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

گردآوری و نگارش: دکتر پریسا داهیم

نظارت علمی: اعضای کمیتهٔ هماتولوژی آزمایشگاه مرجع سلامت

اعضای کمیته به‌ترتیب حروف الفبا:

دکتر مینو احمدی‌نژاد(متخصص آسیب‌شناسی)
دکتر بهزاد پوپک(دکترای تخصصی هماتولوژی)
دکتر کتایون خداوردیان(دکترای علوم آزمایشگاهی)
دکتر پریسا داهیم(متخصص آسیب‌شناسی)
دکتر آتوسا شریعت تربقانی(متخصص آسیب‌شناسی)
دکتر عبدالعلی شمس برهان(متخصص علوم آزمایشگاهی)
دکتر محمد فرهادی لنگرودی(متخصص آسیب‌شناسی)
دکتر فرید کوثری(متخصص آسیب‌شناسی)

با همکاری: دکتر مرجان رهنمای فرزامی(متخصص آسیب‌شناسی)

وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی
معاونت سلامت

آزمایشگاه مرجع سلامت

مرکز نشر

سرشناسه: داهیم، پریسا، ۱۳۴۵-
عنوان و نام پدیدآور: دستگاه‌های خودکار شمارندهٔ سلولی (اساس کار، کالیبراسیون، کنترل کیفیت و خطاها) گردآوری و نگارش: پریسا داهیم؛ نظارت علمی اعضای کمیتهٔ هماتولوژی آزمایشگاه مرجع سلامت؛ با همکاری مرجان رهنمای فرزامی؛ [به سفارش] وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی؛ معاونت سلامت؛ آزمایشگاه مرجع سلامت.
مشخصات نشر: تهران: مرکز نشر صدا، ۱۳۸۸.
مشخصات ظاهری: ۶۴ ص.: جدول
شابک: ۹-۲۴۷-۳۵۹-۹۶۴-۹۷۸
وضعیت فهرست‌نویسی: فیپا
موضوع: پزشکی -- آزمایشگاه‌ها -- ابزار و وسایل
موضوع: پزشکی -- آزمایشگاه‌ها -- کنترل کیفی
موضوع: تشخیص آزمایشگاهی -- کنترل کیفی
شناسه افزوده: ایران، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی؛ معاونت سلامت؛ آزمایشگاه مرجع سلامت.
رده‌بندی کنگره: ۱۳۸۸ ۵د۲/۲/RB۳۶
رده‌بندی دیویی: ۶۱۶/۰۷۵۰۲۸
شماره کتابشناسی ملی: ۱۹۱۳۶۷۸

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

گردآوری و نگارش: دکتر پریسا داهیم
نظارت علمی اعضای کمیتهٔ هماتولوژی آزمایشگاه مرجع سلامت: دکتر مینو احمدی‌نژاد(متخصص آسیب‌شناسی) دکتر بهزاد پوپک(دکترای تخصصی هماتولوژی) ـ دکتر کتایون خداوردیان(دکترای علوم آزمایشگاهی) ـ دکتر پریسا داهیم(متخصص آسیب‌شناسی) ـ دکتر آتوسا شریعت تربقانی(متخصص آسیب‌شناسی) ـ دکتر عبدالعلی شمس برهان(متخصص علوم آزمایشگاهی) دکتر محمد فرهادی لنگرودی(متخصص آسیب‌شناسی) ـ دکتر فرید کوثری(متخصص آسیب‌شناسی)
با همکاری: دکتر مرجان رهنمای فرزامی(متخصص آسیب‌شناسی)
خدمات طراحی، چاپ و نشر: مرکز نشر صدا
نوبت چاپ: اول(۱۳۸۸)
شمارگان: ۵۰۰۰ نسخه
قیمت: ندارد
شابک: ۹-۲۴۷-۳۵۹-۹۶۴-۹۷۸ ISBN: 978-964-359-247-9
«حق چاپ برای آزمایشگاه مرجع سلامت محفوظ است.»

مرکز نشر صدا: تهران، تقاطع خیابان مطهری و ولی‌عصر، خیابان منصور، شمارهٔ ۲۴
۸۸۵۵۳۴۲۹ - ۸۸۵۵۳۴۰۳ - دورنگار: ۸۸۷۱۳۶۵۳

فهرست

پیش‌گفتار ۵
مقدمه ۷
فصل اول: کلیات ۹
اصول اولیهٔ کار با دستگاه‌های خودکار شمارندهٔ سلولی ۱۱
شناسنامهٔ دستگاه‌های خودکار شمارندهٔ سلولی ۱۲
نکته‌های مهم در انجام آزمایش CBC ۱۳

فصل دوم: اساس کار، کالیبراسیون، کنترل کیفیت و خطاهای دستگاه‌های خودکار شمارندهٔ سلولی ۱۷
۱. اساس کار دستگاه‌های خودکار شمارندهٔ سلولی ۱۹
۲. کالیبراسیون دستگاه‌های خودکار شمارندهٔ سلولی ۲۴
۳. کنترل کیفیت دستگاه‌های خودکار شمارندهٔ سلولی ۲۷
۳-۱- خون کنترل ۲۷
۳-۲- آزمون پایداری کالیبراسیون ۳۱
۳-۳- آزمایش دوتایی ۳۳
۳-۴- آزمایش بازبینی ۳۴
۳-۵- آزمایش دلتا ۳۵
۳-۶- استفاده از نتایج بیماران ۳۶
۳-۷- بررسی عدم دقت(CV) ۳۶
۳-۸- بررسی صحت ۳۸
۳-۹- تطابق نتایج دستگاه با یافته‌های میکروسکوپی یا بالینی ۳۸
۴. خطاهای دستگاه‌های خودکار شمارندهٔ سلولی ۴۲

فصل سوم: روش‌های مرجع انجام آزمایش‌ها ۴۹
۱. اندازه‌گیری هموگلوبین خون به روش سیانمت‌هموگلوبین ۵۱
۲. روش اندازه‌گیری حجم سلول‌های متراکم‌شده به روش میکروهماتوکریت ۵۴
کنترل کیفیت و بررسی کالیبراسیون دستگاه میکروهماتوکریت ۵۷
۳. شمارش سلول‌های خونی به روش دستی ۵۹
شمارش گلبول‌های سفید ۵۹
شمارش پلاکت ۶۱
منابع ۶۴

پیش‌گفتار

به‌نام خالق هستی‌بخش

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

در این مجموعه که با هدف استاندارد و یکسان‌نمودن روند کنترل کیفیت دستگاه‌های خودکار شمارندهٔ سلولی تهیه‌گردیده، به دستورالعمل‌های کاربردی و قابل اجرا برای استفادهٔ تمام همکاران و کارشناسان در رشته‌های مرتبط آزمایشگاهی متناسب با نیاز آزمایشگاه‌ها اشاره شده‌است.

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

دکتر سعید مهدوی
مدیر کل آزمایشگاه مرجع سلامت

مقدمه

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

یکی از آزمایش‌های معمول در آزمایشگاه‌های پزشکی، شمارش سلول‌های خون(CBC)[1] است که در بیشتر آزمایشگاه‌ها با دستگاه‌های خودکار شمارندهٔ سلولی(سل کانتر)[2] انجام می‌شود؛ بنابراین، اطمینان از صحت و دقت نتایج این آزمایش، مستلزم آگاهی کامل از عملکرد این دستگاه‌ها و آشنایی با روش‌های کالیبراسیون، کنترل کیفیت و خطاهای مربوط است.

متن این کتاب با استفاده از منابع معتبر و راهنماهای منتشرهٔ سازمان جهانی بهداشت(WHO) و مؤسسهٔ استاندارد آزمایشگاه بالینی(CLSI)[3] و متون و منابع معتبر خون‌شناسی با هدف ارائهٔ مطالب کاربردی و روش‌های کنترل کیفیت قابل اجرا در کشور، برای کارکنان آزمایشگاه‌های کشور در تمام سطوح تهیه‌شده و مشتمل بر سه فصل است:

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

1. Cell Blood Counter
2. Cell Counter
3. Clinical Laboratory Standard Institute

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

دکتر پریسا داهیم

فصل اول

کلیات

اصول اولیهٔ کار با دستگاه‌های خودکار شمارندهٔ سلولی

تمام کاربران دستگاه‌های خودکار شمارندهٔ سلولی باید اصولی را که به عملکرد بهتر دستگاه منجرشده و در زیر به برخی از آنها اشاره‌می‌شود، درنظر داشته‌باشند:

۱. رعایت مواردی مانند روشن و خاموش کردن دستگاه، بررسی درجات فشار(برحسب نوع دستگاه)، نحوهٔ نگهداری و شست‌وشو(روزانه، هفتگی، ماهانه)، تعمیرات لازم، تعویض محلول‌ها و سایر اقدام‌ها مطابق دستورالعمل شرکت سازنده.

۲. گذراندن دورهٔ آموزشی نحوهٔ کار با دستگاه و اصول نگهداری، زیر نظر کارشناسان شرکت‌های پشتیبان(در این رابطه، سوابق مربوطه شامل تاریخ و شرح آموزش یا گواهی دورهٔ آموزشی باید در پروندهٔ هر کاربر نگهداری‌شود و درصورت تعویض کاربر نیز آموزش‌های لازم درنظر گرفته‌شود).

۳. نگهداری مدارک دستگاه از قبیل شناسنامه، دستورالعمل فنی و سوابقی مانند سوابق خرید، کالیبراسیون، کنترل و نگهداری، تعویض محلول‌ها، تعمیرات و سرویس‌ها، و سایر اقدام‌ها درصورت لزوم.

۴. آشنایی کامل با نحوهٔ کالیبراسیون و کنترل کیفی دستگاه.

نکته

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

نکاتی در رابطه با محلول‌های دستگاه‌های خودکار شمارندهٔ سلولی(ایزوتون، لایز و...)

۱. محلول‌های دستگاه باید با داشتن تاریخ انقضا و سری ساخت مشخص، فقط از شرکت پشتیبان و یا شرکت‌های ثبت‌شده در وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی تهیه‌شوند.
۲. روی ظرف حاوی هر محلول باید برچسبی با حداقل اطلاعات مانند نام محلول، تاریخ انقضا و تاریخ تعویض الصاق شده‌باشد.
۳. هیچ‌گاه ته‌ماندهٔ محلول قبلی به محلول جدید اضافه‌نشود.

نکته

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

شناسنامهٔ دستگاه‌های خودکار شمارندهٔ سلولی

دستگاه‌های خودکار شمارندهٔ سلولی مانند سایر تجهیزات آزمایشگاهی باید شناسنامه‌ای با این اطلاعات داشته‌باشند:

۱. تاریخ خرید؛
۲. تاریخ نصب و کالیبراسیون و نام کارشناس شرکت پشتیبان که دستگاه را راه‌اندازی نموده‌است؛
۳. تاریخ شروع کار دستگاه؛
۴. کارخانه و کشور سازنده؛
۵. مدل و شماره سریال دستگاه؛
۶. شرایط دستگاه هنگام خرید(نو، مستعمل و بازسازی‌شده)؛
۷. نام، شماره تلفن و نشانی شرکت پشتیبان؛
۸. نام کاربر یا کاربران دستگاه؛
۹. مشخصات و نحوهٔ آموزش کاربر دستگاه توسط شرکت پشتیبان.

توصیه‌می‌شود در این شناسنامه میزان عدم دقت و عدم صحت دستگاه هنگام نصب نیز قیدشود.

نکته

علاوه‌بر شناسنامه، موارد زیر نیز باید به‌صورت مکتوب برای هر دستگاه در آزمایشگاه موجود باشد:

- **مشخصات محلول‌ها و مواد مصرفی؛**
- **سوابق کالیبراسیون و کنترل کیفی؛**
- **سوابق تعمیر با ذکر قطعهٔ تعویض‌شده؛**
- **سوابق نگهداری، سرویس‌های دوره‌ای و خدمات پشتیبانی.**

نکته‌های مهم در انجام آزمایش CBC

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

۱. مرحلهٔ پیش از آزمایش[1]

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

1. Pre Analytical Phase

- نمونه با مشاهدهٔ دقیق یا با استفاده از اپلیکاتور ازنظر نبود لخته و همولیز یا لیپمی بررسی‌شود.
- حداکثر فاصلهٔ زمانی بین نمونه‌گیری و انجام آزمایش حدود ۴ تا ۶ ساعت باشد.
- بلافاصله پیش از انجام آزمایش، نمونهٔ خون با قراردادن ویال به‌مدت ۳ تا ۵ دقیقه روی روتاتور و یا حداقل ۱۰ بار سروته‌نمودن کامل، هموژن و یکنواخت شود.

۲. مرحلهٔ انجام آزمایش[1]

هر روز پیش از شروع آزمایش، شمارش زمینهٔ دستگاه[2] انجام‌شده و درصورت امکان سوابق آن نگهداری‌شود. به‌طور معمول، مقادیر مربوط به شمارش زمینهٔ هر دستگاه در دستورالعمل آن ارائه شده‌است. سازمان جهانی بهداشت نیز در این رابطه معیارهایی ارائه نموده‌است که در زیر به آنها اشاره‌می‌شود:

تعداد گلبول‌های قرمز < ۰/۰۳ x $۱۰^{۱۲}$/ L
تعداد گلبول‌های سفید < ۰/۰۴ x $۱۰^{۹}$/ L
هموگلوبین < ۰/۲g/ dL
تعداد پلاکت‌ها < ۰/۵ x $۱۰^{۹}$/ L

درصورت زیادبودن تعداد نمونه‌های مورد آزمایش در هر سری کاری، بهتر است در فواصل آزمایش‌ها دستور شست‌وشوی دستگاه و بررسی شمارش زمینه مجدداً اجراشود.

برای اطمینان از صحت مرحلهٔ انجام آزمایش، آشنایی کامل کاربر با اصول کار با دستگاه ، اجرای برنامه‌های کالیبراسیون و کنترل کیفیت و رفع خطاها الزامی است.

۳. مرحلهٔ پس از آزمایش[3]

هنگام بررسی نتایج و پیش از ارائهٔ گزارش، موارد زیر باید درنظر گرفته‌شوند:

اثر مواد ضدانعقاد

- ضدانعقاد مایع K_3EDTA به‌دلیل ایجاد رقت در نمونه، مقدار هموگلوبین را تا ۱٪ کاهش‌می‌دهد.

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

- استفاده از ضدانعقاد K_3EDTA باعث چروکیدگی گلبول‌های قرمز و کاهش ۲٪ میزان هماتوکریت می‌شود. درصورتی که آزمایشگاهی ضدانعقاد مورد استفادهٔ خود را از K_3EDTA به K_2EDTA تغییردهد، باید به این نکته توجه‌نماید که میانگین MCV ۲٪ افزایش و میانگین MCHC به همین میزان کاهش‌می‌یابد.

خطاهای ناشی از ماهیت نمونه یا خطاهای کاذب ناشی از دستگاه

- تعداد گلبول‌های سفید بیش از $۳۰\times۱۰^۹/L$، مقدار همـوگلوبین را بـه میـزان ۳g/L افزایش‌می‌دهد.
- مواردی مانند تعداد پلاکت بیش از $۷۰۰\times۱۰^۹/L$، مقدار زیاد هموگلوبین S، میکروسیتوز و هایپوکرومی میزان Hb را به‌طور کاذب بالامی‌برند.
- خطاهای کاذب ناشی از دستگاه به تفصیل در انتهای فصل دوم آمده‌است.

نکته

مشاهدهٔ گسترش خون محیطی و بررسی وضعیت بالینی بیمار و مطابقت آنها با نتیجهٔ دستگاه پیش از گزارش‌دهی ضروری است.

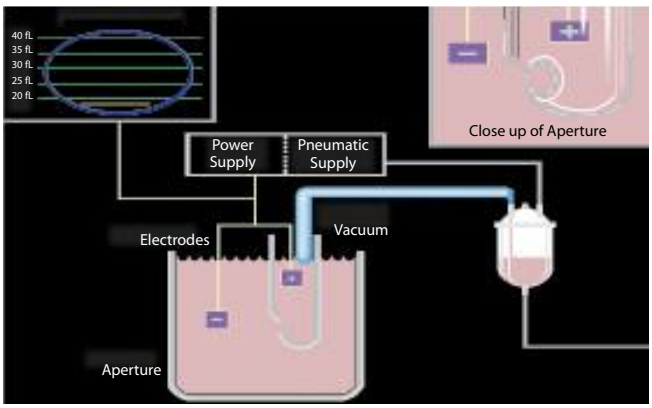
فصل دوم

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

۱. اساس کار دستگاه‌های خودکار شمارندهٔ سلولی

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

۱. **مقاومت الکتریکی**[1]: این روش اولین بار توسط والاس کولتر[2] در سال **۱۹۵۶** مطرح‌شد و اساس کار دستگاه‌هایی نظیر کولتر[3]، بک‌من[4]، سیسمکس[5]، ابوت[6] و... قرارگرفت. در این مکانیسم، خون در یک محلول بافری الکتریکی رقیق‌شده و از بین دو الکترود حامل جریان الکتریکی مستقیم عبورمی‌کند. با عبور هر سلول خونی از این مسیر، مقاومت الکتریکی و یک پالس الکتریکی ایجادمی‌شود. تغییر در پتانسیل بین الکترودها متناسب با مدت زمانی است که گلبول از فضای بین دو الکترود، که اصطلاحاً دریچه[7] نامیده‌می‌شود، عبورمی‌کند. ارتفاع هر پالس نشان‌دهندهٔ حجم سلول و تعداد پالس نشان‌دهندهٔ تعداد سلول است.



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

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

۲. **پراکندگی نور**[1]: در این روش، سوسپانسیون رقیق‌شدهٔ سلول‌ها به‌صورت یک ردیف سلولی از مقابل منبع نوری عبورمی‌کند و باعث پراکندگی نور می‌شود. نور پراکنده از طریق یک فزایندهٔ نوری[2] یا فوتودیود[3] به پالس‌های الکتریکی تبدیل‌می‌شود که در این حالت، تعداد پالس‌ها نمایانگر تعداد سلول‌ها و ارتفاع پالس‌های الکتریکی، که متناسب با میزان پراکندگی نور بوده، نشان‌دهندهٔ حجم سلول‌ها است. منبع نوری بر حسب نوع دستگاه، لیزر یا تنگستن است. هرچه قطر ردیف سلول‌های عبوری کوچک‌تر باشد(به اندازهٔ قطر گلبول‌های قرمز)، نور با دقت بیشتری بر جریان سلول‌ها تابیده و نتایج دقیق‌تری حاصل‌می‌شود.

در دستگاه‌های خودکار شمارندهٔ سلولی حداقل دو مجرا طراحی شده‌است:

- **در مجرای اول**، با افزودن رقیق‌کننده به نمونه خون، اندازه و تعداد گلبول‌های قرمز و پلاکت‌ها مشخص‌می‌شود، که به‌منظور جداسازی پلاکت‌ها از گلبول‌های قرمز و شمارش آنها در دستگاه دو آستانهٔ جداکنندهٔ بالا و پایین تعیین شده‌است.
- **در مجرای دوم**، با افزودن مادهٔ لیزکننده به نمونه و با کمک رقیق‌کننده، گلبول‌های قرمز لیزشده و گلبول‌های سفید که دست‌نخورده مانده‌اند، شمارش‌می‌شوند. در این مجرا، علاوه‌بر شمارش گلبول‌های سفید، مقدار هموگلوبین نیز به روش سیان‌مت‌هموگلوبین اندازه‌گیری‌می‌شود.

در دستگاه‌های جدیدتر برای شمارش افتراقی لکوسیت‌ها مجراهای دیگری درنظر گرفته شده‌است.

اندازه‌گیری PCV[4] و MCV[5] در دستگاه‌های خودکار شمارندهٔ سلول کاملاً به یکدیگر وابسته‌اند. در برخی دستگاه‌ها، با محاسبهٔ میانگین ارتفاع پالس‌های حاصل از عبور گلبول‌های قرمز از دریچه، مقدار MCV مشخص‌می‌شود و براساس تعداد گلبول‌های قرمز شمارش‌شده، میزان هماتوکریت توسط دستگاه محاسبه‌می‌شود. در دستگاه‌های دیگر، از مجموع پالس‌های حاصل از عبور گلبول‌های قرمز، میزان PCV تعیین‌شده و با استفاده از تعداد گلبول‌های قرمز، مقدار MCV محاسبه‌می‌شود. تقریباً در تمام

1. Light Scattering
2. Photomultiplier
3. Photodiod
4. Packed Cell Volume
5. Mean Corpuscular Volume

دستگاه‌ها سایر شاخصه‌های گلبول‌های قرمز مانند MCH[1] و MCHC[2] ازطریق محاسبه و با استفاده از مقادیر هموگلوبین، PCV و تعداد گلبول‌های قرمز مشخص‌می‌شوند.

میزان پراکندگی اندازهٔ گلبول‌های قرمز(RDW)[3] در دستگاه‌ها، با استفاده از محاسبهٔ میزان تغییرات ارتفاع پالس‌های ایجادشده به دنبال عبور گلبول‌های قرمز تعیین و به‌صورت انحراف معیار SD[4](با واحد فمتولیتر) یا ضریب انحراف معیار CV[5](درصد) ارائه‌می‌شود.

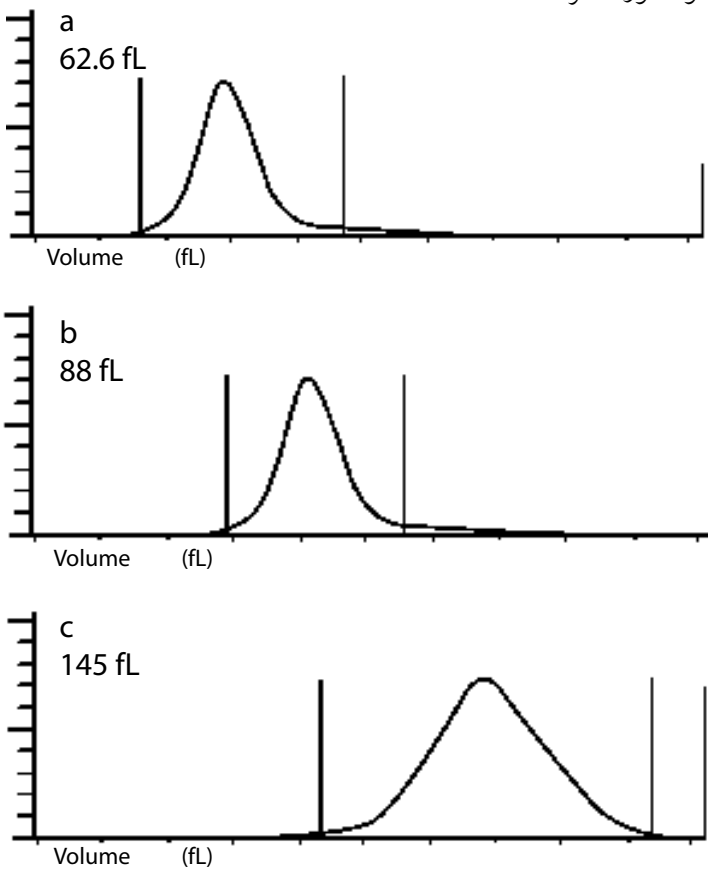
در بعضی دستگاه‌ها نظیر بایرتکنیکون[6]، میزان پراکندگی هموگلوبین داخل سلول(HDW)[7] نیز مشخص‌می‌شود. این مقدار در واقع نشان‌دهندهٔ پراکندگی(CV) غلظت هموگلوبین در هر سلول یا آنیزوکرومیا[8] یا نمای دی‌مورفیک[9]گلبول‌های قرمز است.

شمارش افتراقی گلبول سفید در دستگاه‌های مختلف، با استفاده از مکانیسم‌های مختلف مانند مقاومت الکتریکی و جریان‌های الکتریکی با تواترهای مختلف، تعیین اندازهٔ هسته، پراکندگی و جذب نور، واکنش‌های شیمیایی ناشی از گرانول‌ها و... صورت‌گرفته و به‌صورت سه، پنج و هفت‌قسمتی گزارش‌می‌شود. در شمارش افتراقی سه‌قسمتی، سه گروه سلول براساس اندازه، شامل سلول‌های بزرگ یا گرانولوسیت‌ها، سلول‌های کوچک یا لنفوسیت‌ها و سلول‌های متوسط شامل مونوسیت‌ها، بازوفیل‌ها، ائوزینوفیل‌ها و سلول‌های مونونوکلئر شمارش‌می‌شوند. در شمارش افتراقی پنج‌قسمتی، رده‌های نوتروفیل، ائوزینوفیل، بازوفیل، لنفوسیت‌ها و مونوسیت‌ها شمارش‌شده و در شمارش افتراقی هفت‌قسمتی علاوه‌بر رده‌های ذکرشده، سلول‌های بزرگ نابالغ (بلاست و گرانولوسیت‌های نابالغ) و لنفوسیت‌های آتیپیکال(بلاست‌های کوچک) نیز جای‌می‌گیرند.

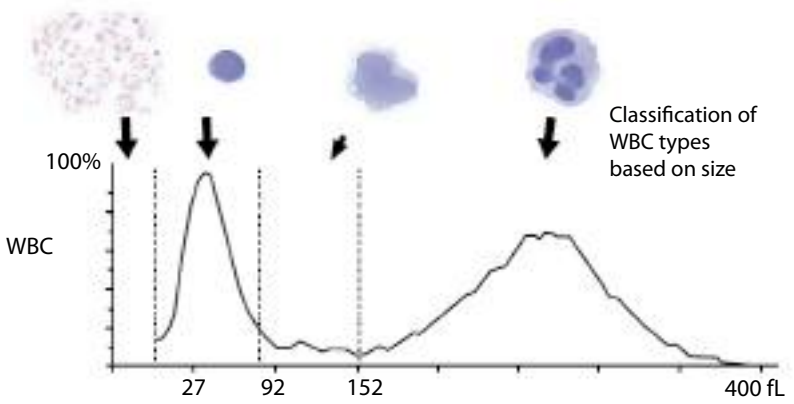
1. Mean Corpuscular Hemoglobin
2. Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration
3. Red cell Distribution Width
4. Standard Deviation
5. Coefficient Variation
6. Byertechnicon
7. Hemoglobin Distribution Width
8. Anisochromia
9. Dimorphic

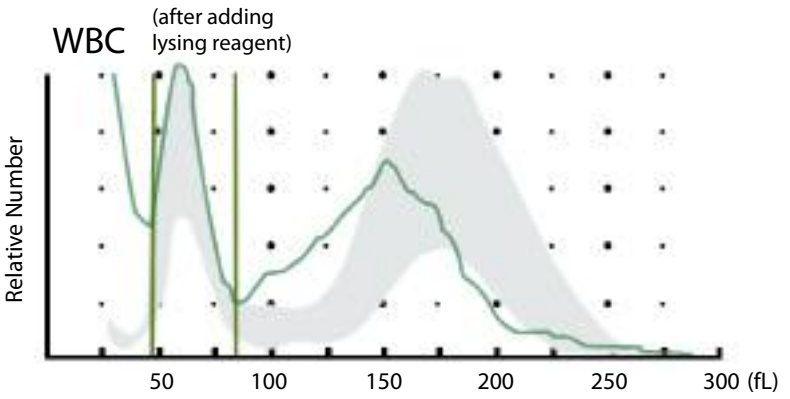
بسیاری دستگاه‌های تمام‌خودکار علاوه‌بر ارائهٔ داده‌های عددی برای برخی از پارامترهای مورد اندازه‌گیری، نمودارهایی (هیستوگرام) نیز رسم‌می‌نماینـد که مشاهدهٔ آنها به کاربر اطلاعات بیشتر و کامل‌تری می‌دهد. این هیستوگرام‌ها معمولاً نمایانگر پراکندگی اندازهٔ گلبول‌های سفید و قرمز و پلاکت‌ها براساس اندازه هستند. بعضی دستگاه‌ها علاوه‌بر این نمودارهـا، نمودار میزان پراکندگی غلظت هموگلوبین گلبول‌های قرمز را در مقابل اندازهٔ آنها نشان‌می‌دهد.

در این نمودارها، محور افقی نشان‌دهندهٔ اندازهٔ (حجم) سلول و محور عمودی نمایانگر تعداد سلول مورد نظر است.



تصویر شمارهٔ ۲: هیستوگرام‌های گلبول‌های سفید





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

۲. کالیبراسیون دستگاه‌های خودکار شمارندهٔ سلولی

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

تمام دستگاه‌ها باید پس از نصب و پیش از شروع کار کالیبرشده و میزان عدم دقت آنها نیز بررسی‌شود. سوابق اجرایی این امر باید در آزمایشگاه نگهداری‌گردد.

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

- هنگام نصب و راه‌اندازی،
- پس از هر بار تعمیر یا سرویس،
- قابل قبول نبودن نتایج کنترل کیفی روزانه(درصورت اطمینان از خراب‌نبودن نمونهٔ کنترل)،
- تعویض محلول‌ها(درصورت تغییر مشخص در نتایج خون کنترل یا نمونهٔ بیماران).

برای بررسی میزان عدم دقت(CV) پارامترهای مختلف اندازه‌گیری‌شونده توسط دستگاه، می‌توان از نمونه‌های کنترل یا خون تازه در دامنه‌های طبیعی و غیرطبیعی مطابق توضیحات بند **۳** مبحث «کنترل کیفیت دستگاه‌های خودکار شمارندهٔ سلولی» استفاده‌کرد که مقادیر به‌دست آمده باید مطابق ادعای کارخانهٔ سازنده باشد که در دستورالعمل دستگاه درج شده‌است.

برای کالیبراسیون دستگاه، کالیبراتورهای تجاری وجوددارد که مقادیر مورد نظر در آنها با روش‌های مرجع اندازه‌گیری شده‌است. این سوسپانسیون‌های سلول‌های خونی، درصورت داشتن تاریخ انقضای معتبر و تأییدیه‌های لازم و به شرط رعایت

دستورالعمل‌های کارخانهٔ سازنده، برای کالیبراسیون دستگاه‌ها مناسب هستند. می‌توان موفقیت روند کالیبراسیون را به‌وسیلهٔ آزمایش نمونهٔ کنترل، مقایسهٔ نتایج دستگاه با نتایج آزمایش‌شده روی چند نمونه خون با روش‌های مرجع و یا کنترل دقیق میانگین‌های متحرک دربارهٔ شاخص‌های گلبول‌های قرمز[1] تأییدکرد.

درصورت دسترسی نداشتن به کالیبراتورهای تجاری یا داشتن تردید نسبت به اعتبار آن، استفاده از خون کامل برای کالیبراسیون ضروری است. برای کالیبراسیون باید از خون طبیعی و تازه استفاده‌کرد. برای این کار، پارامترهای حداقل سه نمونهٔ خون کامل طبیعی، دو بار با روش‌های مرجع دستی و دو بار با دستگاه شمارندهٔ سلولی اندازه‌گیری‌می‌شود و پس از محاسبهٔ میانگین نتایج هر پارامتر با روش دستی و دستگاهی، ضریب کالیبراسیون جدید با استفاده از فرمول زیر تعیین‌می‌شود. با افزایش تعداد نمونه‌ها، دقت کالیبراسیون بیشتر می‌شود.

$$\text{ضریب کالیبراسیون} = \frac{\text{میانگین روش دستگاهی} - \text{میانگین روش دستی}}{\text{میانگین روش دستگاهی}} \times ۱۰۰$$

روش‌های مرجع اندازه‌گیری هموگلوبین، هماتوکریت و شمارش گلبول‌های سفید به‌ترتیب سیان‌مت‌هموگلوبین، میکروهماتوکریت و استفاده از هماسیتومتر(با درجه‌بندی نئوبار اصلاح‌شده) هستند. در کتاب‌های مرجع، روش مرجع شمارش گلبول‌های سفید، گلبول‌های قرمز و پلاکت‌ها، شمارنده‌های سلولی تک‌کاناله عنوان‌شده‌اند که در ایران، به‌علت دردسترس نبودن این تجهیزات، همچنان از هماسیتومتر استفاده‌می‌شود. به‌علت احتمال وجود خطای زیاد در شمارش سلولی با این روش، به‌ویژه در گلبول‌های قرمز و پلاکت‌ها، توصیه‌می‌شود که کالیبراسیون این پارامترها به‌وسیلهٔ شرکت پشتیبان صورت‌گیرد.

1. Moving Average

مثال

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

$$\text{ضریب کالیبراسیون} = \frac{۱۴۰ - ۱۴۵}{۱۴۵} \times ۱۰۰ = -۳/۴۴$$

طبق محاسبهٔ بالا، ضریب کالیبراسیون دستگاه برای هموگلوبین باید به مقدار ۳/۴۴ کاهش‌یابد. به‌عنوان مثال، اگر ضریب کالیبراسیون دستگاه پیش از این ۱۰۰ بوده‌است، باید ۳/۴۴٪ کاهش‌یابد و روی ۹۶/۵۶ تنظیم‌شود.

در بعضی از انواع دستگاه‌های شمارنده مثل گروه سیسمکس، ضریب کالیبراسیون جدید با استفاده از فرمول کالیبراسیون که در دستورالعمل درج گردیده‌است، به‌ترتیب زیر محاسبه‌می‌شود:

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

نکته

کالیبراسیون دستگاه باید در موارد خاصی که در بالا به آنها اشاره‌شد و با استفاده از روش ذکرشده، صورت‌گیرد، درغیر این صورت، تغییر مکرر ضریب کالیبراسیون به دنبال مشاهدهٔ هرگونه اختلال در نتایج، به‌هیچ وجه توصیه‌نمی‌شود.

۳. کنترل کیفیت دستگاه‌های خودکار شمارندهٔ سلولی

آزمایشگاه برای کنترل کیفیت دستگاه‌های شمارندهٔ سلولی در بخش هماتولوژی باید دستورالعمل مکتوبی داشته‌باشد و سوابق انجام برنامه‌های کنترل کیفی نیز به‌نحو مقتضی نگهداری‌شود. توصیهٔ مراجع معتبر بین‌المللی برای انجام این امر، استفاده از خون کنترل است که بسیاری از آزمایشگاه‌های کشور به دلایل مختلف ازجمله دسترسی‌نداشتن به این نمونه، از روش‌های دیگری برای کنترل کیفیت دستگاه شمارنده استفاده‌می‌کنند. درهر صورت، هر آزمایشگاه ملزم به استفاده از روش‌های کنترل کیفی بوده که انواع خطاهای سیستماتیک و تصادفی را مشخص‌نماید.

در ادامهٔ این مبحث، علاوه‌بر نحوهٔ استفاده از خون کنترل، دربارهٔ روش‌های مختلف کنترل کیفیت که برای بررسی عملکرد دستگاه نیز کاربرد دارند، توضیح‌داده خواهدشد.

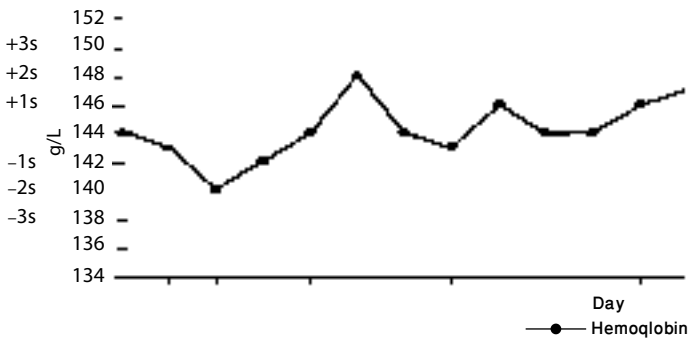
۳ـ۱ـ خون کنترل

طبق توصیه‌های منابع معتبر بین‌المللی خون‌شناسی، برای کنترل کیفیت دستگاه‌های شمارندهٔ سلولی، باید در هر سری کاری، دست‌کم از دو نمونه خون کنترل در دامنهٔ طبیعی و غیرطبیعی استفاده‌کرد. به‌این ترتیب، در ابتدای هر سری کاری، نمونهٔ کنترل طبیعی و غیرطبیعی و در پایان، نمونهٔ طبیعی با دستگاه شمارنده آزمایش و نتایج ثبت‌می‌شود. در ایران، دسترسی به خون کنترل در دامنه‌های مختلف برای تمام آزمایشگاه‌ها به‌راحتی امکان‌پذیر نیست؛ به‌همین دلیل، به‌طور معمول از خون کنترل در یک دامنه استفاده‌می‌شود.

نمونه خون کنترل هر روز صبح پیش از آزمایش نمونه‌های بیماران و درصورت نیاز، به فواصل در طی روز آزمایش و نتایج روی نمودار ثبت‌می‌شود. برای رسم نمودار، نمونهٔ کنترل باید به دفعات و در فواصل زمانی مختلف با دستگاه آزمایش‌شود تا دست‌کم برای هر پارامتر ۲۰ خوانده حاصل‌شود. پس از محاسبهٔ میانگین و انحراف معیارهای ۱SD±، ۲SD± و ۳SD± برای هر پارامتر، مقادیر آنها روی محور عمودی و روزها روی محور افقی ثبت‌می‌شود.

کنترل کیفیت دستگاه صرفاً با منطبق‌بودن نتایج خون کنترل با دامنهٔ ذکرشده در بروشور مربوطه قابل قبول نیست و همچنین استفاده از میانگین و دامنهٔ مندرج در بروشور برای رسم نمودار توصیه‌نمی‌شود. هر آزمایشگاه باید خود با استفاده از روش ذکرشده در بالا، نسبت به تعیین میانگین و دامنه برای رسم نمودار اقدام‌نماید.

در زیر نمودار کنترل کیفیت هموگلوبین، با میانگین ۱۴۴g/L و انحراف معیارهای ±۱SD، ±۲SD و ±۳SD به‌ترتیب ۲g/L، ۴ و ۶ مشاهده‌می‌شود. نقاط ثبت‌شده در نمودار نمایانگر میزان هموگلوبین خون کنترل در روزهای متوالی است. می‌توان نمودار کنترل کیفیت را با استفاده از قوانین لوی‌جنینگ[1]، وستگارد[2] یا سازمان جهانی بهداشت تفسیرکرد. هر آزمایشگاه می‌تواند براساس اهداف کیفیتی که برای نتایج آزمایش‌های خود درنظر دارد، از یکی از این قوانین استفاده‌کند. با استفاده از نمودار کنترل کیفیت می‌توان خطاهای تصادفی و سیستماتیک را درصورت بروز مشخص‌کرد.



تصویر شمارهٔ ۴: نمودار کنترل کیفی هموگلوبین

1. Levyjening
2. Westgard

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

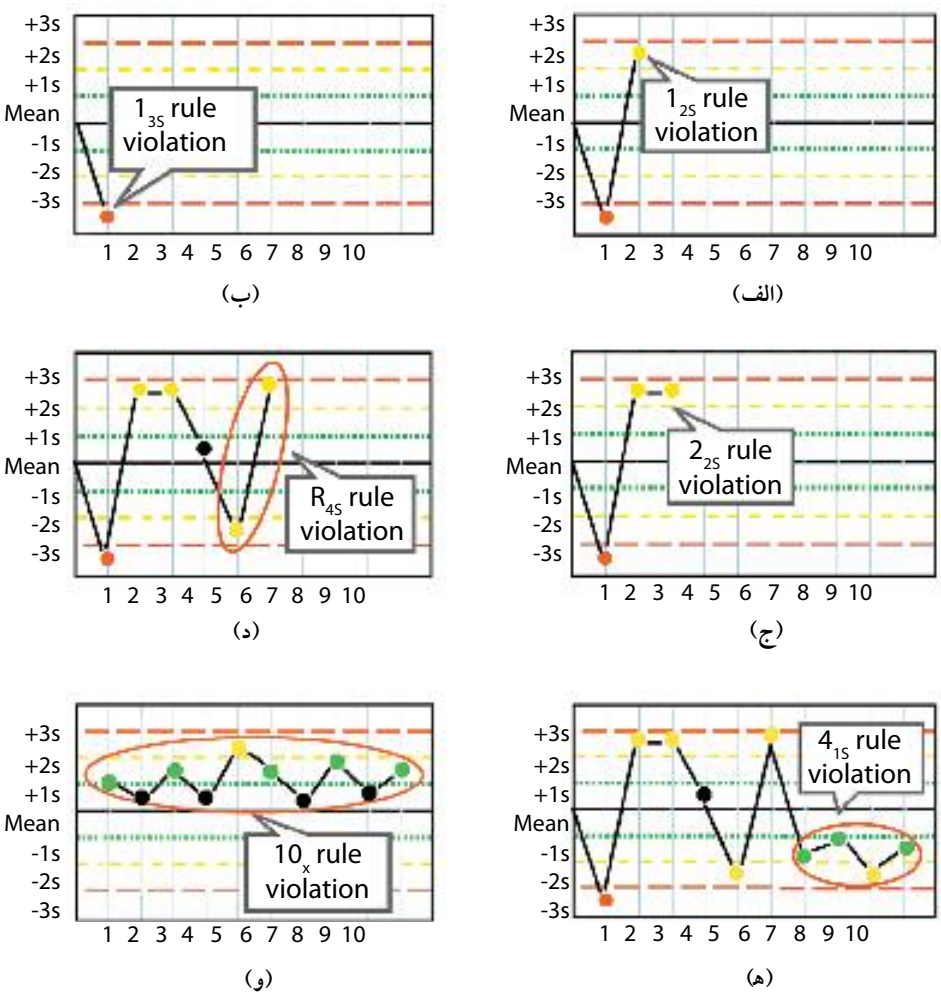
نتیجهٔ خون کنترل	تفسیر
یک کنترل خارج از محدودهٔ ۲SD±	هشدار، نشان‌دهندهٔ خطای تصادفی یا سیستماتیک
یک کنترل خارج از محدودهٔ ۳SD±	رد نتایج، نشان‌دهندهٔ خطای تصادفی یا سیستماتیک
دو خواندهٔ متوالی هم‌سو و خارج از محدودهٔ ۲SD±	رد نتایج، نشان‌دهندهٔ خطای سیستماتیک
چهار خواندهٔ متوالی و هم‌سو و خارج از محدودهٔ ۱SD+ یا ۱SD−	رد نتایج، نشان‌دهندهٔ خطای سیستماتیک
شش خواندهٔ متوالی در یک طرف میانگین	هشدار، نشان‌دهندهٔ خطای سیستماتیک

جدول شمارهٔ ۲: تفسیر نمودار کنترل کیفیت براساس قوانین وستگارد

نتایج خون کنترل	تفسیر
1_{2s} یک کنترل خارج از محدودهٔ ۲SD± (نمودار الف)	هشدار، لزوم بررسی سایر قوانین
1_{3s} یک کنترل خارج از محدودهٔ ۳SD± (نمودار ب)	رد نتایج، نشان‌دهندهٔ خطای تصادفی یا سیستماتیک
2_{2s} دو خواندهٔ متوالی و هم‌سو، خارج از محدودهٔ ۲SD± (نمودار ج)	رد نتایج، نشان‌دهندهٔ خطای سیستماتیک
R_{4s} یک خوانده خارج از محدودهٔ ۲SD+ و دیگری خارج از محدودهٔ ۲SD− (نمودار د)	رد نتایج، نشان‌دهندهٔ خطای تصادفی
4_{1s} چهار خواندهٔ متوالی و هم‌سو، خارج از محدودهٔ ۱SD+ یا ۱SD− (نمودار ه)	رد نتایج، نشان‌دهندهٔ خطای سیستماتیک
10_{x} ده خواندهٔ متوالی در یک طرف میانگین(بالا یا پایین میانگین و بدون توجه به اندازهٔ انحراف) (نمودار و)	رد نتایج، نشان‌دهندهٔ خطای سیستماتیک

نکته

قوانین چندگانهٔ وستگارد بین مجموعه‌های کاری مختلف و نیز بین دو غلظت نمونهٔ کنترلی قابل استفاده هستند.



تصویر شمارهٔ ۵: نمودارهای کنترل کیفی با قوانین وستگارد

نکته

درصورت یافتن هرگونه خطا با استفاده از نمودار، ابتدا، باید از آلوده یا خراب نبودن نمونهٔ کنترل اطمینان حاصل‌نمود. با مطمئن‌شدن از این امر پیش از برنامه‌ریزی برای کالیبراسیون دستگاه، باید اقدام‌های دیگری مانند شست‌وشوی دستگاه، آزمایش مجدد نمونه، آزمایش روی نمونهٔ خون کنترل دیگر با همان سری ساخت، بررسی وضعیت محلول‌های دستگاه و... را مدنظر قرارداد.

۳ـ۲ـ آزمون پایداری کالیبراسیون[1]

به‌منظور کامل‌شدن روند کنترل کیفیت دستگاه، علاوه بر استفاده از خون کنترل، می‌توان از نمونه‌های خون تازه استفاده‌کرد. با توجه به پایداری پارامترهایی نظیر WBC، RBC، Hb، HCT و اندکس‌های خونی در نمونهٔ خون حاوی ضدانعقاد، به‌مدت **۲۴** ساعت در دمای $4^{\circ}C$، می‌توان در روز اول حداقل **۵** و ترجیحاً **۱۰** نمونه که دارای مقادیر طبیعی هستند را پس از آزمایش در یخچال نگهداری‌کرد و روز بعد، مجدداً مورد آزمایش قرارداد و وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر نمونه‌های جفت را با استفاده از آزمون آماری پایداری کالیبراسیون محاسبه‌کرد.

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

n: تعداد جفت‌های مورد بررسی

d: اختلاف بین دو خوانده(روزبه‌روز)

SD: انحراف معیار اختلافات

$\bar{d}$: میانگین اختلافات

مقدار t باید برای هر متغیر محاسبه‌شود. اگر مقدار آن برای **۵** نمونه از **۲/۷۸** و برای **۱۰** نمونه از **۲/۲۶** بیشتر باشد، با اطمینان **۹۵**٪ می‌توان گفت که بین مقادیر شمارش‌شده در دو روز، اختلاف معنی‌دار وجوددارد. وجود اختلاف معنی‌دار برای یک متغیر، بیان‌کنندهٔ اشکال احتمالی است که درصورت تداوم، برای رفع آن باید اقدام مناسب صورت‌گیرد.

1. T-Brittin

مثال

درصورتی که نتایج اندازه‌گیری هموگلوبین ۵ نمونهٔ خون با استفاده از یک دستگاه شمارندهٔ سلولی در دو روز متوالی مطابق جدول زیر باشد، عملکرد دستگاه با کمک فرمول پایداری کالیبراسیون به‌صورت زیر بررسی‌می‌شود.

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

$\sum d = ۱۵$

$(\sum d)^2 = ۲۲۵$

$\sum d^2 = ۵۵$

$$\bar{d} = \frac{\sum d}{۵} = \frac{۱۵}{۵} = ۳$$

$$SD = \sqrt{\frac{۵۵ - \frac{۲۲۵}{۵}}{۴}} = ۲/۵$$

$$tn = \frac{۳\sqrt{۵}}{۲/۵} = ۲/۶۷$$

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

۳ـ۳ـ آزمایش دوتایی[1]

درصورت نبود امکان انجام تمام آزمایش‌ها به‌صورت دوتایی، باید در هر سری کاری، حداقل ۲ تا ۳ نمونه به‌صورت دوتایی آزمایش‌شوند تا با بررسی اختلاف خوانده‌ها ازطریق محاسبات آماری، از وجود خطاهای تصادفی آگاه‌شد. افزایش اختلاف بین دو خوانده بیش از ۲SD محاسبه‌شده، احتمال وجود خطای تصادفی را مطرح‌می‌کند. فرمول زیر طریقهٔ محاسبهٔ SD نمونه‌های دوتایی را نشان‌می‌دهد:

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

مثال

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

مقدار هموگلوبین (g/L)	مقدار هموگلوبین (g/L)	d	d^2
۱۲۰	۱۲۲	−۲	۴
۱۶۱	۱۶۳	−۲	۴
۱۱۰	۱۰۰	۱۰	۱۰۰
۱۴۰	۱۴۰	۰	۰
۱۳۴	۱۳۲	۲	۴
			۱۱۲

$$SD = \sqrt{\frac{\sum d^2}{2n}} = \sqrt{\frac{۱۱۲}{۱۰}} = ۳/۳۴$$

$$SD = ۶/۷$$

تفاوت بیشتر از ۲SD بین دو نتیجهٔ آزمایش در نمونهٔ سوم(d = ۱۰)، نمایانگر بروز خطای تصادفی و لزوم تکرار آزمایش روی همان نمونه است.

1. Duplicate Test

۳ـ۴ـ آزمایش بازبینی[1]

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

نکته

بهتر است نمونه‌هایی که برای آزمایش بازبینی و دوتایی آزمایش‌می‌شوند، یکسان باشند.

مثال

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

مقدار هموگلوبین صبح(g/L)	مقدار هموگلوبین بعد از ظهر(g/L)	d	d^2
۱۲۰	۱۲۱	−۱	۱
۱۶۱	۱۵۹	۲	۴
۱۱۰	۱۱۲	−۲	۴
۱۴۰	۱۴۰	۰	۰
۱۳۴	۱۳۵	−۱	۱
			۱۰

1. Check Test

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

$$2SD = 2$$

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

۳ـ۵ـ آزمایش دلتا[1]

مقایسهٔ مقادیر به‌دست آمده از یک نمونه با نتایج قبلی نمونهٔ همان فرد به‌عنوان روشی برای کنترل کیفیت به‌کار می‌رود؛ با درنظر گرفتن این نکته که فاصلهٔ زمان بین دو آزمایش بیش از دو تا سه هفته نباشد. درصورت استفاده از این روش، باید به نکاتی نظیر تغییرات فیزیولوژیک طبیعی و روزانهٔ پارامترهای خونی و همچنین، مواردی نظیر ابتلای فرد به بیماری و یا استفاده از دارو به دلایل مختلف که باعث تغییر شمارش سلول‌ها می‌شوند، توجه داشت. با توجه به تغییرات روزانهٔ طبیعی پارامترهای خونی در یک فرد، تنها وجود اختلافات واضح بین مقادیر به‌دست آمده، نشان‌دهندهٔ بروز خطا است.

پارامتر مورد نظر	تفاوت بین دو نتیجه که می‌تواند نمایانگر خطا باشد
Hb	2g/dL
PCV	۰/۰۵ L/L
MCV	> 6fL
MCH	> 5pg
WBC	از تعداد طبیعی به غیرطبیعی
Platelets	افزایش یا کاهش تعداد، بیش از ٪۵۰

1. Delta Test

۳ـ۶ـ استفاده از نتایج بیماران

به‌دلیل ثابت‌بودن مقادیر میانگین شاخص‌های گلبولی(MCV، MCH و MCHC) در فواصل روزها و هفته‌ها، می‌توان از این شاخص‌ها به‌منظور ارزیابی کیفیت عملکرد دستگاه شمارنده در آزمایشگاه‌هایی که حداقل روزی ۱۰۰ نمونه CBC پذیرش می‌کنند، استفاده‌نمود. بررسی‌ها نشان‌می‌دهند، درصورتی که نمونه‌های CBC مورد آزمایش در روزهای مختلف ازنظر میزان اندکس‌های خونی تفاوت مشخصی با یکدیگر نداشته‌باشند که به تأثیر بارز بر میانگین‌ها منجرشود، مانند پذیرش نمونه‌های افراد مبتلا به فقر آهن یا تالاسمی در یک روز خاص در هفته که باعث کاهش شاخص‌های گلبولی می‌شوند، هرگونه تغییر مشخص در میانگین اندکس‌ها نشان‌دهندهٔ تغییر در کالیبراسیون یا اختلال عملکرد دستگاه است. برای استفاده از این روش، ابتدا باید میانگین و ۲SD± اندکس‌های MCV، MCH و MCHC حداقل ۳۰۰ تا ۵۰۰ نمونه را محاسبه و سپس، نمودار کنترل کیفیت را رسم‌نمود.

در صورت مراجعهٔ بیمارانی که اندکس‌های خونی طبیعی ندارند، مانند مبتلایان به بیماری‌های ذکرشده، نتایج اندکس‌های گلبولی آنها نباید در محاسبهٔ میانگین لحاظ‌شود. پس از رسم نمودار، نمونه‌های بیماران را روزانه به گروه‌های بیست‌تایی تقسیم‌کرده و پس از محاسبهٔ میانگین شاخص‌های گلبولی آنها و ثبت این میانگین روی نمودار، هرگونه انحراف از مقادیر مجاز را می‌توان نمایانگر عملکرد نامناسب دستگاه دانست. برای اطمینان از درست‌بودن این روش، انتخاب گروه‌های بیست‌تایی نمونه‌ها، باید به‌صورت تصادفی باشد و در هر دسته نیز بیش از ۷ نمونه دارای شرایط بالینی یکسان نباشند. این روش کنترل کیفی به‌صورت برنامه‌های نرم‌افزاری روی بعضی دستگاه‌ها نصب شده‌است.

۳ـ۷ـ بررسی عدم دقت(CV)

این بررسی به دو شکل انجام‌پذیر است. درصورت استفاده از خون کنترل، می‌توان با استفاده از نتایج نمونهٔ کنترل که طی روزهای متوالی با دستگاه آزمایش‌شده، عدم دقت هر پارامتر را محاسبه‌کرد و درصورت دسترسی نداشتن به خون کنترل، باید از نمونه‌های روزانه برای این امر استفاده‌کرد. به‌این ترتیب، هر ماه دو نمونه یا بیشتر را حداقل ۱۰ بار به‌صورت متوالی با دستگاه آزمایش کرده و از نتایج به‌دست آمده، عدم دقت هر پارامتر

را محاسبه‌کرد. توصیه‌می‌شود که عدم دقت دستگاه به‌ویژه هنگام نصب و راه‌اندازی، با استفاده از نمونه‌هایی با دامنه‌های طبیعی و غیرطبیعی بررسی‌شود. برای تهیهٔ نمونهٔ غیرطبیعی پایین، می‌توان از نمونهٔ رقیق‌شده استفاده‌کرد، به‌این ترتیب که پلاسمای نمونه را جداکرده و سپس حجمی از نمونه را با این پلاسمای به‌دست آمده مخلوط‌کرد. نمونهٔ خون با دامنهٔ غیرطبیعی بالا را نیز می‌توان با غلیظ‌کردن نمونه تهیه‌نمود. برای این کار باید ظرف نمونه را به‌مدت ۲ ساعت با زاویهٔ ۴۵° نگهداری‌کرد و سپس با برداشتن نیمی از پلاسمای ایجادشده و مخلوط‌کردن کامل، از آن به‌عنوان نمونهٔ غیرطبیعی بالا استفاده‌نمود. درصورت مطابقت نداشتن عدم دقت هر پارامتر با ادعای سازنده که در بروشور درج شده‌است، ضروری است با شرکت پشتیبان تماس گرفته‌شود.

مثال

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

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

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x-\bar{x})^2}{n-۱}} \qquad CV\% = \frac{SD \times ۱۰۰}{\bar{x}}$$

$$SD = \sqrt{\frac{۰/۲۰۱}{۹}} = ۰/۱۴۸ \qquad CV\% = \frac{۰/۱۴۸ \times ۱۰۰}{۷/۶۳} \qquad CV\% = ٪۱/۹$$

۳ـ۸ـ بررسی صحت

روش‌های ذکرشده جزئی از برنامه‌های کنترل داخلی کیفیت هستند و به‌منظور بررسی تکرارپذیری مناسب آزمایش‌ها انجام‌می‌شوند، ولی تکرارپذیری مناسب همواره نشان‌دهندهٔ صحت نتایج نیست. برای ارزیابی صحت عملکرد تجهیزات و روش‌های آزمایش، باید از روش‌های دیگری نظیر استفاده از استاندارد، کالیبراتور و یا شرکت در برنامه‌های کنترل خارجی کیفیت استفاده‌کرد. هدف برنامهٔ کنترل خارجی کیفیت، ایجاد هماهنگی بین نتایج آزمایشگاه‌ها است.

در این برنامه، نمونه‌های مجهول از مرکز اجرای برنامه به آزمایشگاه‌های شرکت‌کننده فرستاده‌می‌شود. آزمایشگاه‌ها پس از انجام آزمایش‌های لازم روی نمونه‌ها، نتایج را جهت پردازش به مرکز اجرای برنامه ارسال‌می‌نمایند. نتایج در مرکز ذکرشده به روش‌های مختلف بررسی‌می‌شود که یکی از آنها مقایسهٔ نتایج هر آزمایشگاه با میانگین نتایج کل آزمایشگاه‌ها است که نتیجهٔ آن به‌صورت(DI)[1] به اطلاع آزمایشگاه رسانده‌می‌شود.

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

$\bar{x}$: میانگین گروه

x: نتیجهٔ هر آزمایشگاه

SD: انحراف معیار مجاز هر پارامتر

نحوهٔ تفسیر:

DI < ۱ = نتیجهٔ مناسب

DI ۱-۲ = قابل قبول اما بینابینی

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

DI < ۳ = نیاز به اقدام فوری

۳ـ۹ـ تطابق نتایج دستگاه با یافته‌های میکروسکوپی یا بالینی

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

1. Deviation Index

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

نکته

اگر چه مقایسهٔ روش دستی(مرجع) و دستگاهی در مراجع معتبر روش روزمره برای کنترل کیفیت عنوان نشده‌است، ولی در بسیاری از آزمایشگاه‌های کشور از این روش به‌عنوان یکی از راه‌های کنترل کیفیت استفاده‌می‌شود. درصورت استفاده از این روش، توجه به نکته‌های زیر الزامی است:

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

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

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

$$\text{Standard error of difference in mean (SEdiff)} = \frac{\sqrt{SD^2}}{n}$$

$$t = \frac{\bar{d}}{SEdiff}$$

n: تعداد نمونه‌ها
d: اختلاف نتایج روش دستی و دستگاهی برای هر نمونه
$\bar{d}$: میانگین اختلاف نتایج
SD^2: واریانس[1] اختلاف بین نتایج
SE diff: تفاوت استاندارد میانگین دو گروه داده

مقادیر مجاز t با توجه به ضرایب اطمینان مختلف در جدول t test درج شده‌است. با استفاده از این جدول براساس تعداد نمونه‌ها(n) و درجهٔ آزادی(n−۱) و درنظر داشتن ضریب اطمینان ۹۵٪، می‌توان عدد t مجاز را مشخص‌کرد.

1. Variance

جدول شمارهٔ ۳: جدول مقادیر t براساس ضرایب اطمینان مختلف

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

مثال

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

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

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

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

براساس جدول t با توجه به تعداد نمونه‌های مورد آزمایش(۳ نمونه) و درجهٔ آزادی ۲(n–۱)، مقدار t مورد قبول بـا ضریب اطمینان ۹۵٪ برابر ۴/۳ است. کمتربـودن مقدار t محاسبه‌شده در این آزمایش(۰/۱۵) از مقدار t مجاز(۴/۳) نشان‌دهندهٔ هم‌خوانی و قابل قبول بودن نتایج است.

۴. خطاهای دستگاه‌های خودکار شمارندهٔ سلولی

اگرچه استفاده از دستگاه‌های شمارندهٔ سلولی در آزمایشگاه‌ها در مقایسه با روش‌های دستی، تکرارپذیری یا دقت نتایج حاصل را به میزان قابل توجهی بهبود بخشیده است، ولی صحت نتایج حاصل ممکن‌است به دلایل گوناگون همواره قابل اطمینان نباشد. بنابراین، کاربر دستگاه علاوه‌بر آشنایی با نحوهٔ کار، نگهداری، کالیبراسیون و کنترل کیفی دستگاه، باید از تمام عللی که منجر به خطا در شمارش یا اندازه‌گیری پارامترهای خونی توسط دستگاه شمارنده می‌شود، نیز آگاه باشد.

گروهی از این خطاها ناشی از نحوهٔ طراحی دستگاه‌ها برای شمارش سلول‌ها است، مثلاً عبور هم‌زمان دو سلول از بین دو الکترود که به ایجاد یک پالس و در نتیجه، شمارش یک سلول به جای دو سلول منجرمی‌شود یا سلول‌هایی که پس از عبور از بین دو الکترود و شمارش، دوباره به گردش بین الکترودها وارد و مجدداً شمارش می‌شوند. در شرایطی نیز که بنا به دلایل مختلف آگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز رخ‌می‌دهد، گلبول‌های به‌هم چسبیده در دستگاه به‌عنوان یک سلول بزرگ شمارش می‌شوند. شمارش حباب‌های هوا، قطرات چربی، میکروارگانیسم‌ها یا ذرات خارجی به‌عنوان یک سلول نیز از موارد دیگر خطا در دستگاه‌ها هستند.

در زیر به موارد دیگری که ممکن‌است بالقوه موجب اختلال در شمارش دستگاه شوند، اشاره‌می‌شود:

۱. افزایش شمارش گلبول‌های سفید بیش از $۳۰ \times ۱۰^۹/L$ معمولاً به‌دلیل ایجاد کدورت باعث افزایش کاذب، ولی جزئی در هموگلوبین و همچنین، افزایش کاذب هماتوکریت و MCV می‌شود.

۲. افزایش غلظت گلوکز(بیش از ۴۰۰mg/dL) و افزایش اسمولالیتهٔ خون ناشی از سایر علل ممکن‌است سبب افزایش کاذب MCV و هماتوکریت و کاهش MCHC شود. برای رفع این خطا خون باید پیش از انجام آزمایش ده دقیقه با ایزوتون انکوبه‌شود.

۳. آگلوتینین‌های سرد با تیترهای بالا، به‌طور کاذب باعث کاهش شمارش گلبول‌های قرمز و افزایش MCV و MCHC می‌شوند که با گرم‌کردن خون یا محلول رقیق‌کننده این مشکل حل‌می‌شود.

۴. در بعضی از انواع لوسمی‌ها که گلبول‌های سفید شکننده هستند، شمارش آنها به‌طور کاذب کاهش نشان‌می‌دهد که در این موارد، شمارش با هماسیتومتر کمک‌کننده است.

۵. سطوح بسیار بالای چربی باعث کدرشدن پلاسما و درنتیجه افزایش کاذب مقدار هموگلوبین، MCH و MCHC می‌شود. برای حل این مشکل، اندازه‌گیری هموگلوبین باید

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

در جدول‌های شمارهٔ ۴ تا ۱۰، به موارد بیشتری اشاره‌می‌شود که ممکن‌است بـه نادرست‌بودن نتایج دستگاه‌های شمارندهٔ سلولی خودکار منجرشوند. کاربر دستگاه علاوه‌بر آشنایی با موارد مندرج در این جدول‌ها باید از نحوهٔ رفع این خطاها نیز آگاه باشد.

جدول شمارهٔ ۴: برخی از دلایل خطا در شمارش‌های سلولی دستگاه‌های خودکار شمارندهٔ سلولی

خطا در جمع‌آوری یا ذخیرهٔ نمونه	۱. نمونه‌گیری از بیمار دیگر ۲. نمونهٔ خون با برگهٔ درخواست بیمار دیگر ۳. رقیق‌بودن نمونه ۴. استفاده از EDTA بسیار غلیظ ۵. غلیظ‌بودن نمونه به‌علت استفادهٔ طولانی‌مدت از تورنیکه ۶. لخته‌شدن قسمتی از نمونه ۷. همولیز نمونه ۸. بیش از حد گرم یا منجمدکردن نمونه ۹. نمونهٔ خون کهنه ۱۰. نمونهٔ آلوده به چربی زیر جلد
خطا در برداشت نمونه توسط دستگاه	۱. خطا در شست‌وشو و آماده‌سازی دستگاه ۲. مخلوط‌کردن ناکافی نمونه ۳. انسداد مسیر پروب دستگاه(به‌طور مثال، توسط لخته که از نمونهٔ قبلی به‌جای مانده‌است) ۴. تداخل نمونهٔ بسیار غیرطبیعی قبلی با نمونهٔ فعلی(این مورد در دستگاه‌های جدید به حداقل رسیده‌است)
خطا در کالیبراسیون	استفاده از مواد کنترل به‌عنوان کالیبراتور یا خطا در تعیین دقیق مقادیر پارامترها برای روش کالیبراسیون
نگهداری نامناسب دستگاه، اختلال در عملکرد دستگاه به دلایل مختلف و اشکال در معرف‌ها	
عدم صحت اندازه‌گیری دستگاه‌ها به‌دلیل ماهیت برخی روش‌های اندازه‌گیری که برای دستگاه طراحی‌شده	۱. تعیین میزانMCV کمتر از مقدار واقعی درصورت وجود گلبول‌های قرمز هیپوکروم در دستگاه‌های امپدانس ۲. ناتوانی شناسایی سلول‌ها درصورت کمبود آنزیم پراکسیداز
عدم صحت عملکرد دستگاه به دنبال وجود ویژگی‌های خاص در نمونه	۱. خطا در تعیین میزان هموگلوبین و اندکس‌های گلبولی به‌دلیل وجود آگلوتینین‌های سرد یا افزایش چربی خون ۲. نوتروپنی کاذب درصورت کمبود آنزیم پراکسیداز

جدول شمارهٔ ۵: برخی از دلایل افزایش کاذب هموگلوبین

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

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

افزایش کاذب MCH	۱. افزایش کاذب هموگلوبین ۲. کاهش کاذب تعداد گلبول‌های قرمز ۳. همولیز داخل عروقی با هموگلوبین آزاد در پلاسما
افزایش کاذب MCHC **یا مشخص‌نشدن کاهش واقعی** MCHC	۱. افزایش کاذب هموگلوبین ۲. همولیز داخل عروقی با هموگلوبین آزاد در پلاسما یا لیز گلبول‌های قرمز خارج بدن ۳. کاهش کاذب هماتوکریت، MCV یا گلبول‌های قرمز ۴. شرایط هیپواسمولار
کاهش کاذب MCHC	۱. افزایش کاذبMCV(غیر از مواردی که علت آن آگلوتینین‌های سرد باشد) ۲. افزایش کاذب تعداد گلبول‌های قرمز به‌دلیل وجود تعداد زیاد پلاکت‌های ژانت ۳. شرایط هیپراسمولار

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

افزایش کاذب تعداد گلبول‌های قرمز	۱. وجود پلاکت‌های درشت به تعداد زیاد ۲. افزایش چربی خون(ناپایدار) ۳. کرایوگلوبولینمی ۴. کرایوفیبرینوژنمی
کاهش کاذب تعداد گلبول‌های قرمز	۱. پان‌آگلوتیناسیون ناشی از ایجاد آگلوتینین‌های سرد وابسته به EDTA ۲. لیز گلبول‌های قرمز خارج از بدن به دنبال نگهداری نامناسب نمونه یا وجود گلبول‌های قرمز غیرطبیعی ۳. میکروسیتوز بسیار شدید یا تکه‌تکه‌شدن گلبول‌های قرمز در بعضی بیماری‌ها
افزایش کاذب MCV	۱. نگهداری خون در دمای اتاق ۲. آگلوتینین‌های سرد و آگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز وابسته به EDTA ۳. تعداد زیاد گلبول‌های سفید ۴. شرایط هیپراسمولار ۵. K_2EDTA اضافی
کاهش کاذب MCV	۱. گلبول‌های قرمز هیپوکرومیک ۲. افزایش دمای اتاق ۳. شرایط هیپواسمولار ۴. مخلوط‌کردن مکرر نمونه که باعث افزایش اکسیژناسیون گلبول‌های قرمز می‌شود
افزایش کاذب هماتوکریت	۱. افزایش کاذب MCV(غیر از مواقعی که به دنبال آگلوتینین‌های سرد رخ‌می‌دهد) ۲. کاهش کاذب تعداد گلبول‌های قرمز
کاهش کاذب هماتوکریت	۱. کاهش کاذب میزان MCV ۲. کاهش کاذب گلبول‌های قرمز به‌دلیل میکروسیتوز بسیار شدید یا لیز گلبول‌های قرمز خارج بدن ۳. آگلوتینین سرد ۴. مخلوط‌کردن مکرر نمونه که باعث افزایش اکسیژناسیون گلبول‌های قرمز می‌شود

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

پایین‌بودن کاذب شمارش پلاکت‌ها	۱. لخته‌شدن نسبی نمونه ۲. فعال‌شدن پلاکت‌ها در حین خون‌گیری و تجمع آنها ۳. تجمع پلاکتی ایجادشده توسط EDTA ۴. Platelet Satellitism ۵. پلاکت‌های ژانت که اندازهٔ آنها از آستانهٔ تعیین‌شده برای پلاکت‌ها بیشتر باشد
بالابودن کاذب شمارش پلاکت‌ها	۱. گلبول‌های قرمز میکروسیت یا تکه‌تکه‌شده ۲. گلبول‌های سفید خردشده ۳. بیماری هموگلوبین H ۴. کرایوگلوبولین ۵. هیپرتری‌گلیسریدمی یا هیپرلیپیدمی ۶. وجود میکروارگانیسم‌ها در نمونهٔ خون ۷. گرم‌کردن ناخواستهٔ خون

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

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

جدول شمارهٔ۱۰: برخی از دلایل افزایش کاذب تعداد گلبول‌های سفید

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

فصل سوم

روش‌های مرجع انجام آزمایش‌ها

۱. اندازه‌گیری هموگلوبین خون به روش سیان‌مت‌هموگلوبین

روش شیمیایی اندازه‌گیری هموگلوبین در خون با روش سیان‌مت‌هموگلوبین، روش دستی اندازه‌گیری مرجع هموگلوبین است که برای کالیبراسیون دستگاه‌های شمارنده نیز کاربرد دارد.

نکته‌های مهمی که هنگام انجام این آزمایش برای دستیابی به نتایج صحیح باید در نظر گرفته‌شوند:

- از ظرف‌های شیشه‌ای استفاده‌شود که ازنظر صحت در حد استاندارد(کلاس A) و از لحاظ شیمیایی تمیز باشند.
- از دقت و صحت عملکرد سمپلرها، اسپکتروفتومتر و یا فتومتر با استفاده از برنامه‌های کنترل کیفیت اطمینان حاصل‌شود(تمام مستندات کنترل کیفیت ثبت‌شود).
- درصورت امکان، از درابکین با ترکیب توصیه‌شدهٔ CLSI(مؤسسهٔ استاندارد آزمایشگاه بالینی)، که مقادیر لازم برای تهیهٔ آن در زیر آمده‌است، استفاده‌شود.

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

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

- محلول درابکین را باید در ظرف‌های تیرهٔ دربسته از جنس بوروسیلیکات نگهداری‌نمود و درصورت مشاهدهٔ کدری دور ریخت.
- هنگام استفاده از این محلول‌ها و دفع آنها، به‌علت سمی‌بودن، احتیاط‌های لازم باید ازنظر ایمنی به‌کار رود.

- از درابکین با ترکیب‌های دیگر(غیر از فرمول بالا) نیز می‌توان استفاده‌نمود، ولی زمان کامل‌شدن واکنش طولانی‌تر و احتمال ایجاد کدری بیشتر است.
- برای انجام آزمایش می‌توان از نمونهٔ خون مویرگی یا وریدی استفاده‌نمود، ولی استفاده از خون وریدی برتری دارد.
- ضدانعقاد مناسب، نمک‌های EDTA(دی‌سدیک یا دی‌پتاسیک) هستند که به مقدار ۱/۵ – ۲/۲mg/mL به‌ازای هر میلی‌لیترخون باید استفاده‌شوند.
- پس از خون‌گیری، باید نمونه را بلافاصله با ضدانعقاد مخلوط‌نمود.
- درصورت استفاده از K_3EDTA، به‌دلیل ایجاد رقت در نمونه، میزان هموگلوبین تا ۱٪ کاهش نشان‌می‌دهد.

روش آزمایش

- در روش معمول اندازه‌گیری هموگلوبین به روش دستی، ۰/۰۲mL خون با ۵mL درابکین مخلوط و پس از طی مدت لازم برای کامل‌شدن واکنش، جذب نوری آن با فتومتر خوانده‌می‌شود.
- برای انجام آزمایش به‌منظور کالیبراسیون دستگاه شمارنده، از روش رقت زیاد[1] استفاده‌می‌شود تا احتمال خطای ناشی از رقیق‌سازی کاهش‌یابد. برای اجرای این کار، می‌توان از روش‌های رقیق‌سازی زیر استفاده‌کرد:
  - ۰/۰۴mL خون با ۱۰mL درابکین یا
  - ۰/۴mL یا ۰/۵mL خون با ۱۰۰mL درابکین یا
  - ۰/۱mL خون با ۲۵mL درابکین.

نکته

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

در هر دو روش معمولی و با رقت زیاد، ابتدا نمونهٔ خون توسط پیپت یا سمپلر با سرعت آهسته و ثابت کشیده‌می‌شود و پس از پاک‌کردن سطح خارجی پیپت یا سرسمپلر با پارچهٔ بدون پرز، که

1. Macro Dilution

با آب مقطر یا نرمال سالین مرطوب‌شده، داخل لولهٔ آزمایش تخلیه‌می‌شود. نمونهٔ باقی‌مانده در پیپت یا سرسمپلر، باید با ۸ تا ۱۰ بار برداشت و تخلیه، با محتویات لوله کاملاً شسته‌شود. برای مخلوط‌شدن کامل خون و درابکین، پس از ۵ تا ۶ بار سروته‌نمودن لوله، باید محلول را برای کامل‌شدن واکنش پیش از خواندن جذب نوری، ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری‌نمود.

به‌منظور خواندن جذب نوری از فتومتر یا اسپکتروفتومتر با طول موج ۵۴۰nm استفاده‌می‌شود. درصورت استفاده از استاندارد هموگلوبین، جذب نوری این محلول نیز در طول موج ذکرشده خوانده‌شده و مقدار هموگلوبین برحسب گرم در لیتر از فرمول زیر محاسبه‌می‌شود:

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

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

منابع خطا

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

- عملکرد نامناسب اسپکتروفتومتر ناشی از کافی‌نبودن زمان گرم‌شدن دستگاه یـا بیش از حد گرم‌شدن دستگاه، اختلالات مربوط به منبع نوری، فتوسل، ولتاژ، خطی‌نبودن دستگاه، صحیح قرارنگرفتن کووت و یا استفاده از کووت کثیف یا خش‌دار.

۲. روش اندازه‌گیری حجم سلول‌های متراکم‌شده به روش میکروهماتوکریت

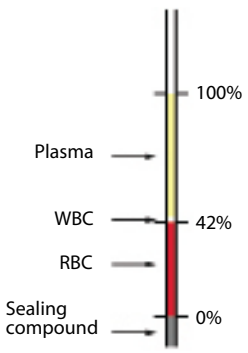
PCV نسبت حجم گلبول‌های قرمز متراکم‌شده به حجم خون کامل است. این نسبت پس از سانتریفوژ مناسب نمونهٔ خون به‌دست آمده و ترجیحاً به‌صورت اعشاری گزارش‌می‌شود (مانند ۰/۴۲ به‌جای ۴۲٪). روش مرجع اندازه‌گیری حجم سلول‌های متراکم‌شده، روش میکروهماتوکریت است که برای کالیبراسیون دستگاه‌های شمارنده نیز استفاده‌می‌شود.

نکته‌های مهم در آزمایش اندازه‌گیری حجم گلبول‌های قرمز متراکم‌شده

- انجام آزمایش با استفاده از خون مویرگی، شریانی و وریدی امکان‌پذیر است.
- در جمع‌آوری نمونه به طریق مویرگی، از لوله‌های هپارینه حاوی حداکثر ۷ واحد هپارین به‌ازای هر لولهٔ مویینه استفاده‌می‌شود.
- می‌توان نمونه را پس از جمع‌آوری در دمای اتاق نگهداری و حداکثر در مدت ۶ ساعت پس از نمونه‌گیری آزمایش‌نمود.
- نمونه‌ها باید به روش دوتایی آزمایش‌شوند. مقدار هماتوکریت نمونه‌های دوتایی نباید بیش از ۰/۰۰۵(۰/۵٪) با یکدیگر اختلاف داشته‌باشند.
- درصورت انجام این آزمایش، به‌منظور کالیبراسیون دستگاه شمارنده فقط باید از ضدانعقاد K_2EDTA استفاده‌شود تا از چروکیدگی گلبول‌های قرمز جلوگیری‌شود. استفاده از ضدانعقاد K_3EDTA به‌علت ایجاد چروکیدگی در گلبول‌های قرمز میزان MCV را ۲٪ کاهش‌می‌دهد. درصورت استفاده از ضدانعقاد مایع، ضریب رقت باید محاسبه‌شود.
- توصیه‌می‌شود برای انجام آزمایش کالیبراسیون دستگاه شمارنده از لوله‌های مویینه با حلقهٔ آبی(بدون ضدانعقاد) استفاده‌شود.
- هنگام خواندن نتیجه با خط‌کش مخصوص، مقدار بافی‌کوت درنظر گرفته‌نشود.
- خطای قابل قبول اندازه‌گیری حجم سلول‌های متراکم‌شده به روش میکروهماتوکریت ±۱٪ است.

روش آزمایش

۲/۳ تا ۳/۴ طول لولهٔ میکروهماتوکریت باید از خون کامل، که پیش از آن حداقل ۸ بار سروته شده‌است، پر و با خمیر مخصوص مسدودشود. طول خمیر نباید از ۴mm کمتر و سطح آن نیز باید کاملاً صاف باشد. از هر نمونهٔ خون باید دو لوله به این روش پرشده و روبه‌روی هم در دستگاه میکروهماتوکریت قرارگیرد. با تنظیم زمان‌سنج دستگاه سانتریفوژ نمونه‌ها انجام‌شده و پس از طی مدت تعیین‌شده نتیجهٔ آزمایش حداکثر ۱۰ دقیقه پس از توقف دستگاه و با استفاده از خط‌کش هماتوکریت خوانده‌می‌شود. با گذشت زمان و باقی‌ماندن لوله‌ها به‌صورت افقی، حد فاصل پلاسما و سلول به‌تدریج شیب‌دار و خواندن نتیجه با مشکل مواجه‌می‌شود.



تصویر شمارهٔ ۶: نمای شماتیک از نمونهٔ هماتوکریت پس از سانتریفوژ

منابع خطا

- توقف جریان خون[1] به‌علت بستن طولانی تورنیکه که باعث افزایش غلظت خون می‌شود؛
- خون‌گیری‌های سخت و طولانی به‌دلیل ورود مایع بین‌بافتی به فضای داخل عروقی که باعث رقیق یا لخته‌شدن خون‌می‌شود؛
- همولیز در اثر استفاده از سرسوزن نازک؛
- مخلوط‌نشدن نمونه با ضدانعقاد؛
- پر یا مسدودکردن نادرست انتهای لولهٔ هماتوکریت؛
- مسدودکردن انتهای لوله با حرارت؛
- خطای دید هنگام خواندن نتیجهٔ آزمایش؛

1. Stasis

- محاسبهٔ بافی‌کوت به‌عنوان جزیی از ستون گلبول‌های قرمز هنگام خواندن نتیجهٔ آزمایش؛
- خطای به‌دام افتادن پلاسما[1] که این مورد در آنمی‌های ماکروسیتیک کم و در اسفروسیتوز، تالاسمی و آنمی سیکل سل زیاد است. در حالت طبیعی، میزان پلاسمای به‌دام افتاده ۱٪ تا ۳٪ است که هنگام کالیبراسیون دستگاه شمارنده باید ۲٪ درنظر گرفته‌شود.

جدول شمارهٔ ۱۱: علل کاهش و افزایش کاذب هماتوکریت

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

ویژگی‌های دستگاه میکروهماتوکریت استاندارد

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

$$RCF = ۱/۱۱۸ \times ۱۰^{-۵} \times r \times RPM^2$$

RCF[2]: میدان نسبی سانتریفوژ

RPM[3]: دور در دقیقه

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

کنترل کیفیت و بررسی کالیبراسیون دستگاه میکروهماتوکریت

دستگاه میکروهماتوکریت باید توانایی ایجاد حداقل نیرویی برابر با ۱۰۰۰۰g به‌مدت ۵ دقیقه را دارا باشد.

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

- سرعت سانتریفوژ،
- زمان‌سنج،
- حداکثر توان در تجمع سلول‌ها[1].

سرعت سانتریفوژ(دور در دقیقه) و عملکرد زمان‌سنج دستگاه به‌ترتیب با تاکومتر کالیبره و کرونومتر ارزیابی‌می‌شوند.

برای بررسی حداکثر توان دستگاه در تجمع سلول‌ها از خون تازه استفاده‌می‌شود. برای انجام این امر دو نمونه خون تازه حاوی ضدانعقاد EDTA دی‌پتاسیک که به‌خوبی مخلوط‌شده‌اند را به‌صورت دوتایی به مدت دو دقیقه سانتریفوژکرده و مقادیر PCV آنها ثبت‌می‌شود. سپس، زمان سانتریفوژ را ۳۰ ثانیه به ۳۰ ثانیه افزوده تا زمانی که میزان دو هماتوکریت اندازه‌گیری‌شدهٔ پی‌درپی بدون تغییربماند. این زمان به‌عنوان حداقل زمان لازم برای متراکم‌نمودن گلبول‌های قرمز درنظر گرفته‌می‌شود. این آزمایش بهتر است حداقل با یک نمونه دارای هماتوکریت ۰/۵(۵۰٪) یا بیشتر نیز انجام‌شود.

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

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

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

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

داده‌های جدول بالا نشان‌می‌دهد که زمان متراکم‌نمودن گلبول‌های قرمز در دستگاه میکروهماتوکریت مورد آزمایش، ۳/۵ دقیقه برای آزمایش نمونه‌ای با میزان هماتوکریت کمتر از ۰/۵ و ۴/۵ دقیقه برای نمونه‌ای با هماتوکریت بیشتر از ۰/۵ است.

ارزیابی عملکرد دستگاه میکروهماتوکریت به روش توصیه‌شدهٔ سازمان جهانی بهداشت به‌صورت زیر انجام‌می‌شود:

- چند نمونه خون با هماتوکریت کمتر از ۰/۵ و حاوی ضدانعقاد EDTA دی‌پتاسیک (۱/۵mg برای هر میلی‌لیتر خون) را پس از بیست بار سروته‌نمودن ظرف نمونه، به‌صورت دوتایی به‌مدت ۳، ۵، ۷، ۹ و ۱۱ دقیقه سانتریفوژ کرده و سپس نتایج آنها ثبت‌می‌شود. درصورت مناسب‌بودن توان دستگاه(برحسب g)، نتایج باید از دقیقهٔ ۵ به بعد بدون تغییر بماند.

برای بررسی ابزار خواندن هماتوکریت می‌توان لولهٔ هماتوکریتی که طول ستون سلول و پلاسمای آن مجموعاً حدود ۵cm و PCV آن ۰/۵ بوده را انتخاب‌کرد و روی خط‌کش معمولی طوری قرارداد که ابتدای ستون گلبول قرمز روی نقطه صفر و انتهای ستون سلول و پلاسما روی ۵cm باشد. قرارگرفتن انتهای بالایی ستون گلبول‌های قرمز روی ۲/۵cm نشان‌دهندهٔ صحت خواندن توسط ابزار خواندن هماتوکریت مورد استفاده است.

۳. شمارش سلول‌های خونی به روش دستی

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

برای شمارش سلول‌های خونی به روش دستی از هماسیتومتر(نئوبار اصلاح‌شده) استفاده‌می‌شود که بر روی آن ۹ فضای خط‌کشی‌شده با مساحت ۱mm × ۱mm تعبیه شده‌است. پس از قرارگرفتن لامل سنگین(دارای سطح صیقلی) روی آن فضایی با حجم ۰/۱mm^4 ایجادمی‌شود.

هماسیتومتر و لامل سنگین پس از هربار استفاده باید بلافاصله با آب گرم شسته‌شده و با پارچهٔ تمیز بدون پرز پاک و در هوا خشک‌شود. سطح این لام نباید با گاز یا پارچهٔ زبر تماس داده‌شود؛ زیرا باعث خراشیدگی خطوط روی لام می‌شوند. نمونهٔ مورد آزمایش پس از رقیق‌شدن، کاملاً مخلوط‌شده و به‌وسیلهٔ پیپت در فضای هماسیتومتر زیر لامل سنگین واردمی‌شود. پراکندگی سلول‌ها باید با عدسی ×۱۰ بررسی‌شده و سپس، با عدسی شی‌ئی ×۴۰ و عدسی چشمی ×۱۰ یا ×۶ شمارش انجام‌شود(به‌طور معمول، از عدسی شی‌ئی ×۱۰ برای شمارش گلبول‌های سفید و از عدسی شی‌ئی ×۴۰ برای شمارش پلاکت‌ها استفاده‌می‌شود).

شمارش گلبول‌های سفید

برای شمارش گلبول‌های سفید، خون حاوی ضدانعقاد EDTA با محلول حاوی مادهٔ رنگی مخلوط‌می‌شود که علاوه‌بر لیز گلبول‌های قرمز، هستهٔ گلبول‌های سفید را نیز به رنگ بنفش ـ سیاه درمی‌آورد. برای انجام این آزمایش استفاده از ضدانعقاد هپارین توصیه‌نمی‌شود. محلول رنگی با استفاده از اسید استیک ۲٪(۲۰mL/L) تهیه‌می‌شود که با اضافه‌نمودن چند قطره ویولهٔ دوژانسیان به رنگ بنفش درآمده‌است.

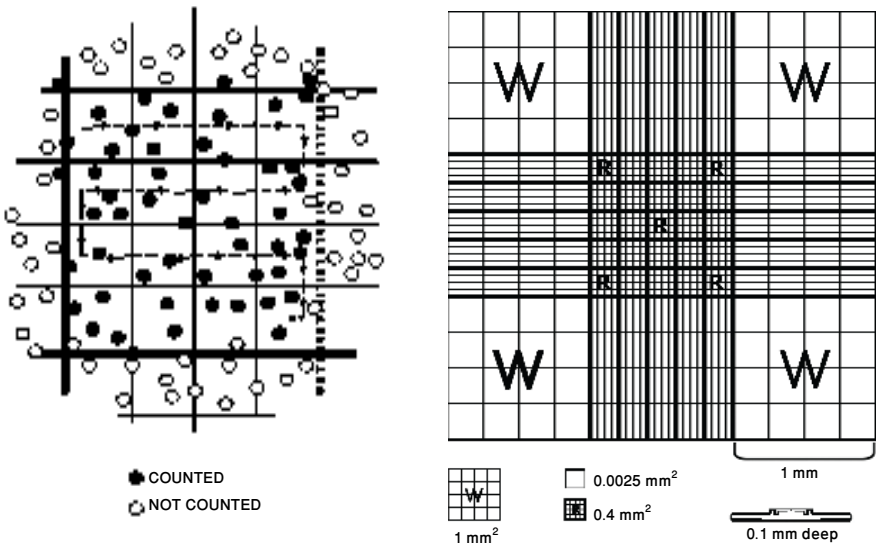
نکته

عدم دقت(CV) شمارش گلبول‌های سفید در نمونهٔ طبیعی و غیرطبیعی بالا ۶/۵٪ و در نمونهٔ غیرطبیعی پایین ۱۵٪ است.

روش آزمایش

برای انجام آزمایش، در لولهٔ آزمایش پلاستیکی یا شیشه‌ای، ۰/۱mL از خونی که به‌خوبی مخلوط‌شده به ۱/۹mL محلول رقیق‌کننده اضافه‌می‌شود تا رقت ۱/۲۰ ایجادشود(مخلوط‌کردن ناکافی خون پیش از تهیهٔ رقت، موجب خطای زیاد در نتیجهٔ آزمایش می‌شود). پس از بستن دهانهٔ لوله، با استفاده از مخلوط‌کننده‌های مکانیکی یا سروته‌نمودن آن با دست با زاویهٔ ۱۲۰° و چرخاندن هم‌زمان به‌مدت ۲ دقیقه، محتویات لوله کاملاً مخلوط‌می‌شود. با این کار، حباب‌های هوا نیز با محلول مخلوط‌می‌شوند. سپس، بلافاصله با استفاده از پیپت یا لولهٔ مویینه، فضای زیر لامل ضخیم در هماسیتومتر در یک مرحله از این مخلوط پرمی‌شود.

به‌منظور ته‌نشین‌شدن سلول‌ها، هماسیتومتر باید به‌مدت ۲ دقیقه روی سطحی صاف، بدون لرزش و دور از نور خورشید و حرارت نگهداری و سپس، شمارش سلول‌ها انجام‌شود. گلبول‌های سفید باید در چهار مربع کناری و در دو طرف محفظه شمارش شوند. در این مربع‌ها، علاوه‌بر شمارش گلبول‌های داخل این فضا، گلبول‌هایی که روی اضلاع بالایی و سمت چپ هستند نیز شمارش می‌شوند؛ ولی گلبول‌های روی اضلاع سمت راست و پایینی مربع در شمارش به‌حساب نمی‌آیند.



تصویر شمارهٔ ۷: نمایی از فضاهای هماسیتومتر به‌کار رفته برای شمارش گلبول‌های سفید

درصورت ایجاد هریک از مشکلات زیر هنگام پرکردن هماسیتومتر، شمارش باید با استفاده از لام خشک و تمیز دیگری انجام‌گیرد:

- پرکردن بیش از حد اسلاید و سرریزشدن آن؛
- پرنشدن کامل محفظه‌ها از محلول؛
- ایجاد حباب هوا در هر قسمت محفظه؛
- هرگونه ذرهٔ اضافی در محفظه‌ها.

طبق توصیهٔ سازمان جهانی بهداشت، حداقل ۱۰۰ گلبول سفید باید شمارش شود، ولی برای دستیابی به عدم دقت(CV) ۵٪، شمارش ۴۰۰ سلول الزامی است. برای به‌حداقل رساندن خطای ناشی از پراکندگی نامناسب سلول‌ها، توصیه‌می‌شود که شمارش گلبول‌های سفید در کل فضای خط‌کشی‌شده هماسیتومتر(۹ فضای ۰/۱µl) انجام‌گیرد.

برای محاسبهٔ تعداد گلبول‌های سفید می‌توان از فرمول زیر استفاده‌نمود:

$$WBC/L = \frac{\text{تعداد سلول‌های شمارش‌شده} \times \text{ضریب رقت} \times ۱۰^{۶} \times ۱۰}{\text{تعداد مربع‌های بزرگ شمارش‌شده}}$$

برای مثال، اگر در ۰/۹µl(۹ فضای خط‌کشی‌شده) ۴۲۰ گلبول سفید شمارش شود، تعداد کل گلبول‌های سفید به طریق زیر محاسبه‌می‌شود:

$$\frac{۴۲۰ \times ۲۰ \times ۱۰^{۶} \times ۱۰}{۹} = ۹/۳ \times ۱۰^{۹} /L$$

شمارش پلاکت

شمارش پلاکت‌ها روی خون وریدی حاوی ضدانعقاد EDTA انجام‌پذیر است. شمارش با استفاده از خون مویرگی نیز انجام‌می‌شود، ولی تعداد پلاکت‌ها نسبت به خون وریدی کمتر و شمارش آن نیز ناپایدارتر است؛ زیرا تعداد متفاوتی از پلاکت‌ها در محل سوراخ‌کردن پوست باقی‌می‌مانند.

روش آزمایش

محلول رقیق‌کننده حاوی اکسالات آمونیوم آبی ۱٪(۱۰g/L) است که موجب لیز گلبول‌های قرمز می‌شود. پیش از تهیهٔ رقت باید از نبود لخته در نمونه اطمینان حاصل‌کرد. درصورت وجود لخته، باید دوباره نمونه‌گیری انجام‌شود. برای تهیهٔ رقت ۱/۲۰، ۰/۱mL خون کاملاً مخلوط‌شده با ۱/۹mL محلول رقیق‌کننده مخلوط‌می‌شود، این مخلوط باید به‌مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه روی مخلوط‌کنندهٔ مکانیکی قرارگیرد. سپس، هماسیتومتر با روش ذکرشده برای شمارش گلبول‌های سفید از این مخلوط پر و برای ته‌نشین‌شدن پلاکت‌ها، حداقل ۲۰ دقیقه در ظرف پتری که کف آن کاغذ صافی مرطوب قراردارد، نگهداری‌می‌شود. پس از گذشت مدت ذکرشده، پلاکت‌ها با میکروسکوپ شمارش می‌شوند. درصورت پایین‌بردن کندانسور میکروسکوپ، پلاکت‌ها به‌صورت ذرات کوچک درخشانی قابل رؤیت هستند. به‌طور معمول، پلاکت‌ها در مربع مرکزی هر محفظه شمارش می‌شوند، ولی شمارش پلاکت‌ها باید در یک یا بیشتر از فضاهای $1mm^2$(حجم ۰/۱µl) انجام‌شود. برای دستیابی به عدم دقت ۸٪ تا ۱۰٪، شمارش حداقل ۲۰۰ پلاکت الزامی است.

$$PLT/L = \frac{\text{تعداد سلول‌های شمارش‌شده} \times \text{ضریب رقت} \times ۱۰^۶ \times ۱۰}{\text{تعداد مربع‌های بزرگ شمارش‌شده}}$$

نکته

میزان ساخت محلول رقیق‌کننده در هر بار نباید از ۵۰۰mL بیشتر باشد و برای تهیه از ظرف‌های شیشه‌ای تمیز و آب مقطر یا دیونیزه استفاده‌شود. درصورت امکان، رقیق‌کننده با استفاده از فیلتر ۲۲µl صاف و در یخچال نگهداری‌شود. درغیر این صورت، هر روز پیش از انجام آزمایش حجم مشخصی از آن با دور بالا سانتریفوژ شده و از محلول رویی برای رقیق‌کردن استفاده‌شود.

منابع خطا

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

۱. خطاهای تکنیکی

- خطاهای جمع‌آوری نمونه؛
- مخلوط‌نکردن کامل نمونه؛

- پیپت‌کردن نادرست(استفاده از پیپت و هماسیتومتر غیرکالیبره و غیراستاندارد)؛
- استفاده از لامل عادی به‌جای ضخیم(سنگین)؛
- مخلوط‌نکردن کافی نمونه با رقیق‌کننده؛
- پرکردن نادرست اسلاید؛
- شمارش نادرست سلول‌ها.

۲. خطاهای ذاتی

این خطاها به پراکندگی غیریکنواخت سلول‌ها در نواحی مختلف اسلاید مربوط است که با مخلوط‌نمودن کافی محلول پیش از پرکردن محفظه‌های اسلاید نیز برطرف نمی‌شود. فقط شمارش سلول‌ها به تعداد زیاد می‌تواند این خطا را کاهش‌دهد.

جدول زیر میزان پراکندگی نتایج شمارش دستی گلبول‌های سفید را در مقایسه با تعداد سلول‌های شمارش‌شده نشان‌می‌دهد. با افزایش تعداد سلول‌های شمارش‌شده، میزان پراکندگی نتایج کاهش‌می‌یابد.

جدول شمارهٔ ۱۶: میزان پراکندگی شمارش دستی در مقایسه با تعداد کل سلول‌های شمارش‌شده

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

منابع

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