راندوم می‌باشد.

4  $1s$  ۴ خوانده متوالی و همسو، خارج از محدوده  $1 \text{ SD} +$  یا  $1 \text{ SD} -$

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 می باشند. بعنوان مثال در مورد قانون  $2s$  ممکن است یک خواننده دیروز و یک خواننده امروز، همسو و خارج از محدوده  $2SD$  قرار گرفته باشد یا در یک سری کاری، یک خواننده در کنترل ۱ و خواننده دیگر در کنترل ۲ (نتایج هر دو کنترل) خارج از محدوده  $2SD$  قرائت گردند.

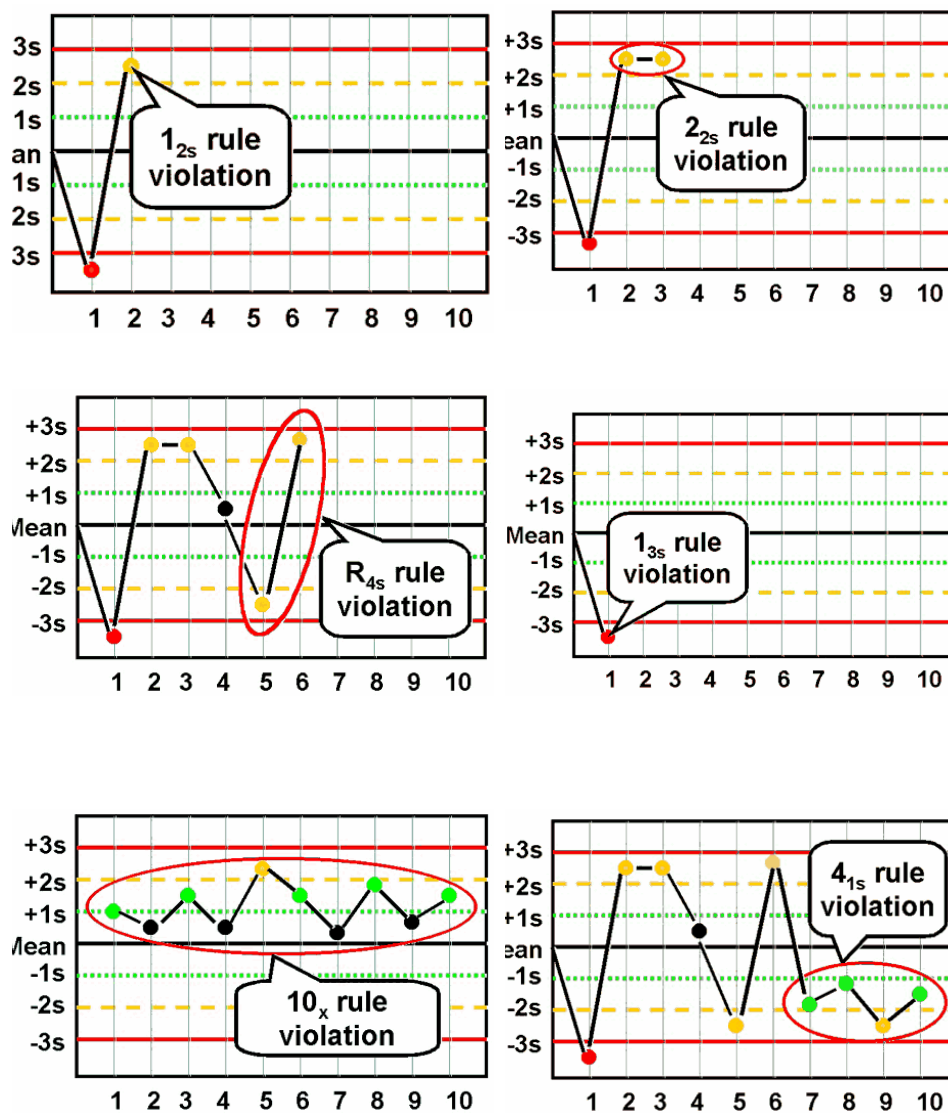
مورد استثنا قانون  $R_{4s}$  است که در آن باید دو خواننده بدست آمده از یک سری کاری با یکدیگر  $4SD$  فاصله داشته باشند. اگر در دو سری کاری متفاوت، نتایج با هم  $4SD$  فاصله داشته باشند، این قانون کاربرد ندارد.

نکته: در سال ۲۰۰۶ با توجه به پیشرفت های تجهیزات و نیز کامپیوتری شدن بسیاری از برنامه ها، دو تغییر در قوانین وستگارد ایجاد شد. اول اینکه قانون  $1s$  به عنوان هشدار حذف گردید و پیشنهاد شد قوانین  $10x$  و  $4s$  حتی در شرایطی که نتیجه در محدوده  $\pm 2SD$  دارد، اعمال شود. این امر اگر چه منجر به تشخیص سریعتر خطا می شود 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 می نماید چنانچه چارت بصورت دستی ترسیم می شود، مطابق با نظریات قبلی وستگارد، قوانین زمانی بررسی شوند که حداقل یک نتیجه خارج از محدوده  $mean \pm 2SD$  قرائت شده باشد.

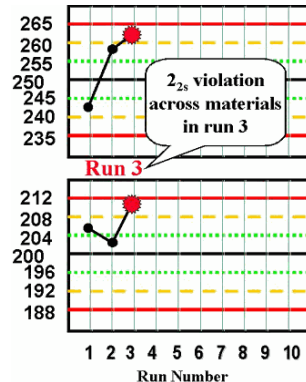
تغییر دوم اینکه در صورت استفاده از ۳ یا ۶ کنترل در هر سری کاری (مضرب ۳) قوانین تفسیر تا حدی متفاوت می باشند.

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

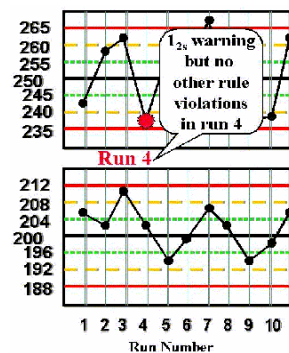
مثال ۱: در شکلهای زیر قوانین وستگارد با آزمایش یک کنترل در هر سری کاری نمایش داده شده است.



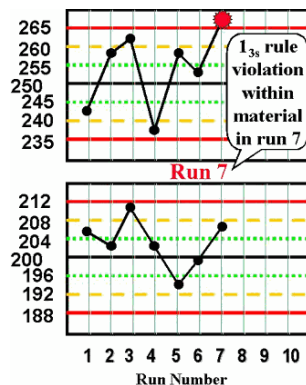
مثال ۲: در شکل‌های زیر قوانین وستگارد با آزمایش دو کنترل در هر سری کاری، نمایش داده شده است.



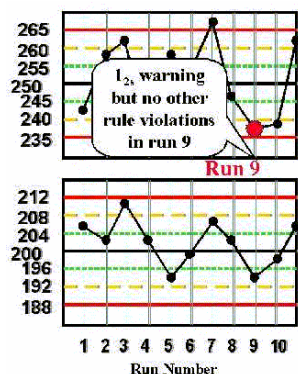
در سری سوم کاری هر دو کنترل خارج از محدوده  $2\text{ SD} +$  هستند پس براساس قانون  $2\sigma$  این سری کاری رد می‌شود.  
به احتمال زیاد یک خطای سیستماتیک در این محدوده غلطی وجود دارد.



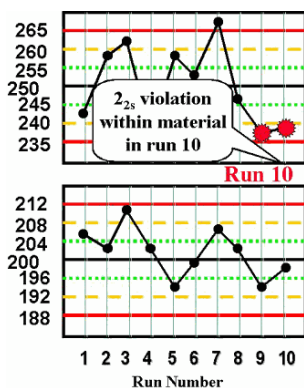
در سری چهارم کاری کنترل با غلطت بالا، خارج از محدوده  $2\text{SD}-$  قرار گرفته و احتمال خطا وجود دارد. از آنجاییکه سری کاری قبلی (سری سوم) رد شده است فقط سری چهارم از نظر وجود قوانین  $13\sigma$  و  $22\sigma$  و  $R4\sigma$  بررسی می‌گردد. با توجه به عدم وجود ۳ قانون نامبرده، این سری کاری قبول می‌شود ولی باید به هشدار توجه نمود.



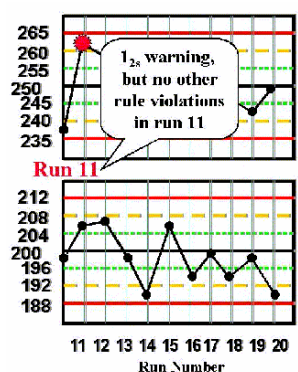
در سری هفتم کاری نتیجه کنترل با غلطت بالا خارج از محدوده  $3\text{SD} \pm$  قرار گرفته که باعث رد این سری کاری می‌گردد.  
به احتمال زیاد یک خطای راندام وجود دارد.



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  $13s$  و  $22s$  و  $R4s$  بررسی می گردد. با توجه به عدم وجود ۳ قانون نامبرده ، این سری کاری قبول می شود ولی باید به هشدار توجه نمود.

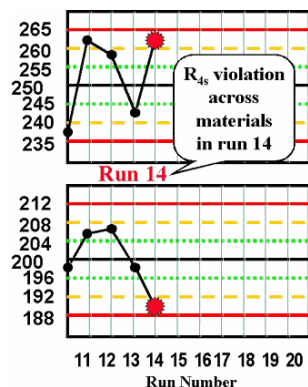


در سری دهم کاری در چارت کنترل با غلظت بالا ، دو خوانده متوالی در دو سری کاری متوالی، خارج از محدوده  $2SD$  - قرار گرفته که با توجه به قانون  $22s$  باعث رد سری دهم می گردد. به احتمال زیاد یک خطای سیستماتیک وجود دارد.

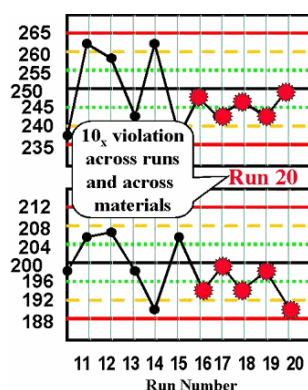


در سری یازدهم کاری کنترل با غلظت بالا ، خارج از محدوده  $2SD+$  قرار گرفته و احتمال خطا وجود دارد. چارت از نظر وجود قوانین  $13s$  و  $22s$  و  $R4s$  بررسی می گردد. با توجه به عدم وجود ۳ قانون نامبرده ، این سری کاری قبول می شود ولی باید به هشدار توجه نمود.

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 محدوده  $+1SD$  وجود دارد. علیرغم وجود قانون  $4_{1s}$ ، از آنجاییکه در سری دوازدهم هیچیک از نتایج، خارج از محدوده  $2SD$  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  $-2SD$  قرار گرفته پس با قانون  $R_{4s}$  سری کاری رد می‌شود. به احتمال زیاد یک خطای راندام وجود دارد.



در سری بیستم کاری بررسی نتایج در سریهای قبلی نشان می‌دهد که ۵ نتیجه در غلظت بالا و ۵ نتیجه در غلظت پایین در یک طرف میانگین قرار گرفته که با قانون  $10_x$  باعث رد سری بیستم می‌گردد. 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 برمی خورید 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  $\text{mean} \pm 2 \text{ SD}$  نشان می دهد 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 خوانده ها بطور پیاپی و ثابت در یک طرف میانگین نشانگر وجود bias می باشد که باید شناسایی و اصلاح گردد.
- پراکندگی زیاد نتایج در اطراف میانگین نشانگر دقت نامناسب اندازه گیری است که نیاز به اصلاح دارد.

#### Quality assurance in Hematology WHO/ LAB/1998

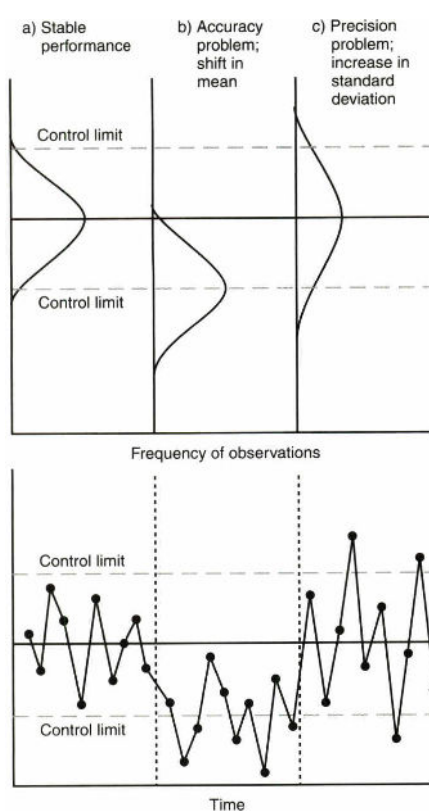
- |   |   |
|---|---|
| هشدار                                     | • یک خوانده خارج از محدوده $\text{mean} \pm 2 \text{ SD}$           |
| غیر قابل قبول ( خطای سیستماتیک یا راندوم) | • یک خوانده خارج از محدوده $\text{mean} \pm 3 \text{ SD}$           |
| غیر قابل قبول ( خطای سیستماتیک)           | • دو خوانده پیاپی خارج از محدوده $\text{mean} \pm 2 \text{ SD}$     |
| غیر قابل قبول ( خطای سیستماتیک)           | • ۴ خوانده متوالی خارج از محدوده $+1 \text{ SD}$ یا $-1 \text{ SD}$ |
| هشدار ( خطای سیستماتیک)                   | • ۶ خوانده متوالی یک طرف میانگین                                    |

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

نکته: بطور معمول چارتهای کنترلی هر ماه بازبینی و تمام مقادیر معتبر برای محاسبه میانگین و انحراف معیار ماه بعد لحاظ می شود.

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 قبلاً گفته شد در شرایط معمول، با تکرار آزمایش، انتظار می‌رود نتایج در دو طرف میانگین پخش شده و پراکندگی مناسب داشته باشند (منحنی سمت چپ a).

اگر نتایج بطور ثابت بیشتر یا کمتر از میانگین، قرائت شوند (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 یابد، خطای راندوم یا تصادفی اتفاق افتاده است. این خطا با افزایش یافتن انحراف معیار مشخص شده و منحنی بجای شکل زنگوله‌ای، نمای پهنی پیدا می‌کند (منحنی سمت راست c).

خطاهای ذکر شده در طول زمان، روی نمودار زیرین نیز 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 می گیرد. 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 از عوامل ایجاد خطا به تفکیک نوع خطا ، ذیلا آمده است:

### خطای راندوم

- دمای ناپایدار
- نوسانات جریان الکتریکی دستگاه قرائت کننده
- وجود حباب هوا در زمان انتقال نمونه یا معرف
- عدم رعایت حجم برداشتی از نمونه یا معرف
- عدم رعایت زمان انکوباسیون
- ناپایداری معرف
- عدم رعایت شرایط نگهداری نمونه
- آلودگی ظروف شیشه ای مورد استفاده ، نوک سمپلر و ...
- آلودگی نمونه کنترلی ، معرف و ...
- اشکال در سیستم قرائت کننده
- ...

### خطای سیستماتیک

- اشکال در کالیبراسیون مانند در نظر گرفتن ارزش نادرست برای کالیبراتور، تهیه نامناسب، آلودگی، افت، تغلیظ، تغییر شماره ساخت و ...
  - عوض کردن معرف بدون تغییر در کالیبراسیون
  - تخریب تدریجی معرف
  - عدم رعایت دستورالعمل سازنده برای تهیه معرف
  - تغییر در دمای انکوباسیون
  - خطای ثابت در وسایل انتقال دهنده نمونه یا معرف مانند سمپلر
  - ...
- 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 و به 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 و انحراف 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 ۶۷ 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  $\pm 1SD$  mean در نظر گرفته می شود.
  - $h_L$  و  $h_U$  که محدوده کنترل است و اغلب  $\pm 2.7SD$  برای آن در نظر گرفته می شود.
- ۴- در هر سری کاری یک نمونه کنترل آزمایش و نتیجه آن را با محدوده  $\pm 1SD$  مقایسه کنید مادامیکه نتیجه در این محدوده قرار داشت Cusum را اجرا نکنید. در این مرحله علامتگذاری چارت انجام نمی شود.

۵- به محض اینکه کنترل از محدوده  $\pm 1SD$  mean 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 می آید. عدد بدست آمده ، روی منحنی علامتگذاری می شود.

- 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  $(\pm 2.7SD)$   $h_L$  و  $h_U$  فراتر رود که در این حالت شرایط از کنترل خارج شده است. لذا Cusum تا زمان شناسایی عوامل ایجاد خطا قطع می گردد.
- مثال:

آزمایشگاهی تری گلیسرید را در نمونه کنترلی اندازه گیری نموده و میانگین ۱۰۰ و انحراف معیار ۵ بدست آورده و مطابق موارد ذکر شده دریند ۳ محدوده های کاری خود را محاسبه

$K_L$	mean - 1SD	$100 - 5 = 95$	نموده است.
$K_U$	mean+1SD	$100 + 5 = 105$	
$h_L$	-2.7SD	$-2.7 \times 5 = - 13.5$	
$h_U$	+2.7SD	$+2.7 \times 5 = + 13.5$	

سپس در هر سری کاری، نمونه کنترل را آزمایش ونتایج را در جدول ۲-۲ درج نموده است. اختلاف هر روز با  $K_L$  یا  $K_U$  بصورت  $d_i$  و جمع جبری بصورت  $CS_i$  نمایش داده شده است.

جدول ۲-۲

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	

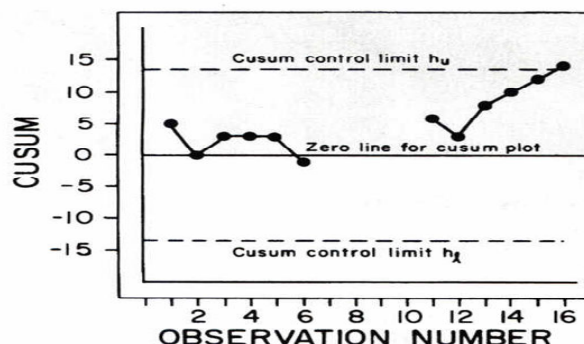
همانطور که مشاهده می شود در روز اول، نتیجه کنترل ۱۱۰ قرائت شده که ۵ واحد بیش از  $K_U$  (۱۰۵) بوده است لذا Cusum شروع شده و اختلاف  $d_i$  بصورت +۵ نمایش داده شده است. روز دوم کنترل ۱۰۰ خوانده شده که ۵ واحد کمتر از  $K_U$  (۱۰۵) می باشد پس مقدار  $d_i$  برابر -۵ بوده که با +۵ جمع جبری (دو عدد داخل بیضی) و  $CS_i$  صفر بدست می آید. هنوز علامت  $CS_i$  عوض نشده پس Cusum ادامه می یابد.

Cusum در دو حالت متوقف می گردد :

- وقتی علامت  $CS_i$  تغییر یابد. در روز ششم مثال فوق، علامت  $CS_i$  از مثبت به منفی تغییر یافته که نشان می دهد شرایط تحت کنترل در آمده است.

## ۶۷ کنترل کیفیت در آزمایشهای بیوشیمی و سایر آزمایشهای کمی

- وقتی مقدار  $Csi$  از حد  $h_l$  یا  $h_u$  خارج شود. مثال این مورد روز شانزدهم است که در آن  $Csi$  به ۱۴ 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 نیز نمایش داده شده است.



Cusum نسبت به چارت کنترلی Levey - Jenning حساسیت بیشتری نسبت به خطای سیستماتیک دارد. این برتری در مورد قوانین چندگانه و ستگارد، صادق نمی‌باشد زیرا قوانین مختلف و ستگارد 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 بعضاً موفق به یافتن خطاهایی می‌شوند 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 می‌گیرند.

#### ۱- نتایج هر بیمار بطور انفرادی

نتیجه آزمایش هر بیمار محصول نهایی عملکرد آزمایشگاه است ولی متأسفانه بررسی نتیجه تک تک بیماران شاخص حساسی برای شناسایی خطاها نمی‌باشد. برای بررسی نتایج هر بیمار از روشهای زیر استفاده می‌شود.

### هماهنگی با علائم بالینی

مقایسه نتایج آزمایشگاهی با علائم بالینی بیمار در آزمایشگاههایی که تعداد زیادی از بیماران را پذیرش می کنند ، تقریباً غیر ممکن است .ضمن اینکه افراد مختلف در زمان ابتلا به بیماری واحد ، نتایج آزمایشگاهی یکسانی نداشته و الزاماً 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 می نماید.

از آنجائیکه 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 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 می توان 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 دابل 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

اگر نتایج جدید هر بیمار با نتایج قبلی مقایسه شود، برخی خطاها مانند جابجایی نمونه یا جواب، شناسایی می گردد. 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 جدول ۲-۳ آمده است.

جدول ۲-۳

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 محدوده ای 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 جدول ۲-۴ آمده است.

جدول ۴-۲

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 می باشد 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 دموغرافیک، بیولوژیک، پاتولوژیک و پرنالیتیک قرار دارد. این مسئله باعث می شود 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 می شود که خود حاصل تقسیم انحراف معیار نتایج یک گروه بیمار بر مجذور تعداد آنان می باشد. عبارتی 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 پرنالیتیک مانند مدت بسته بودن تورنیکه و نحوه نگهداری نمونه می باشد و با تغییر هر یک از این موارد، دستخوش تغییر می شود. از آنجائیکه هیچیک از این پارامترها در برنامه های معمول QC با



## کنترل کیفیت در آزمایشهای بیوشیمی و سایر آزمایشهای کمی \_\_\_\_\_ ۷۱

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 (AON) average of normal یا mean of normal است و همانطور که از نام آن مشخص می‌باشد، 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.

الگوریتم Bulls که امروزه بطور گسترده‌ای برای پایش دستگاههای سل کانتر 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 تشخیص نهایی

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.

## **فصل سوم :**

**نکاتی در مورد کنترل کیفیت در آزمایشگاه خونشناسی**

### مقدمه ای بر اصول 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 نمونه‌ها، تجهیزات بکار رفته، تنوع آزمایشها و... می‌بایست 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 بر روی تعدادی از نمونه های بیماران ( معمولاً ۳-۴ نمونه در هر سری کاری)
- انجام آزمایش بازبینی (Check Test) بر روی تعدادی از نمونه های بیماران ( آزمایش ۳-۴ نمونه از سری کاری قبلی )

## ۷۶ \_\_\_\_\_ کنترل کیفیت در آزمایشگاههای پزشکی

- 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 (شستشویهای 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 و شرح آموزش توسط شرکت پشتیبان می‌بایست بصورت مستند موجود باشد .
- در صورت تعویض کاربر دستگاه ، می‌بایست 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 شستشویهای لازم ، تعمیر ، سرویس و یا تعویض محلولها می‌بایست ثبت و نگهداری 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 می‌بایست 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 ، و یا 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 نمود . ( 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 میزان 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 تجارتي وجود دارد که مقادیر هدف یا مورد نظر در آنها با روشهای مرجع کالیبر شده‌اند . این سوسپانسیون سلولهای خونی در صورت 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 .

در صورت عدم دسترسی به کالیبراتورهای تجارتي یا وجود هرگونه شکي نسبت به اعتبار آن استفاده از خون کامل جهت کالیبراسیون ضروري 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 بار نیز با سل کانتر اندازه گیری شده و پس از محاسبه میانگین هر پارامتر با روش دستی و دستگاهی، با استفاده از فرمول زیر فاکتور کالیبراسیون تعیین می گردد. برای افزایش دقت این امر می توان از تعداد نمونه های بیشتری استفاده نمود.

میانگین روش دستگاهی \_ میانگین روش دستی

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

لازم به ذکر است روشهای مرجع برای اندازه گیری هموگلوبین ، هماتوکريت و شمارش گلبولهای سفید به ترتیب سیان مت هموگلوبین ، میکروهماتوکريت و استفاده از هماسیتومتر ( با درجه بندی نئوبار اصلاح شده ) می باشند . 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 هماسیتومتر برای شمارش سلولهای خونی استفاده می شود ولی بعلت خطای زیاد در شمارش گلبولهای قرمز و پلاکتها با این روش ، بهتر است کالیبراسیون این دو پارامتر توسط شرکت پشتیبان صورت گیرد.

مثال: اگر میانگین اندازه گیری هموگلوبین به روش دستی ۱۴۰ گرم در لیتر و با 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 می بایست ۳/۴۴٪ کاهش یافته و روی ۹۶/۵۶ تنظیم گردد.

## ۸۰ ————— کنترل کیفیت در آزمایشگاههای پزشکی

در بعضی از انواع سل کانتورها مثل گروه سیستمکس ضریب کالیبراسیون جدید با استفاده از فرمول کالیبراسیون مندرج در کاتالوگ ، مستقیماً به ترتیب زیر محاسبه می شود:

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

### کنترل کیفیت

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

### تفسیر نمودار کنترل (توصیه سازمان جهانی بهداشت) WHO/ LAB/1998

(1) One control value outside the mean  $\pm 2SD$

Warning

(2) One control value outside the mean  $\pm 3SD$

Reject:SE or RE

(3) 2 consecutive controls exceed mean  $\pm 2SD$

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 یا جهت کامل شدن روند کنترل کیفیت سل کانترومی توان از نمونه های خون بیماران استفاده نمود . باتوجه به پایداری پارامترهایی نظیر RBC،WBC، HCT،Hb و اندکس های خونی در نمونه خون به مدت ۲۴ ساعت دردمای ۴ درجه سانتیگراد، میتوان در روز اول حداقل ۵ و ترجیحاً ۱۰ نمونه که دارای مقادیر طبیعی می باشند را پس از آنالیز



دریخچال نگهداری نموده و در روز بعد مجدداً مورد آزمایش قرار داد و وجود اختلاف معنی دار 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 نمونه از ۲/۷۸ و برای ۱۰ نمونه از ۲/۲۶ بیشتر باشد ، با اطمینان ۹۵٪ می توان گفت که بین مقادیر شمارش شده در دو روز ، اختلاف معنی دار وجود دارد . وجود اختلاف معنی دار برای یک متغیر بیانگر اشکال احتمالی بوده که در صورت تداوم آن جهت رفع اشکال می بایست اقدام مناسب صورت گیرد.

جدول ۳-۱ مثال: در صورتیکه نتایج حاصل از اندازه گیری هموگلوبین ۵ نمونه خون با استفاده از یک دستگاه سل کانتر در دو روز متوالی مطابق جدول زیر باشد، عملکرد دستگاه با کمک فرمول T-Brittin به صورت زیر بررسی می گردد:

جدول ۳-۱

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

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

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

## ۸۲ کنترل کیفیت در آزمایشگاههای پزشکی

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

۳- بررسی عدم دقت (CV) دستگاه بدو صورت انجام می شود. در صورت استفاده از خون کنترل ، می توان با استفاده از نتایج حاصله از نمونه کنترل که طی روزهای متوالی با دستگاه آزمایش شده ، CV هر پارامتر را محاسبه نمود و در صورت عدم دسترسی به خون کنترل ، می بایست از نمونه های روزانه برای اینکار استفاده کرد بدین ترتیب که هر ماه دو یا بیشتر نمونه را حداقل ده بار با سل کانتر مورد آزمایش قرار داده و از نتایج بدست آمده CV هر 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. بررسی عدم دقت دستگاه خصوصاً هنگام نصب و راه اندازی با استفاده از نمونه های طبیعی و غیرطبیعی الزامی می باشد.

جدول ۳-۲ مثال : اگر نتایج 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 ۳-۲

WBC $\times 10^9/L$	$(x - \bar{x})$	$(x - \bar{x})^2$	$SD = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$ $SD = \sqrt{0.201 / 9} = 0.148$ $CV\% = \frac{SD \times 100}{\bar{x}}$ $0.148 / 7.63 \times 100 = 1.9\%$
7.6	-0.03	0.0009	
7.5	-0.13	0.017	
7.8	0.17	0.029	
7.6	-0.03	0.0009	
7.5	-0.13	0.017	
7.9	0.27	0.073	
7.5	-0.13	0.017	
7.6	-0.03	0.0009	
7.5	-0.13	0.017	
7.8	0.17	0.029	
$\Sigma x = 76.3$ $\bar{x} = 7.63$		$\Sigma (x - \bar{x}) = 0.201$	

۴- در صورت عدم امکان انجام تمامی آزمایشها بصورت دوتایی (Duplicate) می بایست در هر سری کاری حداقل ۲-۳ 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 خواننده 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 <sup>2</sup>
۱۲۰	۱۲۲	۲	۴
۱۶۱	۱۶۳	۲	۴
۱۱۰	۱۰۰	۱۰	۱۰۰
۱۴۰	۱۴۰	۰	۰
۱۳۴	۱۳۲	۲	۴
			۱۱۲

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

تفاوت بیشتر از 2SD بین دو نتیجه آزمایش در نمونه سوم ، نمایانگر بروز خطای تصادفی و لزوم تکرار آزمایش بر روی 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 صبح حداقل ۲-۳ نمونه پس از آزمایش با درب بسته در یخچال نگهداری شده و در انتهای سری کاری و یا بعداز ظهر مجدداً مورد آزمایش قرار گرفته و نتایج حاصل از این دو آزمایش با استفاده از فرمول Duplicate test مورد بررسی قرار گرفته که اختلاف نتایج

در محدوده  $2SD$  قابل قبول می باشد. اگر نمونه ها درست نگهداری شده باشند هرگونه تغییری در نتایج خارج از این محدوده نشاندهنده اشکال در عملکرد دستگاه و یا معرفها 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 های بازبینی و مورد استفاده قرار می گیرند، یکسان باشند. ۶- در مراکز آزمایشگاهی با پذیرش بیمار زیاد (حداقل روزی ۱۰۰ بیمار)، بدلیل ثابت بودن مقادیر میانگین شاخصهای گلبولی ( $MCHC$ ,  $MCH$ ,  $MCV$ ) در فواصل روزها و هفته ها، می توان از این شخصها جهت ارزیابی کیفیت عملکرد دستگاه استفاده نمود. در صورتیکه نمونه های مورد آزمایش در روزهای مختلف از نظر میزان اندکسهای خونی تفاوت مشخصی با یکدیگر نداشته باشند که منجر به تأثیر بارز بر روی میانگین ها گردد هر گونه تغییر مشخص در میانگین اندکسها نشاندهنده تغییر در کالیبراسیون یا اختلال عملکرد دستگاه می باشد. در این روش، میانگین و  $\pm 2SD$  اندکسهای  $MCHC$ ,  $MCH$ ,  $MCV$  حداقل ۳۰۰-۵۰۰ بیمار توسط سل کانتر محاسبه شده و نمودار رسم می گردد. سپس روزانه نمونه های بیماران را به گروه های ۲۰ تایی تقسیم نموده و روزانه با ثبت نتایج میانگین اندکسهای هر ۲۰ نمونه بر روی نمودار، هر گونه انحراف از مقادیر مجاز به سهولت شناسایی شده که می تواند نمایانگر عملکرد نامناسب دستگاه باشد. لازم به ذکر می باشد جهت اطمینان از قابل قبول بودن این روش، در انتخاب نمونه های ۲۰ تایی، باید این نکته را به خاطر داشت که نمونه ها بصورت اتفاقی انتخاب شده باشند و در هر دسته نیز بیش از ۷ نمونه دارای شرایط کلینیکی یکسان نباشند. این روش در حال حاضر بصورت برنامه نرم افزاری بر روی بسیاری از سل کانترها نصب می باشد.

۷- مقایسه مقادیر بدست آمده از یک نمونه با نتایج قبلی نمونه همان فرد (Delta check) به شرط در نظر داشتن نکاتی نظیر تغییرات فیزیولوژیک و روزانه پارامترهای خونی، تحت درمان قرار گرفتن فرد به هر دلیل و تغییرات بالینی که باعث تغییر شمارش 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. لازم به ذکر است استفاده از این روش در صورتیکه فاصله بین دو آزمایش بیش از ۲-۳ هفته باشد، توصیه نمی گردد.

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 سلولهای که در لام خون محیطی شمارش شده، مقایسه می گردد. در جدول زیر ارتباط میانگین تعداد سلولهای شمارش شده در گسترش خون محیطی با تعداد تخمینی سلولها نشان داده شده است. بعنوان مثال اگر در گسترش خون محیطی با عدسی شیئی (×۴۰) ۳-۶ گلبول سفید دیده شود ، تعداد گلبولهای سفید بین ۷-۱۰ هزار خواهد بود.

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

تعداد تخمینی پلاکتها (×۱۰ <sup>۹</sup> )	میانگین تعداد پلاکتهای شمارش شده در هر میدان دید بزرگنمایی زیاد (دید روغن ×۱۰۰)	تعداد تخمینی گلبولهای سفید (×۱۰ <sup>۹</sup> /L)	میانگین تعداد گلبولهای سفید شمارش شده در هر میدان دید با بزرگنمایی زیاد (×۴۰)
۵۰-۱۰۰	۲-۳	۳-۷	۲-۳
۱۰۰-۱۵۰	۴-۶	۷-۱۰	۴-۶
۱۵۰-۲۵۰	۷-۱	۱۰-۱۳	۷-۱
۲۵۰-۵۰۰	۱۱-۲۰	۱۳-۱۸	۱۱-۲۰

### دستگاه میکروهماتوکریت

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 ۱۵-۱۰ هزار g در محیط بمدت حداقل ۵ دقیقه بدون افزایش دما از ۴۵°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 (دور دقیقه) و زمان سنج دستگاه بترتیب با تاکومتر کالیبره و کروномتر

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 می گردد. نمونه ها به مدت دو دقیقه سانتریفوژ شده و مقادیر آنها ثبت میشود، سپس هر 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. جدول ۳-۴ نمایانگر ارزیابی دستگاه میکروهماتوکریت جهت بررسی حداکثر توان تجمع سلولی می باشد.

جدول ۳-۴

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  $0.5/5$ ،  $3/5$  دقیقه و برای نمونه ای با مقدار هماتوکریت بیشتر از  $0.5/5$ ،  $4/5$  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  $0.5/5$  و حاوی ضدانعقاد K2 EDTA ( $1/5$  میلی 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  $0.5/5$  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  $2/5$  سانتی‌متر نشان‌دهنده صحت قرائت توسط ابزار قرائت هماتوکریت مورد استفاده می‌باشد.

### کنترل کیفیت آزمایشهای انعقادی

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

نمونه کنترلی باید حتی‌الامکان 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- درجه سانتی‌گراد 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  $\text{mean} \pm 2\text{SD}$  می‌باشد. در هر سری کاری می‌بایست 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 خصوصاً با روش دستی می‌بایست بصورت دوتایی انجام شوند. میزان تفاوت دونتیجه حاصله معیاری برای قابل قبول بودن نتایج است. برای این امر میانگین نتایج آزمایشهای دوتایی 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 می‌باشد. جدول ۳-۵ میزان حداکثر تفاوت قابل قبول بین نتایج آزمایشهای دوتایی بر روی یک نمونه را بر حسب نتیجه آزمایش نشان می‌دهد.

جدول ۳-۵

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 چهارم :**

**نکات مهم در 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 و معرفها، ابزار و دستگاهها (لوپ، فور، اتوکلاو و انکوباتور).

نظر به اینکه هدف نهایی کلیه فعالیت های آزمایشگاه میکروب شناسی انتخاب مناسبترین آنتی بیوتیک جهت درمان بیمار مبتلا به عفونت میباشد، بعد از مبحث شیوه نگهداری و استفاده از سویه های باکتریایی که برای کنترل کیفیت کلیه مواد در آزمایشگاه میکروب شناسی مورد نیاز هستند در ابتدا نحوه کنترل کیفیت محیط های کشت و سپس طرز تهیه کدورت ۰/۵ مک فارلند برای استاندارد سازی 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.

### **نگهداری و استفاده از سویه های باکتریایی**

برای نگهداری سویه های باکتریایی می توان از روشهای طولانی مدت و کوتاه مدت استفاده نمود.

#### **نگهداری طولانی مدت**

نگهداری طولانی مدت باکتریها این امکان را می دهد که کلیه سویه های میکروبی اعم از هوازی (بارشد سریع و یا سخت رشد) و نیز بی هوازی، ماهها و حتی سالها به صورت زنده نگهداری شوند. بهترین روشهای نگهداری طولانی مدت شامل لیوفیلیزاسیون (Freeze drying) و نگهداری در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد یا پایین تر (در دیپ فریز یا در نیتروژن مایع) می باشد.

### ۱- نگهداری در دیپ فریز (۵۰- تا ۷۰- درجه سانتی گراد یا پایینتر) و یا 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 ۱۸-۲۴ ساعت در دمای  $35 \pm 2$  درجه سانتی گراد و در صورت نیاز تحت شرایط  $CO_2$  برای هر باکتری انکوبه نمائید.

بعد از انکوباسیون، خالص بودن و مورفولوژی کلنی ها را بررسی نموده و در صورت نیاز، تستهای بیوشیمیایی آنرا انجام دهید. سپس از باکتری رشد یافته ، سوسپانسیون غلیظی در ۵۰-۱۰۰ میلی لیتر از یک محیط محافظت کننده از سرما ( Cryoprotective ) تهیه نمائید. این محیط برای جلوگیری از تخریب سلولهای باکتری در شرایط انجماد مورد استفاده قرار می گیرد. محیط محافظت کننده از سرما می تواند 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 حجم ۱-۰/۵ mL در ویالهای شیشه‌ای یا پلاستیکی کوچک استریل توزیع کنید . ویال های ذخیره خود را به مقدار مصرف یکسال، آماده نمائید.

ویالهای حاوی سویه ها را می توان در برودت ۵۰- تا ۷۰- درجه سانتی گراد به مدت یکسال نگهداری نمود. در صورت عدم دسترسی به فریزر ۷۰- درجه می توان سویه های با رشد سریع را در فریزر ۲۰- درجه نیز نگهداری نمود. در این شرایط توجه به نکات زیر ضروری است:

- سویه های سخت رشد مانند هموفیلوس انفلوآنزا و نیسریا گنوره در این دما قابل نگهداری نمی باشند و باید در فریزر ۷۰- درجه نگهداری شوند.

- سویه های بارشد سریع در این دما عمر کوتاه تری دارند. بنابراین توصیه می شود برای اطمینان از حیات سویه ها، هر چند ماه یکبار ، طبق روش زیر کشت داده شوند:

یک ویال از فریزر بیرون آورده و آنرا سریعاً زیر آب جاری ولرم، ذوب نمائید. سوسپانسیون ذوب شده را روی محیط آگار خوندار یا شکلاته ( در مورد باکتریهای سخت رشد ) تلقیح کرده و به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در دمای  $35 \pm 2$  درجه و در صورت نیاز در شرایط  $CO_2$  انکوبه نمائید. این باکتری برای تهیه کنترل کاری working control بکار می 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 مجدداً فریز نگردد.

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

از کشت ذخیره تا ۳ پاساژ پشت سر هم می توان 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 سویه ها را افزایش می دهد.

برای تهیه working control ، از کشت ذخیره فریز شده ، روی پلیت یا آگار شیبدار تلقیح و آنرا به مدت یک شبانه روز تا زمانی که رشد مناسبی بدست آید، انکوبه نمائید. در مورد ارگانیسمهای با رشد سریع، این پلیت یا آگار شیبدار را می توان در ۸-۲ درجه سانتیگراد یا در دمای اتاق تا مدت ۴ هفته نگهداری نمود. بعد از هر پاساژ، خالص بودن و مورفولوژی کلنی ها 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 مشکل پسند مانند گونوکک ، مننگوکک ، استرپتوکوکوس پنومونیه و هموفیلوس آنفلوانزا ، محیط شکلات آگار را پس از خروج محیط BHIA از اتوکلاو و رسیدن به دمای ۵۰ درجه سانتی گراد با افزودن ۵٪ خون گوسفند و سپس قرار دادن آن در بن ماری ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه تهیه نمائید.

۲- روغن معدنی ( یا پارافین مایع ) را در حرارت خشک ( ۱۷۰ درجه سانتی گراد 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 ۱ cc روی سطح محیط بریزید.

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

۶- بعد از ۱۲-۶ ماه تجدید کشت نمایید.

**۳- کشت عمقی و نگهداری در دمای اتاق :**

این روش فقط برای باکتریهایی که مشکل پسند نیستند مانند استافیلوکوکها و خانواده انتروباکتریاسه بکار می‌رود.

- ۱- یک محیط کشت آگار بدون کربوهیدرات مانند TSA را با عمق زیاد در لوله تهیه نمایید.
- ۲- باکتری را بصورت کشت عمقی در این محیط تلقیح نمایید.
- ۳- این محیط را ۲۴ ساعت در 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 کاملاً در لوله را بپوشاند.
- ۶- کشتها را در حرارت اتاق نگهداری نمائید.
- ۷- هر ساله سوش موردنظر را تجدید کشت نمائید.

**۴- کشت عمقی در محیط سیستمین تریپتیکس آگار (CTA) برای نیسریا و****استرپتوکوک :**

- ۱- محیط CTA را در لوله تهیه نمایید .
- ۲- باکتری را به طور عمقی در این محیط کشت دهید.
- ۳- محیط را بمدت ۲۴ ساعت در 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 کاملاً در لوله را بپوشاند.
- ۶- برای نیسریا لوله را در ۳۵ درجه نگهداری و هر دو هفته کشت را تجدید نمائید . برای استرپتوکوک 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 ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.
- ۳- در لوله را با چوب‌پنبه یا در پیچ ببندید.
- ۴- کشتها را در حرارت اتاق نگهداری نمائید.
- ۵- هر دو 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 در پیچ‌دار کشت دهید.
- ۲- محیط را بمدت ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.
- ۳- پس از رشد کامل، لوله را در یخچال نگهداری کنید.
- ۴- هر ماه کشت را تجدید نمائید.

#### ▪ استرپتوکوکها

- ۱- سوش مورد نظر را در سطح آگار خوندار شیب‌دار (لوله‌ای در پیچ‌دار) کشت دهید.
- ۲- محیط را بمدت ۲۴ ساعت در 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 ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.
- ۳- پس از رشد کامل، لوله را در حرارت اتاق نگهداری کنید.
- ۴- هر ۲ 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 ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.
- ۳- نمونه را در دمای ۳۵ درجه نگهداری نمایید.
- ۴- هر ۲ روز یکبار کشت را تجدید نمائید.

## کنترل کیفیت محیط های کشت

### مقدمه

محیط های کشت نقش اساسی را در آزمایشگاه میکروب شناسی ایفا می کنند و بطور گسترده ای جهت جداسازی، تعیین هویت و آنتی بیوگرام میکروارگانیسم های بیمارزا بکار میروند. بسیاری از آزمایشگاهها بطور روتین محیط های کشت مورد نیاز برای مصارف تشخیصی و تحقیقاتی را خودشان تهیه می نمایند. با این همه جهت اطمینان از اینکه محیط های کشت، کیفیت خوب و نتایج مطلوبی داشته باشند بایستی روشهای کنترل کیفی مناسبی بکار گرفته شود. برای رسیدن به این هدف بایستی در تهیه و مصرف محیط های کشت معیارهای زیر را در نظر گرفت.

### مواد خام

کیفیت محیط ها بطور مستقیم بستگی به کیفیت مواد خام مورد استفاده در تهیه آنها دارد. آب یکی از مهمترین مواردی است که در تهیه محیط های کشت بکار می رود. سه معیار مهم آب مورد استفاده در تهیه محیط های کشت شامل وجود یونهای مس، قدرت هدایت الکتریکی و pH می باشد. در شرایط ایده آل نباید یون مس، در آب مورد استفاده جهت تهیه محیط های کشت وجود داشته باشد چون خاصیت مهار کنندگی برای میکروارگانیسم ها را دارد. قدرت هدایت الکتریکی آن باید کمتر از ۱۵ میکروزیمنس بوده، pH آب مورد استفاده بهتر است کمی اسیدی باشد ولی در هر حال نباید کمتر از ۵/۵ باشد.

### پتری دیش

کیفیت پتری دیش های مورد استفاده در تهیه محیط نیز اهمیت دارد. معمولا پتری دیش ها را با اتیلن اکساید و یا اشعه گاما استریل می کنند. در صورت استفاده از پتری دیش هایی که با اتیلن اکساید استریل شده باشند بایستی به روش کروماتوگرافی وجود یا عدم وجود بقایای این ماده بررسی شود. اتیلن اکساید دارای خاصیت مهار کنندگی برای میکروارگانیسم ها میباشد. در صورت استفاده از پتری دیش های شیشه ای بایستی از پتری دیش هایی از جنس بوروسیلیکات استفاده کرد. استفاده از پتری دیش هایی از جنس قلیائی ممکن است موجب آزاد سازی قلیا در داخل محیط کشت گردد.

### استریل کردن محیط های کشت

استریل کردن، یک مرحله اساسی در تهیه محیط های کشت است. معمولاً برای استریل کردن محیط های کشت از اتوکلاو استفاده می کنند. با این همه ارتباط نزدیکی بین مدت زمان لازم جهت استریل کردن و حجم محیط وجود دارد. حرارت بیش از حد ممکن است منجر به تخریب محیط های کشت گردد. بنابراین تنظیم دما و مدت زمان آن اهمیت ویژه ای دارد. در شرایط معمولی دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه برای استریل کردن یک لیتر محیط کشت کافی است. در صورتیکه حجم محیط کشت بیش از یک لیتر باشد ممکن است مدت زمان بیشتری لازم باشد. کنترل کیفی اتوکلاو، کنترل دما و فشار اتوکلاو بایستی بطور مداوم انجام گیرد. برای کنترل اتوکلاو از اندیکاتورهای شیمیائی استفاده می کنند. از اندیکاتورهای بیولوژیک که جهت کنترل کارآرائی اتوکلاو استفاده می کنند اسپور *Bacillus stearothermophilus* را می توان نام برد که بصورت تجاری قابل دسترس می باشد.

### پارامتر های فیزیکی

محیط کشت های تهیه شده باید از لحاظ فیزیکی و ظاهری بررسی شوند. معیارهای ظاهری قابل بررسی شامل وجود حباب، حفره، ناصافی سطح محیط، ترک خوردگی، یخ زدگی می باشد. ضخامت محیط نیز اهمیت دارد. ضخامت محیط های کشت پلیتی ۴ میلی متر است. pH نیز از مهمترین معیارهای فیزیکی می باشد که باید قبل از اتوکلاو کردن و پس از آن با pH متر کالیبره شده اندازه گیری گردد.

### نگهداری محیط های کشت تهیه شده

طول عمر محیط های کشت تهیه شده بستگی به نوع اجزا تشکیل دهنده محیط، نحوه نگهداری و انبار کردن آنها دارد. تمامی محیط های کشت باید دور از نور نگهداری شوند. تابش نور به محیط های کشت موجب تشکیل مواد باکتریواستاتیک و باکتریساید مانند پراکسیداز می گردد. اغلب محیط های کشت که در پلیت تهیه می شوند در دمای ۴ درجه سانتیگراد حداقل طول عمر آنها یک هفته می باشد ولی اگر در داخل کیسه های پلاستیکی بسته بندی شوند بطوریکه هوا داخل آنها نفوذ نکند تا ۳-۴ هفته قابل مصرف هستند. طول عمر محیط های کشت حاوی آنتی بیوتیک بستگی به پایداری آنتی بیوتیک موجود در آن دارد. در



مجموع محیطهای حاوی آنتی بیوتیک را در عرض یک هفته باید مصرف کرد. از سوی دیگر با گذشت زمان اینگونه محیط های کشت رطوبت خود را از دست داده، بدلیل افزایش غلظت آنتی بیوتیک قدرت انتخابی آنها افزایش می یابد. دمای پلیت ها را باید قبل از مصرف به دمای اتاق رساند. اگر پلیت محیط کشت بیش از ۸ ساعت در دمای اتاق باقی بماند برای مصرف مناسب نمی باشد. محیط های کشت تهیه شده در لوله در مقایسه با محیط های کشت پلیتی عمر طولانی تری دارند. اغلب این محیط های کشت اگر در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شوند ۳-۶ ماه قابل مصرف می باشند.

جدول شماره ۱-۴: علل اشکالات رایج در محیط های کشت

اشکال	علت
نرم بودن آگار	حرارت بیش از حد، pH پائین که موجب هیدرولیز آگار می گردد. توزین غلط، مخلوط نکردن خوب و عدم حل شدن
pH نامناسب	استفاده از شیشه های قلیائی، آب ناخالص، حرارت بیش از حد، آلودگی شیمیائی، اندازه گیری pH در حرارت نامناسب، استفاده از pH متر استاندارد نشده و استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده
رنگ نامناسب	ناخالص بودن آب، استفاده از شیشه آلات کثیف، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده، حرارت دادن بیش از حد و pH نامناسب
تیره شدن محیط	حرارت دادن بیش از حد، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده
سمیت	حرارت دادن بیش از حد (سوزاندن محیط)، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده، توزین غلط و عدم به هم زدن کافی محیط و حرارت بیش از حد.
رشد ضعیف میکرو ارگانیسم	استفاده از آب و یا شیشه آلات آلوده، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده، توزین غلط و عدم به هم زدن کافی محیط و حرارت بیش از حد.
داشتن خاصیت ضعیف انتخابی و یا افتراقی	استفاده از آب و یا شیشه آلات آلوده، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده، توزین غلط و عدم به هم زدن کافی محیط و حرارت بیش از حد.

### کنترل کیفی محیط های کشت

برای کنترل کیفی محیط های کشت از سویه های کنترل کیفی استفاده می کنند. سویه های کنترل کیفی از منابع مختلف مانند American Type Culture Collection (ATCC) قابل تهیه می باشند<sup>۱</sup>.

### روش انجام آزمون کنترل کیفیت میکروبیولوژیکی محیط های کشت

یک کشت از ارگانیزم کنترل را روی پلیت تهیه کنید. بعد از انکوباسیون ۵-۳ کلنی ایزوله را در مقدار کمی TSB و BHI استریل سوسپانسیون کرده و آن را برای چهار یا پنج ساعت انکوبه نمائید. کدورت را با استاندارد نیم مک فارلند تنظیم کنید (استاندارد نیم مک فارلند در طول موج ۶۲۵nm دارای جذب ۰/۰۸ تا ۰/۱۳ می باشد). به این روش می توان یک سوسپانسیون در سرم فیزیولوژی از کلنی های ۲۴ ساعته تهیه و کدورت آن را مطابق روش فوق تنظیم نمود.

برای آزمایش ظرفیت مغذی بودن (Nutritional activity) یک محیط کشت پلیتی، سوسپانسیون اولیه را به نسبت ۱ به ۱۰۰ در نرمال سالین رقیق نموده و به هر پلیت ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون رقیق شده را تلقیح می نمائیم. تعداد کلنی های مورد انتظار در هر پلیت  $10^4 \times 1-2$  عدد می باشد. اگر برای محیط های خاصی کلنی های ایزوله بدست نیاید سوسپانسیون باید ده بار رقیق تر تهیه شود.

برای آزمایش ظرفیت مهارکنندگی (Inhibitory activity) محیط های کشت انتخابی، سوسپانسیون اولیه را به نسبت ۱ به ۱۰ در نرمال سالین یا آب تخلیص شده رقیق نموده و در هر پلیت ۱۰ میکرولیتر یا ۰/۰۱ میلی لیتر سوسپانسیون رقیق شده تلقیح می کنیم. تعداد کلنی های مورد انتظار در هر پلیت  $10^5 \times 1-2$  می باشد. جهت اجتناب از رشد زیاد باکتری در بعضی از محیط های کشت انتخابی ممکن است نیاز باشد که سوسپانسیون ده بار رقیق تر شود. برای آزمایش محیط های کشت لوله ای، هر لوله باید با ۱۰ میکرولیتر یا ۰/۰۱ میلی لیتر از

۱- در حال حاضر باکتری های فوق را می توان از مرکز کلکسیون قارچها و باکتری های صنعتی ایران تهیه نمود .

<http://www.iroost.org/persian/ptcc>

<http://ptcc.iroost.org>

## ۱۰۰ ————— کنترل کیفیت در آزمایشگاههای پزشکی

سوسپانسیون اولیه مطابق با نیم مک فارلند تلقیح شود. گاهی ممکن است به تلقیح کمتر یا بیشتر نیاز باشد.

محیط کشت مورد کنترل کیفی را بعد از تلقیح تحت شرایطی که در جدول ۲-۴ آمده است انکوبه نمائید. به طور نرمال مدت زمان انکوباسیون ۲۴-۱۸ ساعت یا ۴۸-۲۴ ساعت در  $35 \pm 2$  درجه سانتی گراد می باشد. شکلات آگار و محیط های کشت برای جداسازی انتخابی گونه های نیسریای بیماریزا باید در ۱۰-۵٪  $CO_2$  انکوبه شوند و در ۲۴-۱۸ ساعت و ۴۸-۲۴ ساعت بررسی شوند. برای بی هوازی ها، کشتها عموماً به حداقل ۴۸ ساعت انکوباسیون در شرایط بی هوازی نیاز دارند. برای کمپیلوباکتر آگار، پلیتها باید در ۴۲ درجه سانتی گراد در شرایط میکروآتروفیلیک غنی از  $CO_2$  به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شوند.

### تفسیر نتایج

یک محیط کشت زمانی قابل قبول می باشد که با همه سویه های آزمون پیشنهادی برای محیط کشت در جدول ۲-۴، رشد کافی داشته و خصوصیات رشد و مورفولوژی کلنی ها بارز باشد. در محیط های انتخابی، رشد بعضی از ارگانیسهای خاص مهار می شود، در ضمن اینکه اجازه رشد کافی به ارگانیسهای دیگر می دهد. در بعضی موارد واکنشهای رنگی خاص یا همولیز همچنانکه در جدول ۲-۴ آمده است باید ایجاد شود.

جدول شماره ۲-۴ کنترل کیفیت محیطهای کشت باکتریولوژیک متداول

محیط کشت	شرایط و مدت زمان انکوباسیون	ارگانیسهای کنترل	نتایج مورد انتظار
ژلوز خون دار Sheep Blood Agar	هوازی و یا $CO_2$ ۱۸-۲۴ ساعت دمای $35^{\circ}C$	استرپتوکوکوس پایوژن ۱۹۶۱۵	رشد همولیز بتا
		استرپتوکوکوس پنومونیه ۶۳۰۵	رشد همولیز آلفا
		استافیلوکوکوس اورئوس ۲۵۹۲۳	رشد
		اشریشیا کولی ۲۵۹۲۲	رشد
شکلات آگار	$CO_2$ ۲۴ و ۴۸ ساعت دمای $35^{\circ}C$	نیسریا گونوره آ ۴۳۰۶۹	رشد
		هموفیلوس آنفلوانزا ۱۰۲۱۱	رشد

نکات مهم در کنترل کیفیت آزمایشهای میکروب شناسی \_\_\_\_\_ ۱۰۱

رشد پس از کشت مجدد	سالمونلا تیفی موریوم ۱۴۰۲۸	هوای ۱۸-۲۴ ساعت دمای C ۳۵°	محیط غنی کننده برای باسیلهای انتریک (GN)broth
رشد پس از کشت مجدد، ممکن است بوسیله محیط سلنیت مهار شود	شیگلا سونئی ۹۲۹۰		
مهار (نسبی - کامل) پس از کشت مجدد - رشد پس از کشت مجدد از GN Broth	اشریشیا کولی ۲۵۹۲۲		
رشد، کلنی های بیرنگ تاکهربایی	سالمونلا تایفی موریوم ۱۴۰۲۸	هوای ۱۸-۲۴ ساعت دمای C ۳۵°	انوزین متیلن بلو EMB
رشد، کلنی های آبی-سیاه، جلای سبز فلزی	اشریشیا کولی ۲۵۹۲۲		
عدم رشد (رشد جزئی)	انتروکوکوس فکالیس ۲۹۲۱۲		
رشد، کلنی های آبی تا آبی متمایل به سبز با مرکز سیاه	سالمونلا تایفی موریوم ۱۴۰۲۸	هوای ۱۸-۲۴ ساعت دمای C ۳۵°	هکتون انتریک HE آگار
رشد و کلنی های سبز تا سبز متمایل به آبی با مرکز سیاه رنگ	شیگلا فلکسنری ۱۲۰۲۲		
مهار نسبی رشد، کلنی های زرد	انتروکوکوس فکالیس ۲۹۲۱۲		
مهار رشد کامل و یا نسبی، در صورت رشد، کلنی برنگ زرد تا صورتی مایل به نارنجی	اشریشیا کولی ۲۵۹۲۲		
رشد، کلنی های صورتی	اشریشیا کولی ۲۵۹۲۲	هوای ۱۸-۲۴ ساعت دمای C ۳۵°	مکانکی آگار
رشد، کلنی های بیرنگ، ممانعت از سوارمینگ (تا اندازه ای)	پروتئوس میرابیلیس ۱۲۴۵۳		
رشد، کلنی های بیرنگ	سالمونلا تایفی موریوم ۱۴۰۲۸		
مهار رشد نسبی	انتروکوکوس فکالیس ۲۹۲۱۲		

## ۱۰۲ ————— کنترل کیفیت در آزمایشگاههای پزشکی

رشد کلنی های با هاله زرد پس از ۴۸ ساعت	استافیلوکوکوس اورئوس ۲۵۹۲۳	هوازی ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت دمای C ۳۵°	مانیتول سالت آگار
رشد کلنی های با هاله قرمز رنگ پس از ۴۸ ساعت	استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ۱۲۲۲۸		
عدم رشد (نسبی)	پروتئوس میرابیلیس ۱۲۴۵۳		
رشد، کلنی های بیرنگ با و یا بدون رنگ سیاه در مرکز	سالمونلا تایفی موریوم ۱۴۰۲۸		
رشد، کلنی های بیرنگ	شیگلا فلکسنری ۱۲۰۲۲	هوازی ۲۴ ساعت دمای C ۳۵°	سالمونلا شیگلا آگار
مهار رشد (کامل)	انتروکوک فکالیس ۲۹۲۱۲		
مهار رشد (کامل و یا نسبی، در صورت رشد کلنی های صورتی تا قرمز گل سرخ همراه با رسوب)	اشریشیا کولی ۲۵۹۲۲		
رشد	باکترئیدوس فراژیلیس ۲۵۲۸۵	هوازی ۴۸ ساعت (درپوش محکم شده) دمای C ۳۵°	تیو گلیکولات با و یا بدون معرف
رشد	استافیلوکوکوس اورئوس ۲۵۹۲۳		
رشد	اشریشیا کولی ۲۵۹۲۲	هوازی ۲۴-۴۸ ساعت دمای C ۳۵°	محیط کشت های لوله ای مانند BHI TSB و
رشد	استافیلوکوکوس اورئوس ۲۵۹۲۳		
رشد- کلنی های قرمز- مرکز سیاه	سالمونلا تایفی موریوم ۱۴۰۲۸		
رشد- کلنی های قرمز	شیگلا فلکسنری ۱۲۰۲۲	هوازی ۲۴ ساعت دمای C ۳۵°	زایلوز لیزین دکربوکسیلاز XLD
مهار رشد (نسبی)	انتروکوک فکالیس ۲۹۲۱۲		
مهار رشد (نسبی تا کامل- کلنی های زرد تا قرمز متمایل به زرد)	اشریشیا کولی ۲۵۹۲۲		

### تهیه کدورت نیمه مک فارلند

برای استاندارد کردن غلظت سوسپانسیون تلقیحی برای آزمایش تعیین حساسیت، باید از استاندارد سولفات باریم ( $\text{BaSO}_4$ ) که برای تهیه آن به روش زیر عمل می شود، استفاده نمود.

### نکات مهم در کنترل کیفیت آزمایشهای میکروب شناسی \_\_\_\_\_ ۱۰۳

۰/۵ میلی لیتر از کلرور باریم ( $0.048 \text{ mol/l (BaCl}_2\text{) (1.175\% W/V BaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O)}$ ) را به ۹۹/۵ میلی لیتر اسید سولفوریک ( $0.18 \text{ mol/L (1\% V/V)}$ ) اضافه کرده و با هم زدن مداوم سوسپانسیون تهیه نمائید.

چگالی صحیح استاندارد با تعیین جذب این سوسپانسیون توسط اسپکتروفتومتر در کووت به قطر ۱ سانتی متر تعیین می شود. جذب در ۶۲۵ نانومتر باید بین ۰/۰۸ تا ۰/۱۳ باشد. از سوسپانسیون حاصله ۴-۶ میلی لیتر در لوله های در پیچ دار هم اندازه با لوله های سوسپانسیون باکتریایی ریخته می شود.

در لوله ها محکم بسته شده و در دمای اتاق نگهداری می شوند. قبل از هر بار استفاده ، استاندارد با ورتکس مکانیکی به شدت همزده می شوند تا کدورت یکنواختی بدست آید. در صورت مشاهده ذرات بزرگ ، باید استاندارد تازه ای جایگزین شود. استاندارد سولفات باریم ، باید بصورت ماهانه جایگزین گردیده یا جذب آن اندازه گیری شود.

### کنترل کیفیت دیسک های آنتی بیوتیکی 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 کلارولانیک 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.

در محیط کشت قابل قبول ، هاله عدم رشد واضحی به قطر  $20\text{ mm}$  یا بزرگتر ایجاد می شود در

حالی که 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  $20\text{ mm}$  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 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 ، احتمالاً 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 در چه فواصل زمانی انجام داد ؟

الف \_ انجام آزمایش روزانه

برای هر سویه کنترلی با یک دیسک آنتی بیوتیکی باید ۳۰ روز متوالی آزمایش تعیین حساسیت انجام و نتایج با مقادیر قابل قبول اشاره شده در جداول فوق مقایسه گردد. چنانچه بیشتر از ۳ مورد خارج از محدوده کنترل باشد نیاز به اقدامات اصلاحی خواهد بود ، که در ادامه توضیح داده می شود.

ب \_ انجام آزمایش هفتگی

- آزمایش را برای ۲۰، یا ۳۰ روز متوالی انجام دهید. در صورتیکه تنها یک مورد از ۲۰ و یا حداکثر ۳ مورد از ۳۰ نتیجه قطر هاله عدم رشد برای هر سویه کنترلی / دیسک آنتی بیوتیکی خارج از محدوده قابل قبول مندرج در جداول قرار گیرد ، کنترل کیفی روزانه را به هفتگی تغییر دهید.

- آزمایش کنترل کیفی هفتگی را یکبار در هفته و هم چنین زمانی که 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 .

اگر دیسک جدیدی خریداری شده یا محیط مولر هنتیون آگار از سازنده دیگری تهیه گردیده قبل از ورود به برنامه هفتگی می بایستی بر اساس برنامه ۲۰ یا ۳۰ روزه مورد کنترل کیفی قرار بگیرد.

### 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 غیر عمدی از دما و شرایط اشتباه انکوباسیون



## ۱۰۶ ————— کنترل کیفیت در آزمایشگاههای پزشکی

در این 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 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 نهایه مشکل پی برده شود.

### عملیات اصلاحی اضافی

وقتی عملیات اصلاحی فوری مشکل را حل نکرد، احتمالاً "خطای مشاهده شده بعلمت 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)
- رعایت تاریخ انقضا و شرایط نگهداری تور بیدیتی نیم مک فارلند ( در محل تاریک و حرارت اتاق ) و تکان دادن قبل از مقایسه با سوسپانسیون میکروبی
- 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. )

## نکات مهم در کنترل کیفیت آزمایشهای میکروب شناسی \_\_\_\_\_ ۱۰۷

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

جوابدهی نتایج بیماران زمانی که نتایج کنترل کیفیت خارج از محدوده قابل قبول است: اگر به نظر می رسد که منبع خطا نتایج آنتی بیوگرام با دیسک مورد نظر و باکتری استخراج شده از بیمار را متأثر خواهد کرد ، نتایج آنتی بیوگرام با دیسک فوق قابل گزارش نمی باشد . در این شرایط نتایج قبلی آنتی بیوگرام برای باکتری جدا شده از همین بیمار را مورد بررسی قرار دهید. در صورت لزوم باکتری را جهت تشخیص به یک آزمایشگاه ارسال نمائید.

### نگهداری دیسکهای آنتی بیوتیکی

- دیسکها باید در یخچال  $8^{\circ}\text{C}$  و پایین تر ، یا در فریزر  $14^{\circ}\text{C}$  - 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 آنها را بر اساس کار روزانه آزمایشگاه ، حداکثر به مدت یک هفته در یخچال نگهداری نمود .
- بعضی آنتی بیوتیکهای حساس مثل ایمپنم ، سفاکلو و ترکیبات حاوی 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 .
- ظروف حاوی 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 لُوپ

برای شمارش کلنی های بدست آمده از کشت نمونه های بالینی بویژه ادرار به منظور تشخیص عفونت لازم است از لوپهای استاندارد با حجم معین استفاده شود. آزمایشگاه می بایست همواره از لوپهای کالیبره جهت کشت نمونه های ادراری استفاده و تعداد کلنی های موجود در هر میلی لیتر ادرار ( CFU/ml ) را گزارش نماید.

## ۱۰۸ ————— کنترل کیفیت در آزمایشگاههای پزشکی

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

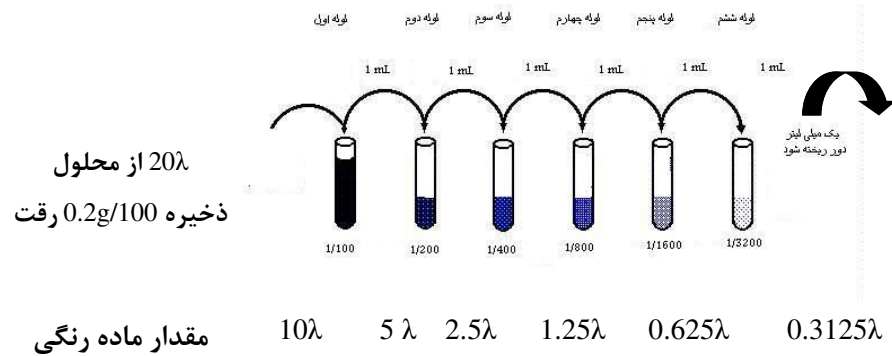
- ۱- پودر اوانس بلو (Evans Blue). این ماده به صورت پودر تجاری قابل دسترس بوده و به آسانی در آب حل می‌شود.
- ۲- آب مقطر
- ۳- لوله آزمایش
- ۴- پیپت یا سمپلر
- ۵- اسپکتروفتومتر یا فتومتر کالیبره
- ۶- کاغذ میلیمتری

### روش انجام

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

۲- ۶ لوله آزمایش انتخاب کرده ، در لوله اول 2ml و در هر یک از لوله‌های باقیمانده 1ml آب مقطر بریزید. 20 لاند (0.02 ml) از محلول ذخیره اولیه (0.2g/100) برداشته در لوله اول ریخته و کاملاً 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.

## نکات مهم در کنترل کیفیت آزمایشهای میکروب شناسی \_\_\_\_\_ ۱۰۹



۳- میزان جذب نوری (OD) هر یک از ۶ 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 میلی لیتر آب مقطر بریزید.

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

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

۷- بر روی کاغذ میلی متری نموداری ترسیم نمایید که در آن، محور افقی نشانگر رقت های تهیه شده و محور عمودی نمایانگر جذب نوری هر رقت باشد.

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

جهت تعیین تعداد کلنی در هر میلی لیتر ادرار، باید تعداد کلنی های 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 کلنی های روی پلیت ۵۰۰ عدد باشد، باید ۵۰۰ را در ۱۰۰ ضرب و نتیجه را بصورت ۵۰/۰۰۰ cfu/ml 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

Elmer W. Koneman, Color Atlas and text book of Diagnostic microbiology,  
5th edition, Williams & Wilkins 1996, 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 مرحله گرمایی، سبب کاهش کیفیت مواد مغذی در محیط‌های کشت کمپلکس محتوی قند، مواد معدنی و فلزی می‌شود و در نتیجه به محیط‌های کشت زیان وارد می‌کند. بنابراین در چرخه استریلیزاسیون باید از زمان کوتاه‌تر و دمای بالاتر استفاده کنیم تا علاوه بر آنکه آسیب کمتری به محیط کشت وارد می‌شود، برای میکرو ارگانیسم نیز کشنده تر باشد.

#### چرخه استریلیزاسیون

- مرحله ۱: زمان بالا رفتن دما در محفظه اتوکلاو ( $121^{\circ}\text{C}$ – $20^{\circ}\text{C}$ )
- مرحله ۲: زمان نفوذ گرما به داخل ظرف محیط کشت ( $121^{\circ}\text{C}$ – $100^{\circ}\text{C}$ )
- مرحله ۳: زمان نگهداری در دمای مقرر ( $121^{\circ}\text{C}$ )
- مرحله ۴: زمان پایین آمدن دمای محفظه ( $121^{\circ}\text{C}$ – $80^{\circ}\text{C}$ )

#### انواع استریلیزاسیون

- استریلیزاسیون محیط‌های کشت و محلول‌ها
- استریلیزاسیون مواد مصرفی آلوده
- استریلیزاسیون مواد خشک بسته بندی شده

### استریلیزاسیون محیط های کشت و محلولها

- بهتر است از لوله و ارلن در پیچ دار استفاده شود. بیشتر از ۲/۳ آنها را پر نکنید. در پیچ آنها را شل کنید.
- از قرار دادن اشیاء بر روی یکدیگر بپرهیزید. باید فاصله 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  $121^{\circ}\text{C}$ ) تنظیم کنید.
- زمان لازم برای رسیدن به دمای استریلیزاسیون بایستی تا حد امکان کوتاه باشد.
- چرخه 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  $121^{\circ}\text{C}$ ، به این دما برسد.

### استریلیزاسیون مواد مصرفی آلوده

- مواد مصرفی آلوده را جدا نموده و در کیسه های قابل اتوکلاو شدن قرار دهید و بر روی آنها برچسب Biohazard نصب کنید.
- برای اطمینان از نفوذ بخار به همه قسمت های کیسه، گره آنرا شل کرده 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 اتوکلاو توسط آگار مذاب، کیسه ها را داخل سطل قرار دهید.
- زمان لازم برای استریلیزاسیون زباله، ۶۰-۳۰ دقیقه در  $121^{\circ}\text{C}$  یا ۳۰-۱۵ دقیقه در  $134^{\circ}\text{C}$  می باشد.
- وقتی آگار ذوب شده، سفت شد آنرا مثل زباله عادی دور بریزید. اما محیط کشت محتوی سلنیت را باید بصورت زباله 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  $121^{\circ}\text{C}$  می باشد.

### نحوه نگهداری

- روزانه: صفحه 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 شرکت پشتیبان، 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  $60^{\circ}\text{C}$  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 کننده 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  $180^{\circ}\text{C}$  -  $160^{\circ}\text{C}$  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 فوق الذکر 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 پنبه نیم سوز مواد ضد باکتری فرآری را متصاعد می کند.



- ۳- حدود ۲ سانتی متر از انتهای فوقانی پی پتها را با پنبه غیر جاذب بسته و آنها را در ظروف فلزی قرار داده، درب آنها را ببندید.
- ۴- درپوش لوله های آزمایش را با کاغذ آلومینیومی پوشانده و آنها را بطور عمودی در جا لوله ای قرار دهید. درپوش، لبه لوله را از آلودگی از طریق هوا در طی ذخیره سازی حفظ می کند.
- ۵- در صورتی می توان بطری های درپیش دار را در اون استریل نمود که درپوش و آستری آنها از موادی مثل فلز، پلی پروپیلن 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 ظروف شیشه ای یا فلزی و در 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 بهتر است مدت زیادتری در نظر گرفته شود تا همه قسمت های اتاقک و مواد داخل آن به دمای مورد نظر برسند ( $160-180^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲ ساعت).
- ۹- به دلیل عایق بودن دستگاه، چند ساعت طول می کشد تا اشیاء داخل آن خنک شوند، مگر آنکه مجهز به فن باشد. درب اون را تا زمانی که اتاقک، ظروف و مواد داخل آن تا دمای حدود  $60^{\circ}\text{C}$  خنک شوند باز نکنید. اگر هوای سرد ناگهان وارد دستگاه شود ممکن است ظروف شیشه ای ترک بخورند.

#### نحوه نگهداری

بطور ماهانه داخل آن تمیز و هر ۶ ماه توسط شرکت پشتیبان، بازرسی شود.

#### کنترل کیفیت

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

تست بیولوژیک: استفاده از نوار کاغذی حاوی اسپور باسیلوس سوبتیلیس واریته نایجر ATCC 9372 بطور 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 بکار می رود . بعضی انکوباتورها برای نگهداری میزان دلخواه از CO<sub>2</sub> برای میکروارگانیسم هایی که دی اکسید کربن دوست (Capnophilic) هستند ، تجهیز شده اند .

الف \_ انکوباتورهای بدون CO<sub>2</sub> :

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

ب \_ انکوباتورهای CO<sub>2</sub> دار :

- سطح دما و CO<sub>2</sub> را در برگه QC در هر روز استفاده ثبت کنید .

### نکته :

در صورت اتمام کپسول گاز CO<sub>2</sub> ، تا زمان شارژ مجدد آن می توان از جار محتوی شمع جهت انکوباسیون نمونه های نیازمند CO<sub>2</sub> استفاده کرد

### نحوه نگهداری

- همه انکوباتورها باید به طور ماهانه با محلول صابون ملایم تمیز شوند .
- به منظور رعایت موارد ایمنی ، کپسولهای CO<sub>2</sub> باید به صورت ایستاده با زنجیر سنگین به دیوار محکم شوند. زمانیکه از سیلندرها استفاده نمی شود ، سوپاپها و درپوشها باید ، به طور محکم بسته شوند . سیلندرهایی خالی را روی حمل کننده سیلندر گاز به طور محکم با زنجیر نگهداری کنید . هرگز سیلندرهایی گاز را در دمای بالاتر از (۵۲°C) (۱۲۵°F) نگهداری نکنید . سیلندرها را در وضعیت افقی قرار ندهید .

الف \_ انکوباتورهای بدون CO<sub>2</sub> :

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

- منبع برق ، پریز برق و کلیدهای روشن، خاموش را بررسی کنید .
- دمای تنظیمی (Set Point) را بررسی کنید .
- اگر دستگاه هنوز درست کار نمی کند ، به شرکت پشتیبان اطلاع دهید .

ب \_ انکوباتورهای CO<sub>2</sub> دار :

یک کشت از نیسریا گونه در انکوباتور قرار دهید . هر روز آن را پاساژ داده و رشدش را بررسی نمایید . این میکرو ارگانیسم به CO<sub>2</sub> ، نیاز کامل دارد .

### نکات مهم کنترل کیفیت در آزمایشهای انگل شناسی

برای اطمینان از درستی آزمایشهای انگل شناسی باید مراحل جمع آوری نمونه ، آماده سازی، 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 می باشد :

- مراحل جمع آوری 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 می باشد.
- 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 می بایست نمونه مدفوع حاوی گلبول سفید و عاری از انگل را با محلول ید مورد آزمون، رنگ آمیزی نمود. اگر گلبولهای سفید توانایی جذب رنگ ید را داشته باشند، تک یاخته ها نیز قادر به جذب محلول ید خواهند بود. در رنگ آمیزی با محلول ید، سیتوپلاسم تک یاخته باید به رنگ زرد طلایی و مواد نشاسته ای به رنگ قهوه ای و کروماتین هسته به رنگ قهوه ای 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 به روش 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 ارگانیسرها بررسی گردد. این اقدام می‌بایست حداقل هر سه ماه (خصوصاً پس از کنترل سرعت سانتریفوژ) انجام پذیرد.

وزن مخصوص سولفات روی، باید بطور ماهانه بررسی شود. وزن مخصوص در نمونه‌های تازه ۱/۱۸ و 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.

ضمائم

## 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 می باشد.

درستون اول با عنوان Analyte اسامی کمیتها نوشته شده است.

در ستون دوم با عنوان Decision level xc غلطی از آنالیت که به لحاظ بالینی ارزش دارد و انحراف معیار مجاز برای آن غلطت محاسبه شده، آمده است.

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

ستون چهارم مقدار انحراف معیار مجاز را براساس معیارهای CLIA نشان می دهد. که خود از تقسیم عدد مندرج در ستون ششم بر ۴ بدست می آید. برای مثال فوق  $2.5 = 4 : 10$  ستون پنجم مقدار انحراف معیار مجاز را بر اساس نظریه Fraser نشان می دهد. این مقدار برای ALT معادل 6.1 می باشد.

ستون ششم محدوده مجاز خطا را به غلطت و براساس معیارهای CLIA نشان می دهد. بعنوان مثال خطای مجاز برای ALT در غلطت 50U/L معادل 20% است. که این مقدار خود برابر 10U/L ( ستون ششم ) می باشد.

$$50 \times 20\% = 10$$

برای محاسبه CV% از فرمول زیر استفاده می شود.

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

بر این اساس CV% مجاز برای ALT بر اساس معیارهای CLIA معادل  $2/5 \times 100 \div 50 = 8\%$

و بر اساس نظریه Fraser معادل  $6/1 \times 100 \div 50 = 12\%$  خواهد بود.

بدیهی است که آزمایشگاه با توجه به توانایی و نیاز خود، می بایست حتی امکان کوچکترین خطای مجاز را انتخاب نماید.

ضمیمه شماره ۱

Analytical Goals					
Analyte	Decision Level, $x_c$	Acceptable Performance, CLIA '88 <sup>104</sup>	PRECISION GOALS (MAXIMUM SD)		Fixed-Limit Goals (Maximum Total Error) CLIA '88
			$x_c \times \text{CLIA}/4$	Fraser <sup>a</sup>	
Routine Chemistry					
Alanine aminotransferase <sup>b</sup>	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 <sup>b</sup>	30 U/L	20%	1.5	1.8	6.0
Bicarbonate	20 mmol/L			0.46 <sup>c</sup>	
	30 mmol/L			0.69 <sup>c</sup>	
Bilirubin, total <sup>b</sup>	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 <sub>2</sub>	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 <sub>2</sub>	30 mm Hg	3 SD <sup>d</sup>	0.75 SD <sup>d</sup>		3 SD <sup>d</sup>
	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 <sup>e</sup>	0.04
	7.45	0.04	0.01	0.01 <sup>e</sup>	0.04
Calcium, total <sup>b</sup>	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 <sup>b</sup>	90 mmol/L	5.0%	1.1	0.54	4.5
	110 mmol/L	5.0%	1.4	0.66	5.5
Cholesterol, total <sup>b</sup>	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 <sup>b</sup>	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



Analytical Goals—Continued					
Analyte	Decision Level, $x_c$	Acceptable Performance, CLIA '88 <sup>104</sup>	PRECISION GOALS (MAXIMUM SD)		Fixed-Limit Goals (Maximum Total Error) CLIA '88
			$x_c \times \text{CLIA}/4$	Fraser <sup>1</sup>	
Routine Chemistry—Cont'd					
Glucose <sup>b</sup>	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 <sup>b</sup>	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 <sup>b</sup>	7.0 g/dL	10%	0.18	0.10	0.70
Sodium <sup>b</sup>	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 <sup>b</sup>	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 <sup>f</sup>	
17-OH Progesterone	0.5 µg/L			0.073 <sup>c</sup>	
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	
Estradiol	4500 µg/L			77	
	60 ng/L			6.8	
Follicle-stimulating hormone	450 ng/L			51	
	10 U/L			0.51	
Luteinizing hormone	95 U/L			4.8	
	6 U/L			0.44	
Prolactin	55 U/L			4.0	
	15 µg/L			0.53 <sup>c</sup>	
Prostate-specific antigen	200 µg/L			7.0 <sup>c</sup>	
	2 µg/L			0.14	
T <sub>3</sub> uptake	25%	3 SD	0.75 SD		3 SD

Analytical Goals—Continued

Analyte	Decision Level, $x_c$	Acceptable Performance, CLIA '88 <sup>104</sup>	PRECISION GOALS (MAXIMUM SD)		Fixed-Limit Goals (Maximum Total Error) CLIA '88
			$x_c \times \text{CLIA}/4$	Fraser <sup>a</sup>	
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 <sup>c</sup>	3 SD
	4.0 ng/dL	3 SD	0.75 SD	0.11 <sup>c</sup>	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 <sup>f</sup>	2.0
	12 mg/L	25%	0.75	0.77 <sup>f</sup>	3.0
Digoxin	0.8 µg/L	0.20	0.05	0.03 <sup>f</sup>	0.20
	2.0 µg/L	20%	0.10	0.08 <sup>f</sup>	0.40
Ethosuximide	40 mg/L	20%	2.0	2.0 <sup>g</sup>	8.0
	100 mg/L	20%	5.0	4.9 <sup>g</sup>	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 <sup>f</sup>	0.3
	1.5 mmol/L	20%	0.08	0.06 <sup>f</sup>	0.3
Phenobarbital	15 mg/L	20%	0.75	0.33 <sup>f</sup>	3.0
	40 mg/L	20%	2.0	0.88 <sup>f</sup>	8.0
Phenytoin	10 mg/L	25%	0.6	0.36 <sup>f</sup>	2.5
	20 mg/L	25%	1.2	0.72 <sup>f</sup>	5.0
Primidone	5 mg/L	25%	0.3	0.56 <sup>g</sup>	1.3
	12 mg/L	25%	0.75	1.36 <sup>g</sup>	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 <sup>f</sup>	2.5
	20 mg/L	25%	1.2	2.2 <sup>f</sup>	5.0
Valproate	50 mg/L	25%	3.1	3.2 <sup>f</sup>	12.5
	100 mg/L	25%	6.2	6.4 <sup>f</sup>	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%

Analytical Goals—Continued					
Analyte	Decision Level, $x_c$	Acceptable Performance, CLIA '88 <sup>194</sup>	PRECISION GOALS (MAXIMUM SD)		Fixed-Limit Goals (Maximum Total Error) CLIA '88
			$x_c \times \text{CLIA}/4$	Fraser <sup>2</sup>	
<b>Hematology—Cont'd</b>					
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/ $\mu$ L	15%	0.13	0.19	0.52
	11 K/ $\mu$ L	15%	0.41	0.58	1.65
Partial thromboplastin time	40 s	15%	1.5		6.0
Platelet count	50 K/ $\mu$ L	25%	3.12	2.3	12.5
	500 K/ $\mu$ L	25%	31.2	23	125
Prothrombin time	INR 3.6	15%	INR 0.14		INR 0.54
White cell differentiation		3 SD			3 SD
<b>Immunology</b>					
Alpha <sub>1</sub> - antitrypsin	80 mg/dL	3 SD	0.75 SD		3 SD
Alpha-fetoprotein	10 $\mu$ g/L	3 SD	0.75 SD		3 SD
Antinuclear antibody		2 Titers or $\pm$	1 Titer		
Antistreptolysin O		2 Titers or $\pm$	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 <sub>s</sub> Ag, anti-HB <sub>e</sub> , HB <sub>e</sub> Ag)		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 $\pm$	1 Titer		
Rheumatoid factor		2 Titers or $\pm$	1 Titer		
Rubella		2 Titers or $\pm$	1 Titer		

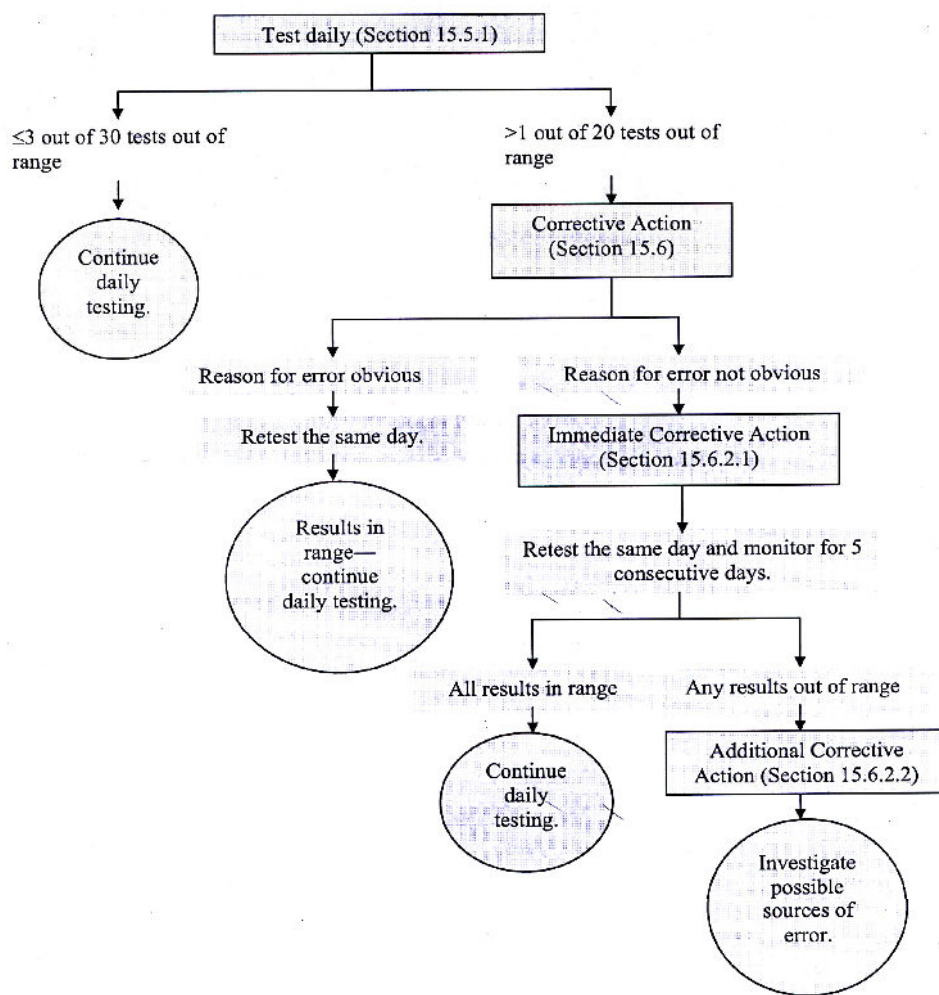
R/N, Reactive/nonreactive.

Number 1

M2-A9

Appendix A. Quality Control Protocol Flow Charts

Disk Diffusion Daily Quality Control Testing Protocol



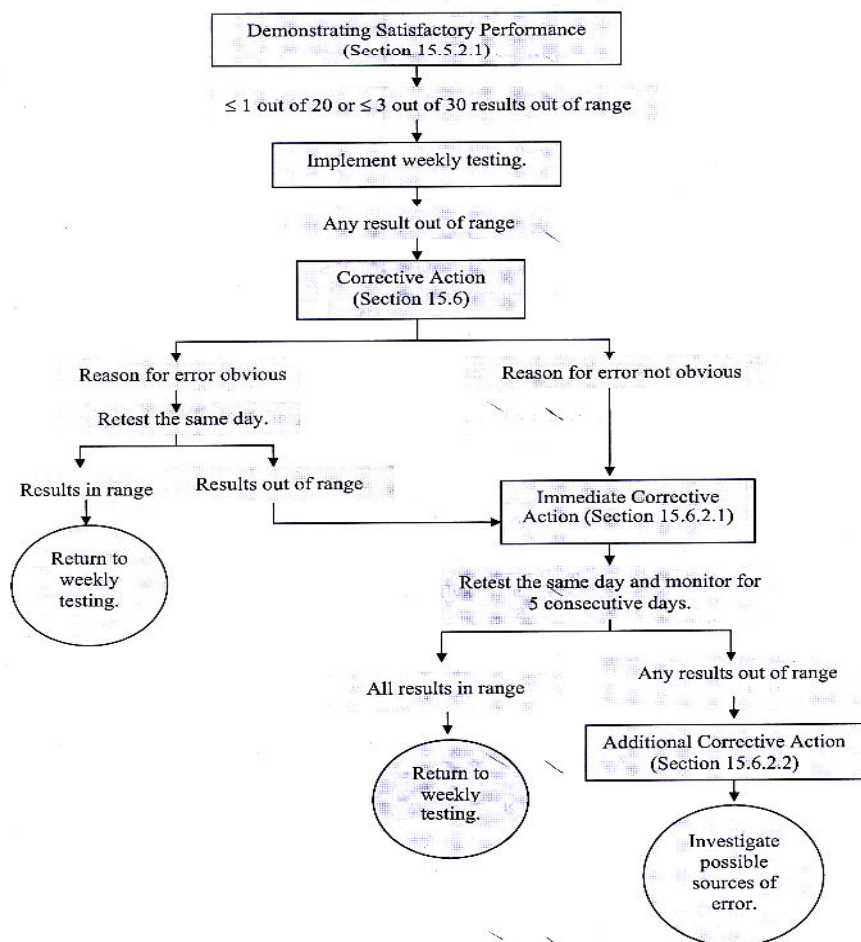
## ضمیمه شماره ۲ / ادامه

Volume 26

M2-A9

## Appendix A. (Continued)

## Disk Diffusion Weekly Quality Control Testing Protocol



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	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922 <sup>a</sup>	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 35218 <sup>b</sup>
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 <sup>c</sup>	2 µg	-	24-30	-	-
Daptomycin <sup>d</sup>	30 µg	-	18-23	-	-
Dinithromycin	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 <sup>e</sup>	15 µg	-	22-30	-	-
Fleroxacin	5 µg	28-34	21-27	12-20	-
Fosfomycin <sup>f</sup>	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 <sup>g</sup>	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 ۳/۱ ادامه

Table 3. (Continued)

Antimicrobial Agent	Disk Content	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922 <sup>a</sup>	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 35218 <sup>b</sup>
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 <sup>c</sup>	10 µg	12-20	14-22	-	-
Sulfisoxazole <sup>d</sup>	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 <sup>e</sup>	5 µg	21-28	19-26	-	-
Trimethoprim-sulfamethoxazole <sup>f</sup>	1.25/23.75 µg	23-29	24-32	-	-
Trospectomycin	30 µg	10-16	15-20	-	-
Trovafoxacin	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

- ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection.
- Careful organism maintenance is required; refer to M2-A9, Section 15.3.
- 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.
- Some lots of Mueller-Hinton agar are deficient in calcium and give small zones.
- The 200-µg fosfomycin disk contains 50 µg of glucose-6-phosphate.
- 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).
- 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 ۳/۱ ادامه

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

Antimicrobial Agent	Disk Content	<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC® 49247 <sup>a</sup>	<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC® 49766	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC® 49226	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 49619 <sup>b</sup>
Amoxicillin-clavulanic acid <sup>c</sup>	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 <sup>d</sup>	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 <sup>e</sup>	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 <sup>f</sup>
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



## ضمیمه شماره ۳/۱ ادامه

Table 3A. (Continued)

Antimicrobial Agent	Disk Content	<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC® 49247 <sup>a</sup>	<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC® 49766	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC® 49226	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 49619 <sup>b</sup>
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	-
Trovafoxacin	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

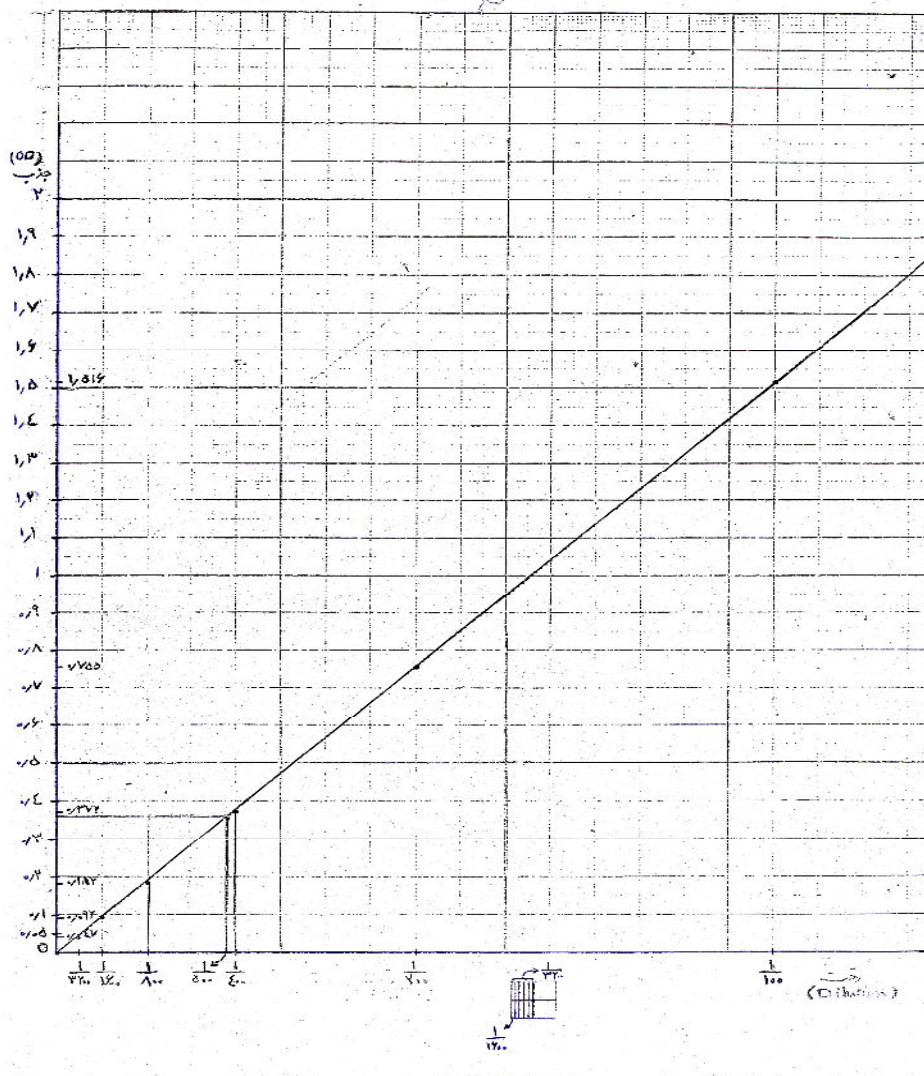
Organism	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Streptococci and <i>Neisseria meningitidis</i>
Medium	<i>Haemophilus</i> Test Medium	GC agar base and 1% defined growth supplement. The use of a cysteine-free growth supplement is not required for disk diffusion testing.	MHA supplemented with 5% defibrinated sheep blood
Inoculum	Direct colony suspension	Direct colony suspension	Direct colony suspension
Incubation Characteristics	5% CO <sub>2</sub> ; 16 to 18 hours; 35 °C	5% CO <sub>2</sub> ; 20 to 24 hours; 35 °C	5% CO <sub>2</sub> ; 20 to 24 hours; 35 °C

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

## Footnotes

- ATCC is a registered trademark of American Type Culture Collection.
- 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.
- 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.
- Either *H. influenzae* ATCC® 49247 or 49766 may be used for routine quality control testing.
- Some lots of Mueller-Hinton agar are deficient in calcium and give small zones.
- 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



### کنترل کیفیت آزمایشهای کیفی Qualitative

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

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

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

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

۳- آزمایشهای تأییدی برای تأیید آزمایشهای غربالگری یا تشخیصی بکار می‌روند و با 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 تأیید VDRL، RIBA برای تشخیص هپاتیت C و روش Neutralization برای هپاتیت B 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 PH محیط، بافر مناسب، دما، حرکت مناسب (shaking) و نسبت معرفها و نمونه‌ها، رعایت شوند.

## ۱۲۰ \_\_\_\_\_ کنترل کیفیت در آزمایشگاههای پزشکی

- 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 اتواگلوتیناسیون 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.

### ***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. McPherson R.A, Pincus M.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.1<sup>st</sup>.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](http://www.westgard.com)
8. Westgard J.O , *MULTIRULE AND "WESTGARD RULES": WHAT ARE THEY?* 2005 available from [www.westgard.com](http://www.westgard.com)
9. Westgard J .O , *"Westgard Rules" Multirule Worksheets*, 2006, available from [www.westgard.com](http://www.westgard.com)
10. Barry P.L, *QC - THE LEVEY-JENNINGS CONTROL CHART* 2000 available from [www.westgard.com](http://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. CLSI Document M2-A.volume 26, *Performance Standards For Antimicrobial Susceptibility Tests. Approved Guidline,Eighth Edition, 2006*
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, 10<sup>th</sup> edition, 2006*
20. CLSI 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 ;Wilams& Wilkins , 1997*
23. *Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology; WHO ; 1992*
24. *Basic Laboratory Procedures in Clinical Parasitology; WHO ; 1991*
25. CLSI Document M28-A2 *Procedures for the Recovery and Identification of Parasites From the Intestinal Tract; Approved Guideline - Second Edition, 2005*
26. *National Committee for Clinical laboratory Standards: Quality assurance for commercially prepared microbiology culture media; Approved standards; Thrid Edition. NCCLS document M22-A3. USA, 2004*
27. Mahon CR. Manuselis. *Text book of Diagnostic Microbiology Ed. 2.W.B Saunders Company .2000*





۱۶۳۸



انتشارات نوید شیراز