



عنوان دوره آموزشی

کنترل کیفی در بخش هماتولوژی

بهار ۱۳۹۷

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

گروه‌های هدف:

تکنسین کاردان و کارشناس آزمایشگاه تشخیص طبی

اهداف آموزشی

هدف کلی: افزایش دانش و آگاهی پرسنل درخصوص کنترل کیفی در بخش هماتولوژی

روش و نحوه اجرای آموزشی

کتابخوانی

مدت دوره آموزشی: ۱۸ ساعت

ارزشیابی

در پایان دوره به منظور ارزیابی میزان حصول موفقیت و دستیابی به اهداف آموزشی و بررسی آگاهی، نگرش و عملکرد آموزش گیرندگان و بهبود مستمر فرایند یک ارزشیابی از شرکت کنندگان به صورت تست‌های چهارگزینه‌ای به عمل خواهد آمد.

۴.....	فصل اول
۴.....	کلیات
۵.....	اصول اولیه کار با دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی
۶.....	شناسنامه دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی
۸.....	نکته‌های مهم در انجام آزمایش CBC
۱۱.....	فصل دوم
۱۱.....	اساس کار، کالیبراسیون، کنترل
۱۱.....	کیفیت و خطاهای دستگاه‌های
۱۱.....	خودکار شمارنده سلولی
۱۲.....	اساس کار دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی
۱۷.....	کالیبراسیون دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی
۲۰.....	کنترل کیفیت دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی
۳۹.....	خطاهای دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی
۳۵.....	فصل سوم
۳۵.....	روش‌های مرجع انجام آزمایش‌ها
۳۶.....	اندازه‌گیری هموگلوبین به روش سیان مت هموگلوبین
۴۰.....	روش اندازه‌گیری حجم سلول‌های متراکم شده به روش میکروهماتوکریت
۴۴.....	کنترل کیفیت و بررسی کالیبراسیون دستگاه میکروهماتوکریت
۴۷.....	شمارش سلول‌های خونی به روش دستی
۴۸.....	شمارش گلبول‌های سفید
۵۱.....	شمارش پلاکت
۵۵.....	منابع

فصل اول

کلیات

اصول اولیه کار با دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی

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

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

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

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

نکته:

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

مشخصات محلولها و مواد مصرفی؛

سوابق کالیبراسیون و کنترل کیفی؛

سوابق تعمیر با ذکر قطعه تعویض شده؛

سوابق نگهداری، سرویس های دوره ای و خدمات پشتیبانی.

شناسنامه دستگاه های خودکار شمارنده سلولی

دستگاه های خودکار شمارنده سلولی مانند سایر تجهیزات آزمایشگاهی باید شناسنامه های

با این اطلاعات داشته باشند:

۱. تاریخ خرید
۲. تاریخ نصب و کالیبراسیون و نام کارشناس شرکت پشتیبان که دستگاه را راه اندازی نموده است؛
۳. تاریخ شروع کار دستگاه؛

۴. کارخانه و کشور سازنده؛

۵. مدل و شماره سریال دستگاه؛

۶. شرایط دستگاه هنگام خرید (نو، مستعمل و بازسازی شده)؛

۷. نام، شماره تلفن و نشانی شرکت پشتیبان؛

۸. نام کاربر یا کاربران دستگاه؛

۹. مشخصات و نحوه آموزش کاربر دستگاه توسط شرکت پشتیبان.

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

نکته:

وجود ذرات اضافی و نامحلول در محلولهای ذکرشده به ویژه ایزوتون، باعث تداخل

در شمارش زمینه و خطا در شمارش سلولهای خونی به خصوص پلاکتها می‌شود.

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 رعایت شود.

۱. مرحله پیش از آزمایش (Pre Analytical Phase)

- مراجعه‌کننده باید پیش از خون‌گیری حداقل ۵ دقیقه آرام بنشینند.
- نام، نام خانوادگی و شماره پذیرش مندرج روی برچسب ظرف با برگ درخواست یا برگ پذیرش مطابقت داده شود.
- تورنیکه بیش از یک دقیقه بر دست نمونه دهنده بسته نماند.
- از ضد انعقاد مناسب با رعایت نسبت لازم به مقدار خون استفاده شود (توجه به الزامات موردنیاز دستگاه در این خصوص ضروری است).
- به‌محض گرفتن خون، نمونه با ضد انعقاد مخلوط شود (۲ دقیقه با همزن یا ۸ تا ۱۰ بار سروته نمودن ویال).
- نمونه با مشاهده دقیق یا با استفاده از اپلیکاتور از نظر نبود لخته و همولیز یا لیپمی بررسی شود.
- حداکثر فاصله زمانی بین نمونه‌گیری و انجام آزمایش حدود ۴ تا ۶ ساعت باشد.
- بلافاصله پیش از انجام آزمایش، نمونه خون با قرار دادن ویال به مدت ۳ تا ۵ دقیقه روی روتاتور و یا حداقل ۱۰ بار سروته نمودن کامل، هموژن و یکنواخت شود.

۲. مرحله انجام آزمایش (Analytical Phase)

هرروز پیش از شروع آزمایش، شمارش زمینه دستگاه 2 انجام شده و در صورت امکان سوابق آن نگهداری شود. ب. بطور معمول، مقادیر مربوط به شمارش زمینه هر دستگاه (Back Ground) در دستورالعمل آن ارائه شده است. سازمان جهانی بهداشت نیز در این رابطه معیارهایی ارائه نموده است که در زیر به آن‌ها اشاره می‌شود:

$$\text{تعداد گلبول‌های قرمز} < 0,03 \times 10^{12}/L$$

$$\text{تعداد گلبول‌های سفید} < 0,04 \times 10^9/L$$

$$\text{هموگلوبین} < 0,2 \text{ g/dl}$$

$$\text{تعداد پلاکت‌ها} < 0,5 \times 10^9/L$$

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

۳. مرحله پس از آزمایش (Post Analytical Phase)

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

اثر مواد ضد انعقاد

ضد انعقاد مایع K3EDTA به دلیل ایجاد رقت در نمونه، مقدار هموگلوبین را تا ۱٪ کاهش می‌دهد.

استفاده از ضد انعقاد K3EDTA باعث چروکیدگی گلبول‌های قرمز و کاهش 2% میزان هماتوکریت می‌شود. در صورتی که آزمایشگاهی ضد انعقاد مورد استفاده خود را از K3EDTA به K2EDTA تغییر دهد، باید به این نکته توجه نماید که میانگین MCV 2% افزایش و میانگین $MCHC$ به همین میزان کاهش می‌یابد.

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

نکته:

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

فصل دوم

اساس کار، کالیبراسیون، کنترل

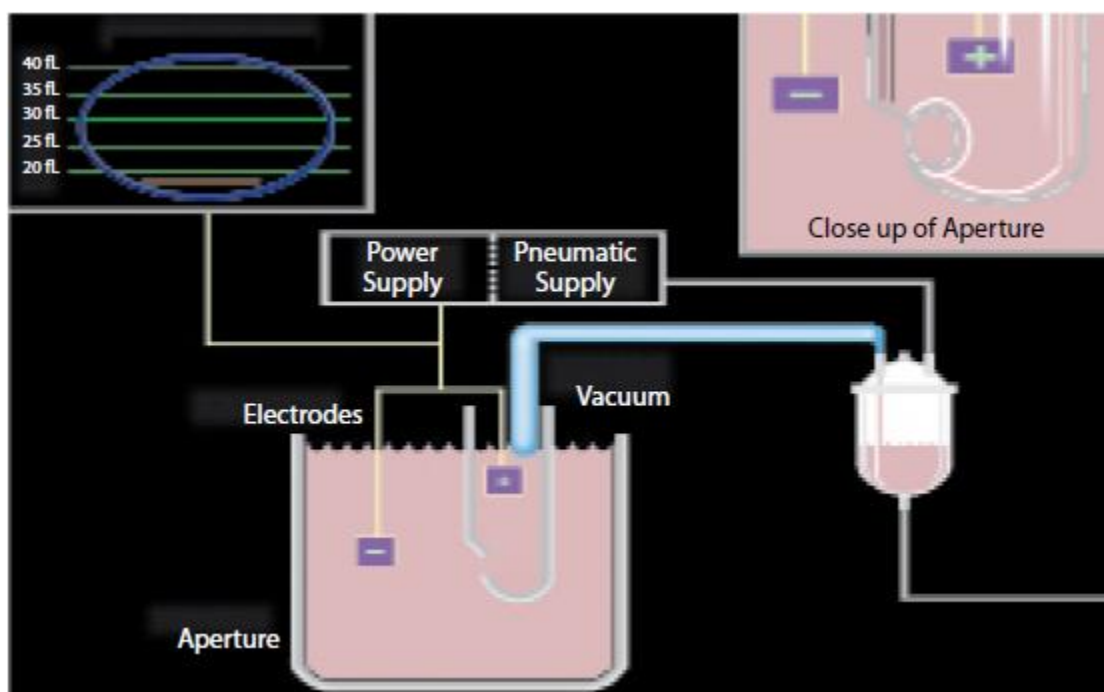
کیفیت و خطاهای دستگاه‌های

خودکار شمارنده سلولی

اساس کار دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی

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

۱. مقاومت الکتریکی (Electrical Impedance): این روش اولین بار توسط والس کولتر (Wallace Coulter) در سال 1956 مطرح شد و اساس کار دستگاه‌هایی نظیر کولتر (Coulter)، بکمن (Beckman)، سیستمکس (Sysmex)، ابوت (Abbott) و ... قرار گرفت. در این مکانیسم، خون در یک محلول بافری الکتریکی رقیق‌شده و از بین دو الکترود حامل جریان الکتریکی مستقیم عبور می‌کند. با عبور هر سلول خونی از این مسیر، مقاومت الکتریکی و یک پالس الکتریکی ایجاد می‌شود. تغییر در پتانسیل بین الکترودها متناسب با مدت‌زمانی است که گلبول از فضای بین دو الکترود، که اصطلاحاً دریچه (Aperture) نامیده می‌شود، عبور می‌کند. ارتفاع هر پالس نشان‌دهنده حجم سلول و تعداد پالس نشان‌دهنده تعداد سلول است.



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

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

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

- در مجرای اول، با افزودن رقیق‌کننده به نمونه خون، اندازه و تعداد گلبول‌های قرمز و پلاکت‌ها مشخص می‌شود، که به منظور جداسازی پلاکت‌ها از گلبول‌های قرمز و شمارش آن‌ها در دستگاه دو آستانه جداکننده بالا و پایین تعیین شده است.
 - در مجرای دوم، با افزودن ماده لیزکننده به نمونه و با کمک رقیق‌کننده، گلبول‌های قرمز لیز شده و گلبول‌های سفید که دست‌نخورده مانده‌اند، شمارش می‌شوند. در این مجرا، علاوه بر شمارش گلبول‌های سفید، مقدار هموگلوبین نیز به روش سیان مت هموگلوبین اندازه‌گیری می‌شود.
- * در دستگاه‌های جدیدتر برای شمارش افتراقی لکوسیت‌ها مجراهای دیگری در نظر گرفته شده است.

اندازه‌گیری PCV (Packed Cell Volume) و MCV (Mean Corpuscular Volume) در دستگاه‌های خودکار شمارنده سلول کاملاً به یکدیگر وابسته‌اند. در برخی دستگاه‌ها، با محاسبه میانگین ارتفاع پالس‌های حاصل از عبور مشخص می‌شود و بر اساس تعداد گلبول‌های MCV گلبول‌های قرمز از دریچه، مقدار قرمز شمارش شده، میزان هماتوکریت توسط دستگاه محاسبه می‌شود. در دستگاه‌های دیگر، از مجموع پالس‌های حاصل از عبور گلبول‌های قرمز،

میزان PCV تعیین شده و با استفاده از تعداد گلبول‌های قرمز، مقدار MCV محاسبه می‌شود. تقریباً در تمام دستگاه‌ها سایر شاخص‌های گلبول‌های قرمز مانند MCH (Mean Corpuscular Hemoglobin) و MCHC (Mean) و PCV (Corpuscular Hemoglobin Concentration) از طریق محاسبه و با استفاده از مقادیر هموگلوبین، PCV و تعداد گلبول‌های قرمز مشخص می‌شوند.

میزان پراکندگی اندازه گلبول‌های قرمز (RDW)^۱ در دستگاه‌ها، با استفاده از محاسبه میزان تغییرات ارتفاع پالس‌های ایجادشده به دنبال عبور گلبول‌های قرمز تعیین و به صورت انحراف معیار SD^۲ (با واحد فمتولیتتر) یا ضریب انحراف معیار CV^۳ (درصد) ارائه می‌شود.

در بعضی دستگاه‌ها نظیر بایر تکنیکون^۴، میزان پراکندگی هموگلوبین داخل سلول (HDW)^۵ نیز مشخص می‌شود. این مقدار در واقع نشانه‌دهند پراکندگی (CV) غلظت هموگلوبین در هر سلول یا آنیزوکرومیا یا نمای دی مورفیک گلبول‌های قرمز است.

شمارش افتراقی گلبول سفید در دستگاه‌های مختلف، با استفاده از مکانیسم‌های مختلف مانند مقاومت الکتریکی و جریان‌های الکتریکی با تواترهای مختلف، تعیین اندازه هسته، پراکندگی و جذب نور، واکنش‌های شیمیایی ناشی از گرانول‌ها و... صورت گرفته و به صورت سه، پنج و هفت‌قسمتی گزارش می‌شود. در شمارش افتراقی سه‌قسمتی، سه گروه سلول بر اساس اندازه، شامل سلول‌های بزرگ یا گرانولوسیت‌ها، سلول‌های کوچک یا لنفوسیت‌ها و سلول‌های متوسط شامل منوسیت‌ها، بازوفیل‌ها، ائوزینوفیل‌ها و سلول‌های مونونوکلئر شمارش می‌شوند. در شمارش افتراقی پنج‌قسمتی، رده‌های نوتروفیل، ائوزینوفیل، بازوفیل، لنفوسیت‌ها و منوسیت‌ها شمارش شده و در شمارش افتراقی هفت‌قسمتی علاوه بر رده‌های ذکرشده، سلول‌های بزرگ نابالغ (بلاست و گرانولوسیت‌های نابالغ) و لنفوسیت‌های آتیپیکال (بلاست‌های کوچک) نیز جای می‌گیرند.

¹ Red cell Distribution Width

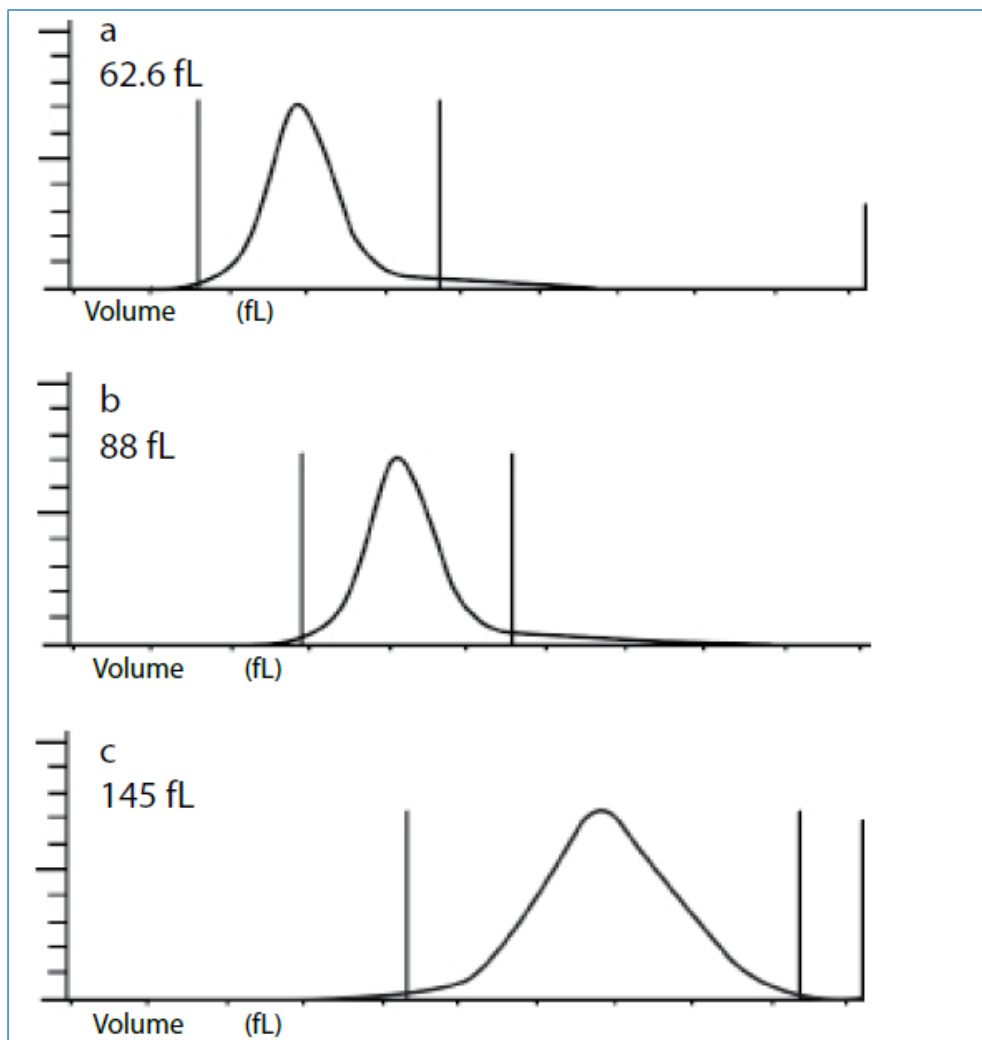
² Standard Deviation

³ Coefficient Variation

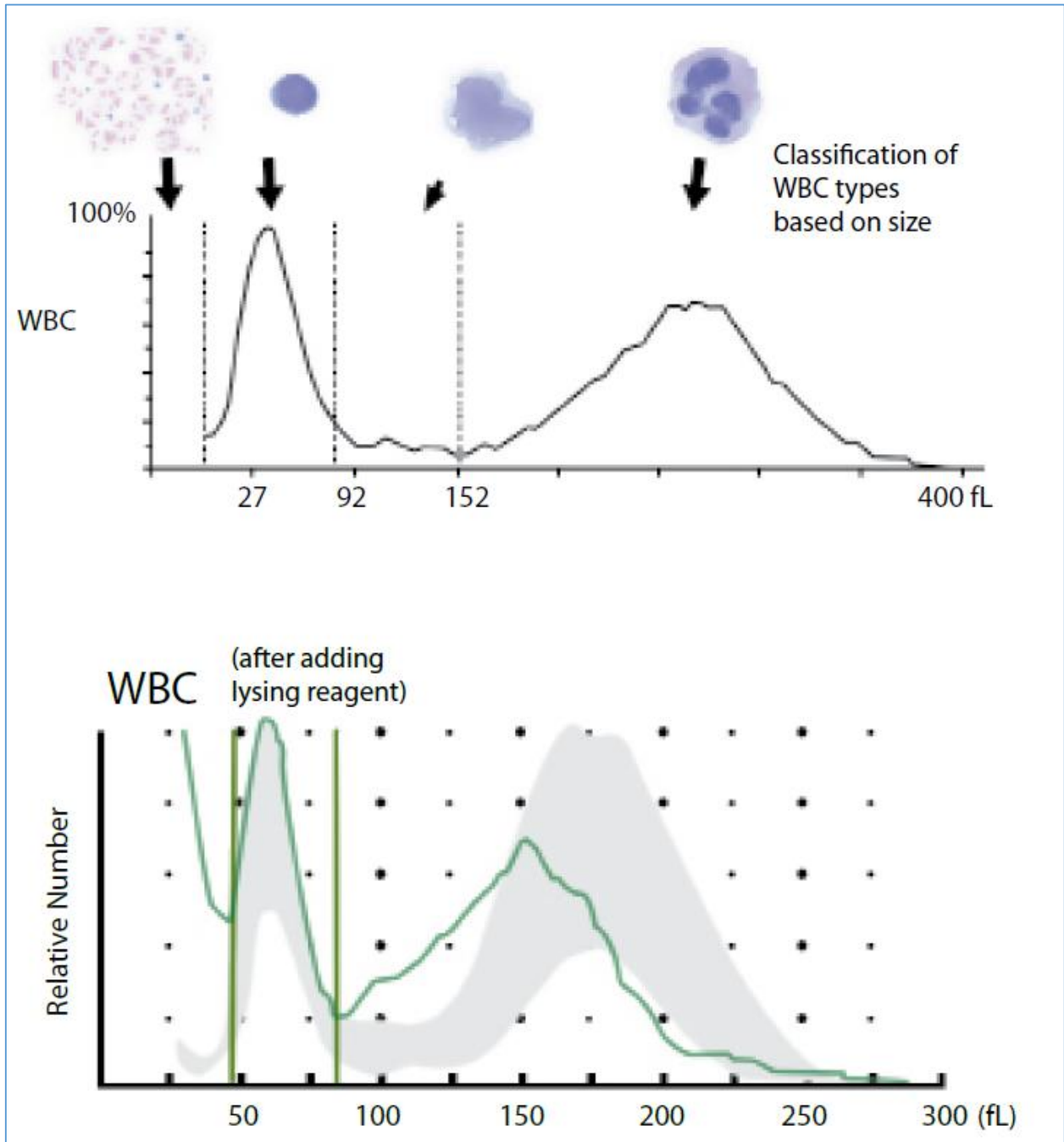
⁴ Byertechnicon

⁵ Hemoglobin Distribution Width

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



تصویر شماره ۲: هیستوگرام‌های گلبول‌های سفید



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

کالیبراسیون دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی

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

تمام دستگاه‌ها باید پس از نصب و پیش از شروع کار کالیبرشده و میزان عدم دقت آن‌ها نیز بررسی شود. سوابق اجرایی این امر باید در آزمایشگاه نگهداری گردد. کالیبراسیون باید ب‌طور کل سالی یک یا دو بار و نیز در موارد زیر انجام شود:

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

دستورالعمل‌های کارخانه سازنده، برای کالیبراسیون دستگاه‌ها مناسب هستند. می‌توان موفقیت روند کالیبراسیون را به‌وسیله آزمایش نمونه کنترل، مقایسه نتایج دستگاه با نتایج آزمایش‌شده روی چند نمونه خون با روش‌های مرجع و یا کنترل دقیق میانگین‌های متحرک درباره شاخص‌های گلبول‌های قرمز⁶ تأیید کرد.

در صورت دسترسی نداشتن به کالیبراتورهای تجاری یا داشتن تردید نسبت به اعتبار آن، استفاده از خون کامل برای کالیبراسیون ضروری است. برای کالیبراسیون باید از خون طبیعی و تازه استفاده کرد. برای این کار، پارامترهای حداقل سه نمونه خون کامل طبیعی، دو بار با روش‌های مرجع دستی و دو بار با دستگاه شمارنده سلولی اندازه‌گیری می‌شود و

⁶ Moving Average

پس از محاسبه میانگین نتایج هر پارامتر با روش دستی و دستگاهی، ضریب کالیبراسیون جدید با استفاده از فرمول زیر تعیین می‌شود. با افزایش تعداد نمونه‌ها، دقت کالیبراسیون بیشتر می‌شود.

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

روش‌های مرجع اندازه‌گیری هموگلوبین، هماتوکریت و شمارش گلبول‌های سفید به ترتیب سیان مت هموگلوبین، میکروههماتوکریت و استفاده از هماسیتومتر (با درجه‌بندی نئوبار اصلاح شده) هستند. در کتاب‌های مرجع، روش مرجع شمارش گلبول‌های سفید، گلبول‌های قرمز و پلاکت‌ها، شمارنده‌های سلولی تک کاناله عنوان شده‌اند که در ایران، به علت در دسترس نبودن این تجهیزات، همچنان از هماسیتومتر استفاده می‌شود. به علت احتمال وجود خطای زیاد در شمارش سلولی با این روش، به‌ویژه در گلبول‌های قرمز و پلاکت‌ها، توصیه می‌شود که کالیبراسیون این پارامترها به‌وسیله شرکت پشتیبان صورت گیرد.

محاسبه ضریب کالیبراسیون:

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

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

طبق محاسبه بالا، ضریب کالیبراسیون دستگاه برای هموگلوبین باید به مقدار ۳,۴۴ کاهش یابد. به‌عنوان مثال، اگر ضریب کالیبراسیون دستگاه پیش‌ازاین 100 بوده است، باید ۳,۴۴٪ کاهش یابد و روی ۹۶,۵۶ تنظیم شود.

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

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

نکته:

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

کنترل کیفیت دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی

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

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

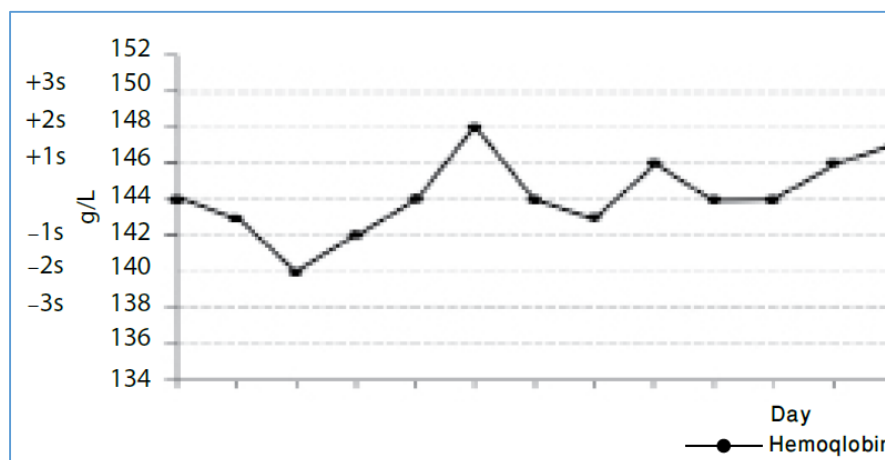
۱-۳. خون کنترل

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

نمونه خون کنترل هر روز صبح پیش از آزمایش نمونه‌های بیماران و در صورت نیاز، به فواصل در طی روز آزمایش و نتایج روی نمودار ثبت می‌شود. برای رسم نمودار، نمونه کنترل باید به دفعات و در فواصل زمانی مختلف با دستگاه آزمایش شود تا دست‌کم برای هر پارامتر 20 خوانده حاصل شود. پس از محاسبه میانگین و انحراف معیارهای $\pm 1SD$ ، $\pm 2SD$ و $\pm 3SD$ برای هر پارامتر، مقادیر آن‌ها روی محور عمودی و روزها روی محور افقی ثبت می‌شود.

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

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



تصویر شماره ۴: نمودار کنترل کیفی هموگلوبین

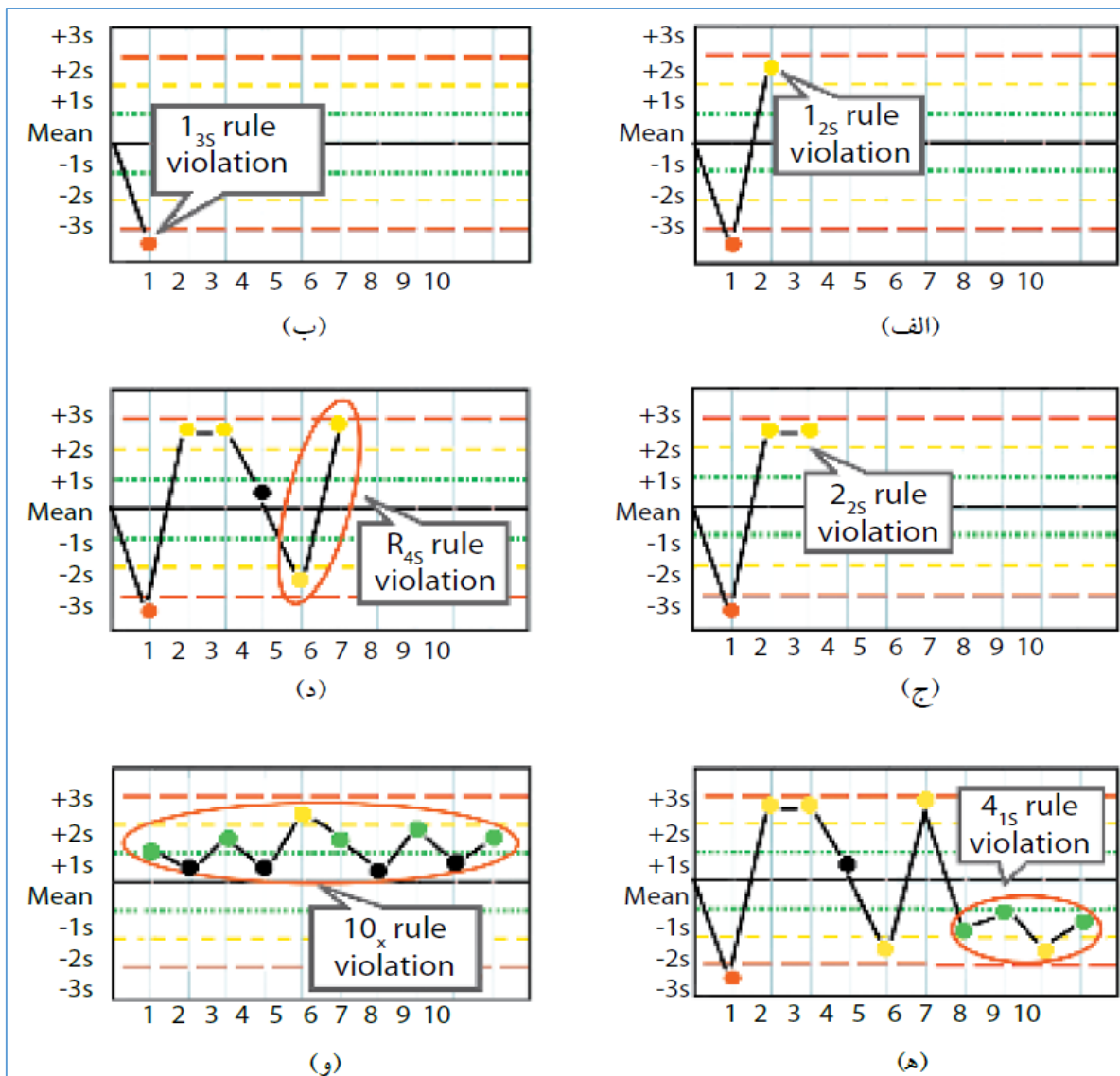
جدول شماره ۱: تفسیر نمودار کنترل کیفیت براساس قوانین سازمان جهانی بهداشت

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

جدول شماره ۲: تفسیر نمودار کنترل کیفیت براساس قوانین وستگارد

تفسیر	نتایج خون کنترل
هشدار، لزوم بررسی سایر قوانین	1_{25} یک کنترل خارج از محدوده $\pm 2SD$ (نمودار الف)
رد نتایج، نشان‌دهنده خطای تصادفی یا سیستماتیک	1_{35} یک کنترل خارج از محدوده $\pm 3SD$ (نمودار ب)
رد نتایج، نشان‌دهنده خطای سیستماتیک	2_{25} دو خوانده متوالی و هم‌سو، خارج از محدوده $\pm 2SD$ (نمودار ج)
رد نتایج، نشان‌دهنده خطای تصادفی	R_{45} یک خوانده خارج از محدوده $+2SD$ و دیگری خارج از محدوده $-2SD$ (نمودار د)
رد نتایج، نشان‌دهنده خطای سیستماتیک	4_{15} چهار خوانده متوالی و هم‌سو، خارج از محدوده $+1SD$ یا $-1SD$ (نمودار ه)
رد نتایج، نشان‌دهنده خطای سیستماتیک	$10_{\bar{x}}$ ده خوانده متوالی در یک طرف میانگین (بالا یا پایین میانگین و بدون توجه به اندازه انحراف) (نمودار و)

قوانین چندگانه و ستگارد بین مجموعه های کاری مختلف و نیز بین دو غلظت نمونه کنترلی قابل استفاده هستند.



تصویر شماره 5: نمودارهای کنترل کیفی با قوانین و ستگارد

در صورت یافتن هرگونه خطا با استفاده از نمودار، ابتدا، باید از آلوده یا خراب نبودن نمونه کنترل اطمینان حاصل نمود. با مطمئن شدن از این امر پیش از برنامه ریزی برای کالیبراسیون دستگاه، باید اقدام های دیگری مانند شست و شوی دستگاه، آزمایش مجدد نمونه، آزمایش روی نمونه خون کنترل دیگر با همان سری ساخت، بررسی وضعیت محلول های دستگاه و ... را مدنظر قرارداد.

۳-۲. آزمون پایداری کالیبراسیون^۷

به منظور کامل شدن روند کنترل کیفیت دستگاه، علاوه بر استفاده از خون کنترل، می توان از نمونه های خون تازه استفاده کرد. با توجه به پایداری پارامترهایی نظیر ، WBC،RBC، Hb و HCT و اندک سهای خونی در نمونه خون حاوی ضد انعقاد، به مدت 24 ساعت در دمای 4°C ، می توان در روز اول حداقل 5 و ترجیحاً 10 نمونه که دارای مقادیر طبیعی هستند را پس از آزمایش در یخچال نگهداری کرد و روز بعد، مجدداً مورد آزمایش قرارداد و وجود اختلاف معنی دار بین مقادیر نمونه های جفت را با استفاده از آزمون آماری پایداری کالیبراسیون محاسبه کرد.

⁷ T-Brittin

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

n: تعداد جفت‌های مورد بررسی

d: اختلاف بین دو خواننده (روزبه‌روز)

SD: انحراف معیار اختلافات

\bar{d} : میانگین اختلافات

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

مثال:

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

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

$$\sum d = 15$$

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

$$\sum d^2 = 55$$

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

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

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

چون عدد t به دست آمده از ۲,۷۸ (مقدار t برای 5 نمونه) کمتر است، نتایج هموگلوبین دستگاه قابل قبول است.

۳-۳. آزمایش دوتایی^۸

⁸ Duplicate Test

در صورت نبود امکان انجام تمام آزمایش‌ها به صورت دوتایی، باید در هر سری کاری، حداقل 2 تا 3 نمونه به صورت دوتایی آزمایش شوند تا با بررسی اختلاف خوانده‌ها از طریق محاسبات آماری، از وجود خطاهای تصادفی آگاه شد. افزایش اختلاف بین دو خوانده بیش از $2SD$ محاسبه شده، احتمال وجود خطای تصادفی را مطرح می‌کند. فرمول زیر طبقه محاسبه SD نمونه‌های دوتایی را نشان می‌دهد:

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

مثال

مقدار هموگلوبین 5 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

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

$$SD = 6.7$$

تفاوت بیشتر از $2SD$ بین دو نتیجه آزمایش در نمونه سوم ($d=10$)، نمایانگر بروز خطای تصادفی و لزوم تکرار آزمایش روی همان نمونه است.

۳-۴. آزمایش بازبینی^۹

یکی دیگر از روش‌های کنترل کیفیت، آزمایش بازبینی است که در صورت نگهداری نمونه‌ها در دمای مناسب (یخچال) اجرashدنی است. برای این کار باید ابتدای سری کاری یا صبح دو تا سه نمونه را پس از آزمایش بلافاصله با دربسته در یخچال قرارداد و در انتهای سری کاری یا بعدازظهر یا روز بعد، آن‌ها را مجدداً مورد آزمایش قرارداد. پیش از آزمایش، نمونه‌ها باید به دمای اتاق رسیده و کاملاً مخلوط شوند. نتایج این دو آزمایش را می‌توان با استفاده از فرمول آزمایش دوتایی مقایسه نمود که اختلاف نتایج در محدوده $2SD$ قابل قبول است. در صورت نگهداری نمونه‌ها در شرایط مناسب، هرگونه تغییر در نتایج خارج از این محدوده، نشان‌دهنده اشکال در عملکرد دستگاه یا معرف‌ها است. این آزمایش برای بررسی تغییرات هموگلوبین و گلبول‌های قرمز مناسب است و به میزان کمتر برای گلبول‌های سفید و پلاکت‌ها کاربرد دارد؛ ولی برای هماتوکریت، به‌ویژه اگر فاصله زمانی بین دو آزمایش 6 ساعت یا بیشتر باشد، کارایی ندارد.

نکته:

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

⁹ Check Test

مثال:

نتایج اندازه‌گیری هموگلوبین 5 نمونه توسط دستگاه شمارنده در صبح و بعدازظهر 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

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

$$2SD=2$$

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

۳-۵. آزمایش دلتا^{۱۰}

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

، توجه داشت. با توجه به تغییرات روزانه طبیعی پارامترهای خونی در یک فرد، تنها وجود اختلافات واضح بین مقادیر به دست آمده، نشان‌دهنده بروز خطا است.

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

¹⁰ Delta Test

به دلیل ثابت بودن 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 100 نمونه CBC پذیرش می‌کنند، استفاده نمود. بررسی‌ها نشان می‌دهند، در صورتی که نمونه‌های CBC مورد آزمایش در روزهای مختلف از نظر میزان ایندکس‌های خونی تفاوت مشخصی با یکدیگر نداشته باشند که به تأثیر بارز بر میانگین‌ها منجر شود، مانند پذیرش نمونه‌های افراد مبتلابه فقر آهن یا تالاسمی در یک روز خاص در هفته که باعث کاهش شاخص‌های گلبولی می‌شوند، هرگونه تغییر مشخص در میانگین ایندکس‌ها نشان‌دهنده تغییر در کالیبراسیون یا اختلال عملکرد دستگاه است. برای استفاده از این روش، ابتدا باید میانگین و $\pm 2SD$ اندک سهای MCV، MCH و MCHC حداقل 300 تا نمونه را محاسبه و سپس، نمودار کنترل کیفیت را رس نمود.

در صورت مراجعه بیمارانی که ایندکس‌های خونی طبیعی ندارند، مانند مبتلایان به بیماری‌های ذکر شده، نتایج اندک سهای گلبولی آن‌ها نباید در محاسبه میانگین لحاظ شود. پس از رسم نمودار، نمونه‌های بیماران را روزانه به گروه‌های بیست‌تایی تقسیم کرده و پس از محاسبه میانگین شاخص‌های گلبولی آن‌ها و ثبت این میانگین روی نمودار، هرگونه انحراف از مقادیر مجاز را می‌توان نمایانگر عملکرد نامناسب دستگاه دانست. برای اطمینان از درست بودن این روش، انتخاب گروه‌های بیست‌تایی نمونه‌ها، باید به‌صورت تصادفی باشد و در هر دسته نیز بیش از 7 نمونه دارای شرایط بالینی یکسان نباشند. این روش کنترل کیفی به‌صورت برنامه‌های نرم‌افزاری روی بعضی دستگاه‌ها نصب شده است.

۳-۷. بررسی عدم دقت (CV)

این بررسی به دو شکل انجام می‌پذیرد. در صورت استفاده از خون کنترل، می‌توان با استفاده از نتایج نمونه کنترل که طی روزهای متوالی با دستگاه آزمایش شده، عدم دقت هر پارامتر را محاسبه کرد و در صورت دسترسی نداشتن به خون کنترل، باید از نمونه‌های روزانه برای این امر استفاده کرد. به این ترتیب، هر ماه دو نمونه یا بیشتر را حداقل 10 بار به‌صورت متوالی با دستگاه آزمایش کرده و از نتایج به‌دست آمده، عدم دقت هر پارامتر را محاسبه کرد. توصیه می‌شود

که عدم دقت دستگاه به‌ویژه هنگام نصب و راه‌اندازی، با استفاده از نمونه‌های با دامنه‌های طبیعی و غیرطبیعی بررسی شود. برای تهیه نمونه غیرطبیعی پایین، می‌توان از نمونه رقیق‌شده استفاده کرد، به‌این‌ترتیب که پلاسمای نمونه را جدا کرده و سپس حجمی از نمونه را با این پلاسمای به‌دست‌آمده مخلوط کرد. نمونه خون با دامنه غیرطبیعی بالا را نیز می‌توان با غلیظ کردن نمونه تهیه نمود. برای این کار باید ظرف نمونه را به مدت 2 ساعت با زاویه 45° نگهداری کرد و سپس با برداشتن نیمی از پلاسمای ایجادشده و مخلوط کردن کامل، از آن به‌عنوان نمونه غیرطبیعی بالا استفاده نمود. در صورت مطابقت نداشتن عدم دقت هر پارامتر با ادعای سازنده که در بروشور درج‌شده است، ضروری است با شرکت پشتیبان تماس گرفته شود.

مثال:

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

شمارش WBC

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

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

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

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

$$CV\% = \frac{۰/۱۴۸ \times 100}{۷/۶۳} \quad CV\% = ۲/۱/۹$$

روش‌های ذکرشده جزئی از برنامه‌های کنترل داخلی کیفیت هستند و به‌منظور بررسی تکرارپذیری مناسب آزمایش‌ها انجام می‌شوند، ولی تکرارپذیری مناسب همواره نشان‌دهنده صحت نتایج نیست. برای ارزیابی صحت عملکرد تجهیزات و روش‌های آزمایش، باید از روش‌های دیگری نظیر استفاده از استاندارد، کالیبراتور و یا شرکت در برنامه‌های کنترل خارجی کیفیت استفاده کرد. هدف برنامه کنترل خارجی کیفیت، ایجاد هماهنگی بین نتایج آزمایشگاه‌ها است. در این برنامه، نمونه‌های مجهول از مرکز اجرای برنامه به آزمایشگاه‌های شرکت‌کننده فرستاده می‌شود. آزمایشگاه‌ها پس از انجام آزمایش‌های لازم روی نمونه‌ها، نتایج را جهت پردازش به مرکز اجرای برنامه ارسال می‌نمایند. نتایج در مرکز ذکرشده به‌روش‌های مختلف بررسی می‌شود که یکی از آن‌ها مقایسه نتایج هر آزمایشگاه با میانگین نتایج کل آزمایشگاه‌ها است که نتیجه آن به‌صورت (DI)^{۱۱} به اطلاع آزمایشگاه رسانده می‌شود.

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

\bar{x} : میانگین گروه

x : نتیجه هر آزمایشگاه

SD : انحراف معیار مجاز هر پارامتر

نحوه تفسیر:

$DI < 1$ = نتیجه مناسب

$DI 1-2$ = قابل قبول اما بینابینی

$DI 2-3$ = نیاز به بررسی روش آزمایش و یا کالیبراسیون

$DI < 3$ = نیاز به اقدام فوری

¹¹ Deviation Index

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

به توصیه سازمان جهانی بهداشت، بررسی نتایج آزمایش‌های حاصل از دستگاه و مقایسه و مطابقت آن‌ها با مشاهده میکروسکوپی گسترش‌های خونی مربوطه و یافته‌های بالینی بیمار، باید از برنامه‌های دائمی کنترل کیفیت آزمایشگاه باشد. به این ترتیب، هرگونه نتیجه غیرقابل انتظار حاصل از دستگاه نظیر لکوسیتوز، لکوپنی، ترومبوسیتوپنی، هموگلوبین خیلی پایین یا بالا و اندک سهای غیرطبیعی باید پیش از گزارش با مشاهده گسترش خون محیطی یا بررسی وضعیت بالینی و یا سابقه بیمار تأیید شود.

نکته:

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

۱. آزمایش دستکم روی 3 نمونه (بدیهی است آزمایش روی تعداد نمونه‌های بیشتر

امکان دستیابی به نتایج صحیح تر را فراهم می‌نماید)؛

۲. انجام آزمایش دوتایی به روش دستی و دستگاهی روی هر نمونه و محاسبه میانگین

نتایج برای هر پارامتر با هر دو روش؛

۳. استفاده از آزمون آماری Paired t test برای مقایسه همخوانی نتایج.

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

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

n: تعداد نمونه‌ها

d: اختلاف نتایج روش دستی و دستگاهی برای هر نمونه

d: میانگین اختلاف نتایج

SD²: واریانس اختلاف بین نتایج

SE diff: تفاوت استاندارد میانگین دو گروه داده

مقادیر مجاز t با توجه به ضرایب اطمینان مختلف در جدول t test درج شده است. با استفاده از این جدول بر اساس

تعداد نمونه‌ها (n) و درجه آزادی (n-1) و در نظر داشتن ضریب اطمینان ۹۵٪، می‌توان عدد t مجاز را مشخص کرد.

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-d̄	(d-d̄) ²
%۴۵/۵	%۴۵	۰/۵	۰/۴۳۷	۰/۱۹
۳۹	%۳۸/۳	۰/۷	۰/۶۳۷	۰/۴
%۴۱/۷	%۴۱	۰/۷	۰/۶۳۷	۰/۴
		$\bar{d} = ۰/۰۶۳$	$\sum(d-\bar{d})^2 = ۰/۹۹$	

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

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

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

بر اساس جدول t با توجه به تعداد نمونه‌های مورد آزمایش (۳ نمونه) و درجه آزادی (۲(n-1))، مقدار t مورد قبول با ضریب اطمینان ۹۵٪ برابر ۴٫۳ است. کمتر بودن مقدار t محاسبه شده در این آزمایش (۰٫۱۵) از مقدار t مجاز (۴٫۳) نشان دهنده همخوانی و قابل قبول بودن نتایج است.

خطاهای دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی

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

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

۵. سطوح بسیار بالای چربی باعث کدر شدن پلاسما و در نتیجه افزایش کاذب مقدار هموگلوبین، MCH و MCHC می‌شود. برای حل این مشکل، اندازه گیری هموگلوبین باید به روش دستی و با افزودن حجم مناسبی از پلاسمای بیمار به بلانک و صفر کردن دستگاه اسپکتروفتومتر با آن انجام شود.

در جدول‌های شماره 4 تا 10 ، به موارد بیشتری اشاره می‌شود که ممکن است به نادرست بودن نتایج دستگاه‌های شمارنده سلولی خودکار منجر شوند. کاربر دستگاه علاوه بر آشنایی با موارد مندرج در این جدول‌ها باید از نحوه رفع این خطاها نیز آگاه باشد.

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

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

جدول شماره ۵: برخی از دلایل افزایش کاذب هموگلوبین

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

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

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

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

<p>۱. وجود پلاکت‌های درشت به تعداد زیاد ۲. افزایش چربی خون (ناپایدار) ۳. کرایوگلوبولینمی ۴. کرایوفیبرینوژنمی</p>	<p>افزایش کاذب تعداد گلبول‌های قرمز</p>
<p>۱. پان‌آگلوتیناسیون ناشی از ایجاد آگلوتینین‌های سرد وابسته به EDTA ۲. لیز گلبول‌های قرمز خارج از بدن به دنبال نگهداری نامناسب نمونه یا وجود گلبول‌های قرمز غیرطبیعی ۳. میکروسیتوز بسیار شدید یا تکه‌تکه شدن گلبول‌های قرمز در بعضی بیماری‌ها</p>	<p>کاهش کاذب تعداد گلبول‌های قرمز</p>
<p>۱. نگهداری خون در دمای اتاق ۲. آگلوتینین‌های سرد و آگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز وابسته به EDTA ۳. تعداد زیاد گلبول‌های سفید ۴. شرایط هیپراسمولار ۵. EDTA₂K اضافی</p>	<p>افزایش کاذب MCV</p>
<p>۱. گلبول‌های قرمز هیپوکرومیک ۲. افزایش دمای اتاق ۳. شرایط هیپواسمولار ۴. مخلوط کردن مکرر نمونه که باعث افزایش اکسیژناسیون گلبول‌های قرمز می‌شود</p>	<p>کاهش کاذب MCV</p>
<p>۱. افزایش کاذب MCV (غیر از مواقعی که به دنبال آگلوتینین‌های سرد رخ می‌دهد) ۲. کاهش کاذب تعداد گلبول‌های قرمز</p>	<p>افزایش کاذب هماتوکریت</p>
<p>۱. کاهش کاذب میزان MCV ۲. کاهش کاذب گلبول‌های قرمز به دلیل میکروسیتوز بسیار شدید یا لیز گلبول‌های قرمز خارج بدن ۳. آگلوتینین سرد ۴. مخلوط کردن مکرر نمونه که باعث افزایش اکسیژناسیون گلبول‌های قرمز می‌شود</p>	<p>کاهش کاذب هماتوکریت</p>

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

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

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

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

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

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

فصل سوم

روش‌های مرجع انجام آزمایش‌ها

اندازه‌گیری هموگلوبین به روش سیان مت هموگلوبین

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

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

KCN	0.05g
K3Fe (CN)	0.2g
KH2PO4 (Anhydrous)	0.140g
Nonionic Detergent	0.5-1ml
Clinical laboratory Reagent water(type I)	1000ml

این معرف در مدت ۵ دقیقه تمام هموگلوبین‌ها را غیر از سولفوهموگلوبین به سیان مت هموگلوبین تبدیل می‌کند.

کربوکسی هموگلوبین که در افراد سیگاری افزایش می‌یابد برای اکسید شدن به ۳۰ دقیقه زمان نیاز دارد.

- محلول درابکین را باید در ظرف‌های تیره در بسته از جنس بوروسیلیکات نگهداری نمود و در صورت مشاهده کدری دور ریخت.
- هنگام استفاده از این محلول‌ها و دفع آن‌ها، به علت سمی بودن، احتیاط‌های لازم باید از نظر ایمنی به کار رود.
- از درابکین با ترکیب‌های دیگر (غیر از فرمول بالا) نیز می‌توان استفاده نمود، ولی زمان کامل شدن واکنش طولانی‌تر و احتمال ایجاد کدری بیشتر است.
- برای انجام آزمایش می‌توان از نمونه خون مویرگی یا وریدی استفاده نمود، ولی استفاده از خون وریدی برتری دارد.
- ضد انعقاد مناسب، نمک‌های EDTA (دی سدیک یا دی پتاسیک) هستند که به مقدار $2,2 \text{ mg/ml}$ - $1,5$ به ازای هر میلی‌لیتر خون باید استفاده شوند.
- پس از خون‌گیری، باید نمونه را بلافاصله با ضد انعقاد مخلوط نمود.
- در صورت استفاده از k_3EDTA ، به دلیل ایجاد رقت در نمونه، میزان هموگلوبین تا 1% کاهش نشان می‌دهد.

روش آزمایش

- در روش معمول اندازه‌گیری هموگلوبین به روش دستی $0,02 \text{ ml}$ خون با 5 ml درابکین مخلوط و پس از طی مدت لازم برای کامل شدن واکنش، جذب نوری آن با فتومتر خوانده می‌شود.
- برای انجام آزمایش به‌منظور کالیبراسیون دستگاه شمارنده، از روش رقت زیاد استفاده می‌شود تا احتمال خطای ناشی از رقیق‌سازی کاهش یابد. برای اجرای این کار، می‌توان از روش‌های رقیق‌سازی زیر استفاده کرد:

- ۰,۰۴ ml خون با ۱۰ ml درابکین یا

- ۰,۴ ml خون با ۱۰۰ ml درابکین یا

- ۰,۱ ml خون با ۲۵ ml درابکین.

نکته:

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

در هر دو روش معمولی و با رقت زیاد، ابتدا نمونه خون توسط پیپت یا سمپلر با سرعت آهسته و ثابت کشیده می‌شود و پس از پاک کردن سطح خارجی پیپت یا سرسمپلر با پارچه بدون پرز، که با آب مقطر یا نرمال سالین مرطوب شده، داخل لوله آزمایش تخلیه می‌شود. نمونه باقی‌مانده در پیپت یا سرسمپلر، باید با ۸ تا ۱۰ بار برداشت و تخلیه، با محتویات لوله کاملاً شسته شود. برای مخلوط شدن کامل خون و درابکین، پس از ۵ تا ۶ بار سروته نمودن لوله، باید محلول را برای کامل شدن واکنش پیش از خواندن جذب نوری، ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری نمود.

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

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

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

منابع خطا

- تکنیک نامناسب خون‌گیری و ریدی که با تغلیظ نمونه سبب افزایش کاذب مقدار هموگلوبین و شمارش سلولی می‌شود؛
- استفاده از تجهیزات بدون سوابق کنترل کیفیت و کالیبراسیون؛
- آگاهی ناکافی کارکنان از نحوه صحیح انجام آزمایش و منابع خطا؛
- مخلوط نمودن ناکافی نمونه پیش از آزمایش؛
- وجود لخته در نمونه؛

- نگهداری درابکین در مقابل نور یا یخ زدن؛
- استفاده از استاندارد خراب یا تاریخ مصرف گذشته (به ویژه اگر پس از باز شدن مدت طولانی در دمای اتاق بماند)؛
- کالیبراسیون نادرست اسپکتروفتومتر؛
- عملکرد نامناسب اسپکتروفتومتر ناشی از کافی نبودن زمان گرم شدن دستگاه یا بیش از حد گرم شدن دستگاه، اختلالات مربوط به منبع نوری، فتوسل، ولتاژ، خطی نبودن دستگاه، صحیح قرارنگرفتن کووت و یا استفاده از کووت کثیف یا خش دار.

روش اندازه گیری حجم سلول های متراکم شده به روش میکروهماتوکریت

PCV نسبت حجم گلبول های قرمز متراکم شده به حجم خون کامل است. این نسبت پس از سانتریفوژ مناسب نمونه خون به دست آمده و ترجیحاً به صورت اعشاری گزارش می شود (مانند ۰,۴۲ به جای ۴۲٪). روش مرجع اندازه گیری حجم سلول های متراکم شده، روش میکروهماتوکریت است که برای کالیبراسیون دستگاه های شمارنده نیز استفاده می شود.

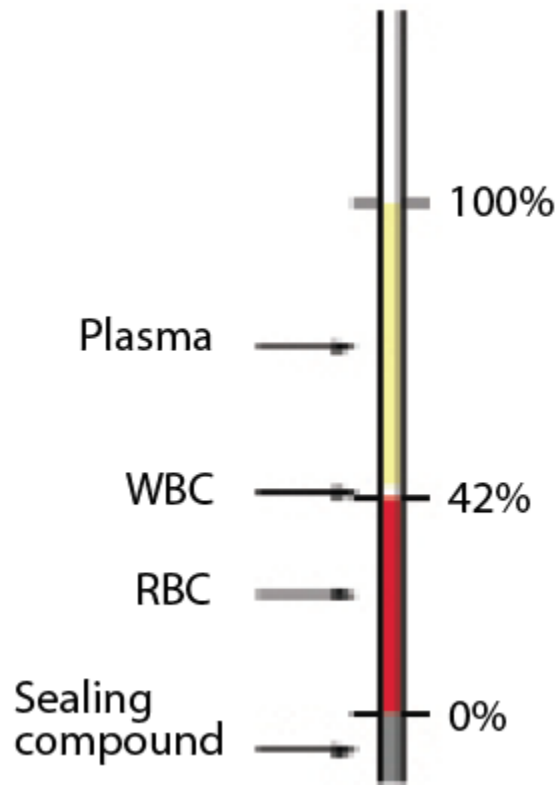
*نکته های مهم در آزمایش اندازه گیری حجم گلبول های قرمز متراکم شده

- انجام آزمایش با استفاده از خون مویرگی، شریانی و وریدی امکان پذیر است.
- در جمع آوری نمونه به طریق مویرگی، از لوله های هپارینه حاوی حداکثر ۷ واحد هپارین به ازای هر لوله مویینه استفاده می شود.

- می‌توان نمونه را پس از جمع‌آوری در دمای اتاق نگهداری و حداکثر در مدت ۶ ساعت پس از نمونه‌گیری آزمایش نمود.
- نمونه‌ها باید به روش دوتایی آزمایش شوند. مقدار هماتوکریت نمونه‌های دوتایی نباید بیش از ۰,۰۰۵ (۵,۰٪) با یکدیگر اختلاف داشته باشند.
- در صورت انجام این آزمایش، به‌منظور کالیبراسیون دستگاه شمارنده فقط باید از ضد انعقاد k2EDTA استفاده شود تا از چروکیدگی گلبول‌های قرمز جلوگیری شود. استفاده از ضد انعقاد k3EDTA به علت ایجاد چروکیدگی در گلبول‌های قرمز میزان MCV را ۲٪ کاهش می‌دهد. در صورت استفاده از ضد انعقاد مایع، ضریب رقت باید محاسبه شود.
- توصیه می‌شود برای انجام آزمایش کالیبراسیون دستگاه شمارنده از لوله‌های موپینه با حلقه‌آبی (بدون ضد انعقاد) استفاده شود.
- هنگام خواندن نتیجه با خط کش مخصوص، مقدار بافی کوت در نظر گرفته نشود.
- خطای قابل قبول اندازه‌گیری حجم سلول‌های متراکم شده به روش میکروههماتوکریت $\pm 1\%$ است.

روش آزمایش

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



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

منابع خطا

- توقف جریان خون^{۱۲} به علت بستن طولانی تورنیکه که باعث افزایش غلظت خون می‌شود؛
- خون‌گیری‌های سخت و طولانی به دلیل ورود مایع بین بافتی به فضای داخل عروقی که باعث رقیق یا لخته شدن خون می‌شود؛
- همولیز در اثر استفاده از سرسوزن نازک؛
- مخلوط نشدن نمونه با ضد انعقاد؛

¹² Stasis

- پر یا مسدود کردن نادرست انتهای لوله هماتوکریت؛
- مسدود کردن انتهای لوله با حرارت؛
- خطای دید هنگام خواندن نتیجه آزمایش؛
- محاسبه بافی کوت به عنوان جزئی از ستون گلبول‌های قرمز هنگام خواندن نتیجه آزمایش؛
- خطای به دام افتادن پلاسما^{۱۳} که این مورد در آنمی‌های ماکروسیتیک کم و در اسفروسیتوز، تالاسمی و آنمی سیکل سل زیاد است. در حالت طبیعی، میزان پلاسمای به دام افتاده ۱٪ تا ۳٪ است که هنگام کالیبراسیون دستگاه شمارنده باید ۲٪ در نظر گرفته شود.

جدول شماره ۱۱: علل کاهش و افزایش کاذب هماتوکریت

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

¹³ Plasma Trapping

ویژگی‌های دستگاه میکروهماتوکریت استاندارد

- شعاع چرخش بیشتر از 8cm
- توانایی رسیدن به حداکثر سرعت در 30 ثانیه؛
- توانایی ایجاد RCF حدود 10000 g تا 12000 g در محیط، حداقل به 5 دقیقه بدون افزایش دما از 45°C؛
- داشتن زمان سنج خودکار (باقابلیت تنظیم حداقل 30 ثانیه).

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

^{۱۴}RCF: میدان نسبی سانتیفریوژ

^{۱۵}RPM: دور در دقیقه

کنترل کیفیت و بررسی کالیبراسیون دستگاه میکروهماتوکریت

دستگاه میکروهماتوکریت باید توانایی ایجاد حداقل نیرویی برابر با 10000 g به مدت 5 دقیقه را دارا باشد.

کنترل کیفیت دستگاه باید هر سه ماه انجام شود. برای انجام این کار بررسی موارد

¹⁴ Relative Centrifugal Field

¹⁵ Revolution Per Minute

زیر ضروری است:

- سرعت سانتریفوژ،
- زمان سنج،
- حداکثر توان در تجمع سلول‌ها^{۱۶}

سرعت سانتریفوژ (دور در دقیقه) و عملکرد زمان سنج دستگاه به ترتیب با تاکومتر کالیبره و کرومومتر ارزیابی می‌شوند. برای بررسی حداکثر توان دستگاه در تجمع سلول‌ها از خون تازه استفاده می‌شود.

برای انجام این امر دو نمونه خون تازه حاوی ضد انعقاد EDTA دی پتاسیک که به خوبی مخلوط شده‌اند را به صورت دوتایی به مدت دو دقیقه سانتریفوژ کرده و مقادیر PCV آن‌ها ثبت می‌شود. سپس، زمان سانتریفوژ را 30 ثانیه به 30 ثانیه افزوده تا زمانی که میزان دو هماتوکریت اندازه‌گیری شده پی‌درپی بدون تغییر بماند. این زمان به عنوان حداقل زمان لازم برای متراکم نمودن گلبول‌های قرمز در نظر گرفته می‌شود. این آزمایش بهتر است حداقل با یک نمونه دارای هماتوکریت ۰,۵ (۵۰٪) یا بیشتر نیز انجام شود.

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

این مورد پس از خرید و پیش از شروع به کار با دستگاه و حداقل هر 6 ماه یکبار باید انجام شود.^{۱۶}

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

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

داده‌های جدول بالا نشان می‌دهد که زمان متراکم نمودن گلبول‌های قرمز در دستگاه میکروهما توکریت مورد آزمایش، ۳,۵ دقیقه برای آزمایش نمونه‌های با میزان هماتوکریت کمتر از ۰,۵ و ۴,۵ دقیقه برای نمونه‌ای با هماتوکریت بیشتر از ۰,۵ است.

ارزیابی عملکرد دستگاه میکروهما توکریت به روش توصیه شده سازمان جهانی بهداشت به صورت زیر انجام می‌شود:

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

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

شمارش سلول‌های خونی به روش دستی

شمارش گلبول‌های سفید و پلاکت‌ها به روش دستی، جایگزین قابل قبولی برای دستگاه‌های شمارنده سلولی است، ولی برای شمارش گلبول‌های قرمز کاربرد زیادی ندارد؛ زیرا در آزمایشگاه‌ها در شرایط معمول برای شمارش‌های دستی، حدود 400 گلبول قرمز شمارش شده که موجب عدم دقت زیاد در شمارش این سلول‌ها می‌شود.

برای شمارش سلول‌های خونی به روش دستی از هماسیتومتر (نئوبار اصلاح شده) استفاده می‌شود که بر روی آن ۹ فضای خط‌کشی شده با مساحت $1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$ تعبیه شده است. پس از قرار گرفتن لامل سنگین (دارای سطح صیقلی) روی آن فضایی با حجم 1 mm^3 ایجاد می‌شود.

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

شمارش گلبول‌های سفید

برای شمارش گلبول‌های سفید، خون حاوی ضد انعقاد EDTA با محلول حاوی ماده رنگی مخلوط می‌شود که علاوه بر لیز گلبول‌های قرمز، هسته گلبول‌های سفید را نیز به رنگ بنفش سیاه درمی‌آورد. برای انجام این آزمایش استفاده از ضد انعقاد هپارین توصیه نمی‌شود. محلول رنگی با استفاده از اسید استیک ۲٪ (۲۰ ml/L) تهیه می‌شود که با اضافه نمودن چند قطره ویولهٔ دوژانسیان به رنگ بنفش درآمده است.

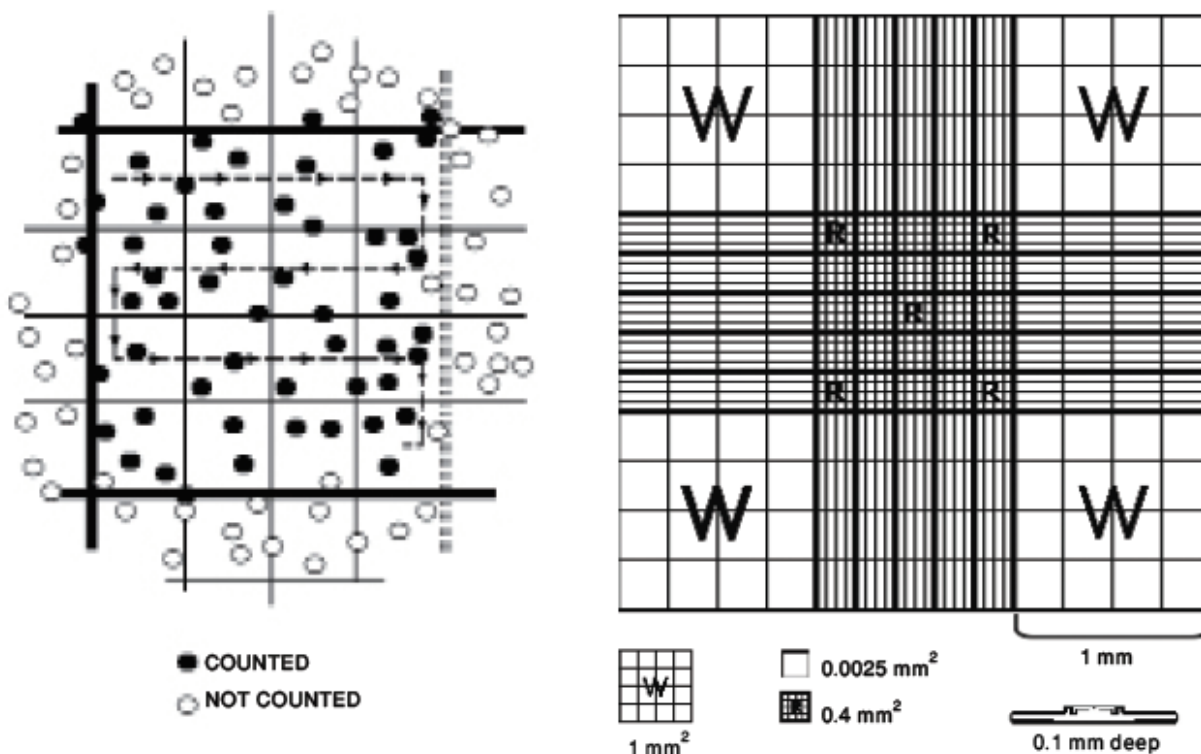
نکته:

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

روش آزمایش

برای انجام آزمایش، در لولهٔ آزمایش پلاستیکی یا شیشه‌ای، ۰،۱ ml از خونی که به خوبی مخلوط شده به ۱،۹ ml محلول رقیق‌کننده اضافه می‌شود تا رقت ۱/۲۰ ایجاد شود (مخلوط کردن ناکافی خون پیش از تهیه رقت، موجب خطای زیاد در نتیجهٔ آزمایش می‌شود). پس از بستن دهانهٔ لوله، با استفاده از مخلوط‌کننده‌های مکانیکی یا سروته

نمودن آن با دست با زاویه 120° و چرخاندن هم‌زمان به مدت ۲ دقیقه، محتویات لوله کاملاً مخلوط می‌شود. با این کار، حباب‌های هوا نیز با محلول مخلوط می‌شوند. سپس، بلافاصله با استفاده از پیپت یا لوله موینه، فضای زیر لامل ضخیم در هماسیتومتر در یک مرحله از این مخلوط پرمی شود. به‌منظور ته‌نشین شدن سلول‌ها، هماسیتومتر باید به مدت ۲ دقیقه روی سطحی صاف، بدون لرزش و دور از نور خورشید و حرارت نگهداری و سپس، شمارش سلول‌ها انجام شود. گلبول‌های سفید باید در چهار مربع کناری و در دو طرف محفظه شمارش شوند. در این مربع‌ها، علاوه بر شمارش گلبول‌های داخل این فضا، گلبول‌هایی که روی اضلاع بالایی و سمت چپ هستند نیز شمارش می‌شوند؛ ولی گلبول‌های روی اضلاع سمت راست و پایینی مربع در شمارش ب ه حساب نمی‌آیند.



تصویر شماره ۷: نمایی از فضاهای هماسیتومتر به‌کاررفته برای شمارش گلبول‌های سفید

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

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

طبق توصیه سازمان جهانی بهداشت، حداقل ۱۰۰ گلبول سفید باید شمارش شود، ولی برای دستیابی به عدم دقت (CV) ۵٪، شمارش ۴۰۰ سلول الزامی است. برای به حداقل رساندن خطای ناشی از پراکندگی نامناسب سلول‌ها، توصیه هم می‌شود که شمارش گلبول‌های سفید در کل فضای خط‌کشی شده هماسیتومتر (۹ فضای ۰,۱ میکرولیتر) انجام گیرد.

برای محاسبه تعداد گلبول‌های سفید می‌توان از فرمول زیر استفاده نمود:

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

برای مثال، اگر در ۰,۹ میکرولیتر (۹ فضای خط‌کشی شده) ۴۲۰ گلبول سفید شمارش شود، تعداد کل گلبول‌های سفید به طریق زیر محاسبه می‌شود:

$$\frac{420 \times 20 \times 10^6 \times 10}{9} = 9,3 \times 10^9 /L$$

شمارش پلاکت

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

روش آزمایش

محللول رقیق‌کننده حاوی اکسالات آمونیوم آبی ۱٪ (۱۰ g/L) است که موجب لیز گلبول‌های قرمز می‌شود. پیش از تهیه رقت باید از نبود لخته در نمونه اطمینان حاصل کرد. در صورت وجود لخته، باید دوباره نمونه‌گیری انجام شود. برای تهیه رقت ۱/۲۰، ۰٫۱ ml خون کاملاً مخلوط شده با ۱٫۹ ml محللول رقیق‌کننده مخلوط می‌شود، این مخلوط باید به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه روی مخلوط‌کننده مکانیکی قرار گیرد. سپس، هماسیتومتر با روش ذکر شده برای شمارش گلبول‌های سفید از این مخلوط پر و برای ته‌نشین شدن پلاکت‌ها، حداقل ۲۰ دقیقه در ظرف پتری که کف آن کاغذ صافی مرطوب قرار داد، نگهداری می‌شود. پس از گذشت مدت ذکر شده، پلاکت‌ها با میکروسکوپ شمارش می‌شوند. در صورت پایی نبردن کندانسور میکروسکوپ، پلاکت‌ها به صورت ذرات کوچک درخشانی قابل‌رؤیت هستند. به‌طور معمول، پلاکت‌ها در مربع مرکزی هر محفظه شمارش می‌شوند، ولی شمارش پلاکت‌ها باید در یک یا بیشتر از فضاهای ۱ mm² (حجم ۰٫۱ میکرولیتر) انجام شود. برای دستیابی به عدم دقت ۰٫۸٪ تا ۱٫۰٪، شمارش حداقل ۲۰۰ پلاکت الزامی است.

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

میزان ساخت محلول رقیق کننده در هر بار نباید از ۵۰۰ ml بیشتر باشد و برای تهیه از ظرف های شیشه ای تمیز و آب مقطر یا دیونیزه استفاده شود. در صورت امکان، رقیق کننده با استفاده از فیلتر ۲۲µm صاف و در یخچال نگهداری شود. در غیر این صورت، هر روز پیش از انجام آزمایش حجم مشخصی از آن با دور بالا سانتریفوژ شده و از محلول رویی برای رقیق کردن استفاده شود.

۱. خطاهای تکنیکی

- خطاهای جمع‌آوری نمونه؛
- مخلوط نکردن کامل نمونه؛
- پیپت کردن نادرست (استفاده از پیپت و هماسیتومتر غیر کالیبره و غیراستاندارد)؛
- استفاده از لامل عادی به جای ضخیم (سنگین)؛
- مخلوط نکردن کافی نمونه با رقیق‌کننده؛
- پر کردن نادرست اسلاید؛
- شمارش نادرست سلول‌ها.

۲. خطاهای ذاتی

این خطاها به پراکندگی غیریکنواخت سلول‌ها در نواحی مختلف اسلاید مربوط است که با مخلوط نمودن کافی محلول پیش از پر کردن محفظه‌های اسلاید نیز برطرف نمی‌شود. فقط شمارش سلول‌ها به تعداد زیاد می‌تواند این خطا را کاهش دهد.

- جدول زیر میزان پراکندگی نتایج شمارش دستی گلبول‌های سفید را در مقایسه با تعداد سلول‌های شمارش شده نشان می‌دهد. با افزایش تعداد سلول‌های شمارش شده، میزان پراکندگی نتایج کاهش می‌یابد.

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

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

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.

۱۲. داهیم پ، دستگاه های خودکار شمارنده سلولی (اساس کار، کالیبراسیون، کنترل کیفیت و خطاها)، اول، مرکز

نشر صدا، تهران، ۲۰۱۰