دکتر حسین دارآفرین ، مهندس امیرحسین بحرالعلومیان و سایر همکاران
(برگرفته از کتاب مدیریت و کنترل کیفی در آزمایشگاه پزشکی)

الزامات و دستورالعمل فنی تجهیزات در آزمایشگاه پزشکی

نکات فنی کوآگولومتر (نیمه اتوماتیک)

کلیات

دستگاه های کوآگولومتر، آزمایش های انعقادی مختلفی از جمله PT و PTT و فیبرینوژن و ... را اندازه گیری می کند. این دستگاه ها جهت بررسی زمان تشکیل لخته در نمونه پلاسما طراحی شده و اغلب برای محاسبه این زمان از مکانیزم های زیر استفاده می شود:

۱-**Photo-Optical**: در این روش نور منتشره پس از عبور از پلاسما و برخورد به لخته، به وسیله یک کالیماتور، ردیابی و داده ها پردازش می شود.

۲- **Electromechanical**: در این نوع دستگاه‌ها با استفاده از گویچه استیل و بررسی مقاومت الکتریکی، سرعت تشکیل لخته چک می شود.

۳- **Electrochemical**: در برخی وسایل Point of Care استفاده می شود.

چگونگی کاربری

با توجه به تنوع دستگاه بر اساس کتابچه راهنما تدوین می‌شود.

نحوه نگهداری

- **هفتگی**: صفحه رویی دستگاه با پارچه نرم و الکل ۷۰٪ ضدعفونی و تمیز شود.
- **ماهانه**: محفظه های دستگاه باید هر ماه تمیز شود.
- **سالانه**: دستگاه باید سالی یکبار توسط شرکت پشتیبان سرویس شود. دمای انکوباتور دستگاه سالانه توسط شرکت پشتیبان چک شده و گواهی کالیبراسیون جهت نگهداری در Log Book دستگاه به آزمایشگاه داده شود.

نحوه گزارش آزمون انعقادی Prothrombin Time (PT)

در گزارش آزمایش PT علاوه بر مقدار زمان PT بر حسب ثانیه، باید International Normalized Ratio (INR) به ویژه برای بیمارانی که تحت درمان با وارفارین هستند نیز گزارش شده و در برابر محدوده مرجع به پزشک اعلام شود. جهت محاسبه INR نیاز به محاسبه میانگین PT نرمال (MNPT) است که در ادامه نحوه محاسبه آنها بیان میشود.

- **محاسبه میانگین PT نرمال (MNPT :Mean Normal PT)**

با توجه به اینکه برای محاسبه INR (مطابق فرمول مندرج در صفحه بعد) نیاز به تعیین میانگین هندسی (Geometric) زمان پروترومبین یا MNPT است، هر آزمایشگاه باید با توجه به ترکیب کیت/ دستگاه خود MNPT مرکز را به صورت زیر محاسبه و در گزارش نهایی INR مورد استفاده قرار دهد.

در ابتدا پلاسمای حداقل ۲۰فرد سالم با طیف سنی وسیع (۸۰-۲۰ سال)، (بهتر است تعداد زن و مرد مساوی باشد، افراد غیرسیگاری بوده و داروی ضد انعقاد مصرف نکرده باشند، زنان باردار نبوده و ocp مصرف نکرده باشند) تهیه می‌شود و PT آنها را توسط کوآگولومتر کالیبره شده مرکز، اندازه گیری کرد. میانگین Geometric

(هندسی) نتایج حاصله به عنوان میانگین نرمال (PT) به صورت زیر محاسبه می شود:

$$\text{mean normal (PT)} = \sqrt[n]{\prod_{i=1}^{n} PTi} = \sqrt[n]{PT1 \times PT2 \times PT3 \times \ldots}$$

یا

$$\log mean\ \text{normal}(PT) = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} logPTi = \frac{1}{n}(\log PT1 + logPT2 + \cdots$$

محاسبه MNPT توسط ماشین حساب رایانه به سادگی میسر است. در منوی start گزینه calculator را انتخاب کرده و در منوی view گزینه scientific را انتخاب کنید. سپس ارقام PT حاصل از ۲۰ نمونه را در هم ضرب کرده و بر روی صفحه کلید ماشین حساب کلید X^Y را فشرده و پس از آن عدد ۰/۰۵ (ماحصل ۱/۲۰ و در صورتیکه تعداد نمونه (n) ۲۰ نباشد، ماحصل n/۱ را به صورت رقم اعشار) را تایپ کرده و کلید enter را فشرده و عدد حاصله را گرد کرده و به عنوان MNPT گزارش کنید.

با تغییر روش اندازهگیریPT، سری ساخت محلول یا کیت و دستگاه، MNPT باید مجدد محاسبه شود. لازم به ذکر است که به هیچ عنوان نباید از میانگین حسابی در این آزمون استفاده کرد.

- **نحوه محاسبه INR**

INR براساس فرمول $INR = (\frac{PT\ patient}{MNPT})^{ISI}$ محاسبه می شود.

در محاسبه INR بیماران میبایستی تا زمانی که سری کیت مصرفی، کمپانی سازنده و سری ساخت آن و یا روش انجام تست (دستی-دستگاهی) تغییر نکرده، در مخرج کسر از عدد ثابت محاسبه شده MNPT در آن آزمایشگاه استفاده کنید.

در صورت تعویض کیت (سری ساخت، کمپانی و...) و یا روش آزمایش میبایستی مجددا MNPT محاسبه شود تا جهت محاسبه INR با کیت جدید مورد استفاده قرار گیرد.

جهت محاسبه INR از قراردادن عدد کنترل روزانه در مخرج کسر جدا خودداری شود.

- **محدوده مرجع**

هر آزمایشگاه بایستی محدوده مرجع برای آزمایش های PT و PTT خود را تعیین کرده و آنها را حداقل یکبار در سال و یا در صورت تغییر در سری ساخت کیت و یا هرگونه تغییر در سامانه جمع آوری نمونه و هر نوع تغییر در دستگاه، تایید نماید.

◀ تعیین محدوده مرجع

حداقل ۱۲۰ نمونه برای تعیین محدوده مرجع برای معتبر بودن محاسبات، بسته به توزیع نتایج توصیه می شود. خصوصا این مسئله در زمانی که کارخانه ها معرف های PTT/PT را با متد جدیدی تولید می کنند مهم است.

در انجام تست روتین PT و PTT در هر آزمایشگاه به طور عملیاتی میتوان حداقل از نمونه تازه ۱۲۰ فردی که از نظر سن و جنس مشابه بیماران آن مرکز هستند استفاده کرد. این افراد میبایستی سالم باشند و در ۱۸ تا ۲۴ ساعت اخیر دارو مصرف نکرده و ورزش شدید انجام نداده باشند. ابتدا برای حداقل ۱۲۰ فرد سالم با شرایط فوق الذکر، توسط کیت مربوطه، آزمایش PT انجام شود. برای اینکه از نرمال بودن توزیع این نمونه ها اطمینان حاصل شود، مقادیر به دست آمده در نرمافزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار می گیرد.

(ازمسیر Analyze > Nonparametric > one Sample ks)

چنانچه توزیع مقادیر فوق نرمال باشد، محدوده مرجع معادل MNPT±۲SD است. در صورت نیاز، محدوده ۹۵٪ اطمینان حد بالا و پایین

(Confidence Intervral) از رابـطه زیر محاسبه می شود:

- محدوده حد بالا $= \mathrm{MNPT} + 2\mathrm{SD} \pm (2.81 \times \frac{SD}{\sqrt{n}})$
- محدوده حد پایین $= \mathrm{MNPT} - 2\mathrm{SD} \pm (2.81 \times \frac{SD}{\sqrt{n}})$

بـرای مطالعه بیشتر به مبحث تعیین محدوده مـرجـع در منابـع معتـبر از جملـه CLSI ۲۰۰۸–H۴۷–A۲ و ... مراجعه شود.

◀ تایید محدوده مرجع

در صورتیکه تعیین محدود مرجع انجام پذیر نباشد آزمایشگاه باید محدوده نرمال مورد استفاده خود را (که از کتب مرجع استخراج کرده)، تایید (validate) نماید و این کار با انجام آزمایش به روی نمونه ۲۰ فرد نرمال انجام میشود. چنانچه بیش از ۲ نتیجه خارج از محدود رفرانس نباشد، آن محدوده مورد تایید است.

کنترل کیفی

۱)کنترل دقت

شامل انجام تست به صورت double به روی هر نمونه (در صورتی که آزمایش به روش دستی انجام می شود) بررسی تکرارپذیری و رسم نمودار کنترل کیفی است.

انجام آزمایش به صورت دوبل:

آزمایش هـای انعقادی به صورت دوگانه انجام می شوند که این امر در روش دستی ضروری است ولی در روش های دستگـاهـی ضرورتی بـرای ایـن کـه همه تست ها به صورت دوتایی انجام شوند وجود ندارد و تمام نمونه ها به صورت دوبل (دوتایی) آزمایش شده و چنانچه حداکثر به اندازه ۱۰ درصد میانگین با هم فاصله داشته باشند قابل قبول بوده و میانگین آنها به عنوان نتیجه آزمایش گزارش می شود و در غیر این صورت تکرار آزمایش ضروری است.

محاسبه SD و رسم نمودار کنترل کیفی

برای محاسبه SD و CV، می‌بایست پلاسما کنترل تجاری در دو سطح و یا در صورت در دسترس نبودن پلاسما کنترل تجاری، این آزمایش با اسـتفاده از(Normal Pooled Plasma(NPP و (Abnormal Pooled Plasma(ANPP انجام پذیر است.

برای تهیه پلاسمای پولد در حجم انبوه به شیوه زیر عمل می شود:

حداقل ۲۰ نمونه نرمال (پلاسمای مرد و زن با شرایط مناسب از جمله زنان غیربارداردار و افراد بدون مشکل انعقادی و غیرسیگاری) را جمعآوری کرده و پس از سانتریفیوژ (۱۰ دقیقه و g۴۰۰۰) پلاسمای آنها جدا گردده و در لوله پلاستیکی ریخته شود پس این پلاسماها در فریزر ۷۰- منجمد شده و زمانی که میزان آنها به حجم مورد نظر رسیده همگی آنها را در دمای ۳۷C° ذوب کرده و مخلوط نموده و مجددا سانتریفیوژ نمایید. سپس در مقادیر کم تقسیم کرده و در فریزر ۷۰C°- نگهداری کنید. برای به دست آوردن پلاسمای پولد غیرطبیعی میتوان پلاسمای پولد نرمال را به نسبت ۱ به ۳ با بافر فسفات سالین (pH=۷/۲) رقیق کرد.

این نمونه ها را می توان دردمای C° ۲۰- به مدت ۲ هفته یا در ۷۰°- به مدت ۶ ماه ذخیره نمود. برای تعیین تکرارپذیری با پلاسما کنترل، ۲۰ روز متوالی یا ۵ روز متوالی (هر روز ۴نوبت) آزمایشPT را انجام داده و سپس میانگین و CV را محاسبه کنید. حداکثر CV قابل قبول ۵ درصد یا بر اساس مقدار اعلام شده در کیت است.

پس از محاسبه میانگین و انحراف معیار، مقادیر ±۱SD، ±۲SD و±۳SD برای هر پارامتر بر روی محور عمودی و روزها بر روی محور افقی ثبت می‌شود. تفسیر نمودار کنترل کیفیت با استفاده از قوانین وستگارد، لوی جنینگ و یا سازمان بهداشت جهانی براساس طراحی کنترل کیفی در آزمایشگاه صورت می گیرد. لازم به ذکر است که در آزمایشگاه‌هایی که تعداد نمونه های روزانه آنها زیاد است، بایستی به ازای هر ۲۰ نمونه یا هر ۴۰ نمونه، یک نمونه کنترل، آزمایش شود و به طور روزانه و به ازای هر داده این تفسیر صورت پذیرد. ضمنا پیشنهاد می شود تا مواد،

کالیبراتورها و سایر معرف‌ها برای دستیابی به نتایج صحیح تر، حداقل برای شش ماه تهیه شود.

برای بررسی تکرارپذیری دستگاه، در پایان هر ماه می توان با استفاده از داده‌های نمونه کنترل روزانه، میانگین، SD و CV را محاسبه نموده و یا ماهانه نمونه پلاسما کنترل یا pooled plasma را حداقل ۱۰ بار آزمایش و CV را مشخص کرد.

۲) اندازه گیری پلاکت پلاسما

هر ۶ماه یکبار برای اطمینان از poor platelet بودن پلاسمای نمونه‌ها، میزان پلاکت پلاسمای نمونه سانتریفیوژ شده (با g۱۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه) اندازهگیری میشود که باید کمتر از ۱۰۰۰۰ در میکرولیتر باشد.

تهیه صحیح Platelet Poor Plasma (PPP) به ویژه برای آزمون‌های mixed PTT ، APC–R ، Lupus Antico-agulant و تست‌های تخصصی انعقادی اهمیت دارد.

لازم به ذکر است که در مواردی که نیاز به فریز کردن و ذخیره نمونه است باید پلاسما عاری از پلاکت باشد که این حالت با سانتریفیوژ کردن مجدد نمونه حاصل می شود.

۳) بررسی صحت

بررسی صحت شامل موارد زیر است:

الف) استفاده از پلاسما کنترل تجاری

استفاده از پلاسما کنترل تجاری در دو سطح که توسط کالیبراتور صحه گذاری شده است، یکی از روش‌های قابل اعتماد بررسی صحت در آزمون‌های انعقادی است که متاسفانه در ایران با توجه به تنوع دستگاه‌ها، به طور گسترده در دسترس تمامی آزمایشگاه قرار ندارد. به همین دلیل روش دوم پیشنهاد می شود.

ب) شرکت در برنامه کنترل کیفی خارجی

همچنین برای بررسی صحت میتوان در برنامه‌های کنترل کیفی خارجی شرکت کرد و براساس نتایج به صحت عملکرد پیبرد.

برای توضیح بیشتر در این خصوص به مبحث بررسی صحت دستورالعمل فنی دستگاه شمارنده خودکار سلول‌های خونی مراجعه شود.

ج) صحت ISI تعیین شده توسط تولید کننده کیت

مقدار ISI گزارش شده در کیت تولیدی توسط شرکت با استفاده از روش استاندارد WHO و با مقایسه نتایج PT حاصل از کیت با International Reference Preparation(IRP) به دست می آید. در این روش تعیین ISI منابعی بالقوه از خطا وجود دارد که می تواند تاثیر قابل توجهی در نتایج به‌دست آمده از کیت بگذارد. از این منابع خطا می توان به‌طور مثال از مواردی مانند شرایط محیطی، عملکرد هر دستگاه به‌عنوان یک فاکتور مستقل و یا تطابق دستگاه و مواد مورد استفاده برای انجام تست (تعلق هر دو به یک شرکت) را نام برد.

گاه مجموعه‌ای از این خطاها می تواند تفاوت چشمگیری را بین INR حقیقی ایجاد نماید. اینگونه خطاها باید توسط هر آزمایشگاه به حداقل برسد.

ISI ارایه شده توسط شرکت گاه اصطلاحا «ژنریک» بوده و برای دستگاه خاصی ارایه نشده و کلا برای روش‌های مشابه مثل End point قابل استفاده است. در حالت دوم ISI ارایه شده اصطلاحا "Instrument–Specific" است، یعنی صرفا برای مجموعه خاص "Reagent–Instrument" تعیین شده است. در مطالعات متعددی نشان داده شده که صحت ISI گزارش شده در مواردی که از ISI مختص به دستگاه استفاده می شود به مراتب بیشتر از زمانی است که از ISI ژنریک استفاده می شود. طیف این تفاوت بین INRهای گزارش شده با این دو شرایط مختلف میتواند بین ۱۵ تا ۳۰ درصد باشد که کاملا به لحاظ بالینی دارای اهمیت است. با توجه به توضیحات فوق ISI ارایه شده توسط شرکت حتما باید مجددا تعیین و تایید شود، علی‌الخصوص اگر آزمایشگاهی از ISI ژنریک استفاده میکند و یا دستگاه و مواد اولیه مورد استفاده با یکدیگر تطابق نداشته باشند، این کار باید حتما انجام شود.

در مرحله اول، ابتدا باید ISI verification انجام شود که مراحل آن به طور خلاصه چنین است: این فرآیند به سه نمونه Certified plasma نیاز دارد که استاندارد بوده و توسط FDA تایید شده و عدد INR آنها از قبل مشخص و بین INR ۱/۵ تا ۴/۵ قرار دارد. این پلاسماها کاملا مشابه نمونه های بیماران تحت آزمایش قرار میگیرد. PT و INR برای هر پلاسما به مدت۳ روز و هر روز ۲ بار انجام می شود. پس از تعیین میانگین INR بدست آمده از تست های صورت گرفته، نتیجه آن با INR تعیین شده از طرف شرکت مقایسه می شود و اگر اختلاف INR ها کمتر از ۱۵٪ بود، کیت و ISI تعیین شده و مورد استفاده آن قابل قبول است. اگر اختلاف INR بیش از ۱۵٪ باشد، آنگاه کالیبراسیون ISI و تعیین آن به صورت لوکال ضروری است، یعنی قبل از این که نتایج بیماران گزارش شود باید فرآیند کالیبراسیون انجام شده باشد. قبل از انجام کالیبراسیون لوکال ISI، آزمایشگاه باید مطمئن باشد که:

۱) دستگاه به گونه ی مطلوب کار می کند.

۲) آماده سازی معرف ها (Reagents) و آب کردن آنها صحیح انجام شده باشد.

۳) میانگین هندسیPT افراد طبیعی به صورت صحیح محاسبه شده باشد.

۴) اشتباه فردی و دفتری در ثبت اعداد اتفاق نیفتاده باشد.

اگر آزمایشگاه از همه موارد فوق مطمئن باشد، می تواند کالیبراسیون ISI را انجام دهد. برای انجام کالیبراسیون باید از کیت کالیبراسیون استفاده کرد که به صورت تجاری تهیه شده و دارای تاییدیه FDA است. تعداد Certified plasma بسته به شرایط مختلف متفاوت بوده ولی حداقل در ۴سطح مختلف است که هر کدام از پلاسماها عدد PT مشخص و تعریف شدهای دارد. مانند حالت و فرآیند قبلی PT هر پلاسما سه روز و هر روز دو بار تکرار میشود و میانگین آن مشخص میشود. CV این اعداد به دست آمده باید کمتر از ۳٪ باشد. اعداد به دست آمده به روش فوق همراه با اعداد PT از قبل assign شده بر روی یک منحنی در مقابل هم قرار می گیرد و به لحاظ آماری orthogonal regression line برای آنها محاسبه می شود.

Slope به دست آمده برای این خط، همان ISI لوکال صحیح است که باید برای دستگاه استفاده شود.

کالیبراسیون

در صورتی که نتایج کنترل کیفی مورد قبول نباشد (پس از خطایابی مشکل در دستگاه باشد) بایستی کالیبراسیون دستگاه انجام شود. همچنین در مواردی که تغییر سری ساخت کیت، سایر اجزای فیزیکی و یا تغییر روش باعث تغییر در صحت نتایج آزمایش ها شود، انجام یا تایید کالیبراسیون ضروری است.

ایمنی

- فقط از آداپتور مخصوص خود دستگاه استفاده شود.
- دستگاه باید در جای محکم و بدون ارتعاش باشد.
- در هنگام عدم استفاده از دستگاه باید آداپتور از برق خارج شود.

به منظور پیشگیری از اثرات نوسانات جریان الکتریکی لازم است که:

- دستگاه به سیستم تثبیت کننده ولتاژ برق (Voltage Regulator) یا سیستم تامین کننده برق اضطراری (UPS) که دارای تثبیت کننده ولتاژ داخلی میباشد، متصل شود.
- سیستم برق دستگاه باید دارای سیم اتصال به زمین مناسب (ارتدار) باشد.

ماهنامه تشخیص آزمایشگاهی را در فضای مجازی دنبال کنید:

@Tashkhis_Magazine
www.tashkhis.com
Tashkhis_Magazine
tashkhis magazine