اصول انجام وتضمین کیفیت آزمایشهای غربالگری تالاسمی

آزمایشگاه هماتولوژی مرکزتحقیقات آزمایشگاههای رفرانس

گرد آوری و تنظیم : دکتر پریسا داهیم

همکاران : دکتر آتوسا شریعت

دکتر کتایون خداوردیان

دکتر شهلا فارسی

زهرا امامی

فریبا سبزوی

فرحناز دربندی

آذر بحرینی

منیژه وظیفه دوست

به نام خدا

مقدمه

عملکرد مناسب و قابل قبول آزمایشگاههای غربالگری تالاسمی ، نقش مهمی در یافتن زوجهای ناقل بتا تالاسمی و بدنبال آن جلوگیری از تولد نوزادان مبتلا به بیماری تالاسمی بتا ماژور داشته که این امر از لحاظ مادی و معنوی نه تنها برای خانواده بیمار بلکه برای سیستم بهداشتی کشور نیز از بار گرانبهایی برخوردار می باشد . عملکرد صحیح و قابل قبول برای این آزمایشگاهها جز با آگاهی کامل کارکنان از اهمیت آزمایشها ، کاربرد صحیح تجهیزات ، روش صحیح انجام آزمایشها ، آشنایی با برنامه های تضمین کیفیت و لزوم مستند سازی، میسر نمی گردد .

بنا بر ضرورت امر فوق ، این دستورالعمل جهت استفاده روزمره کارکنان آزمایشگاههای غربالگری تالاسمی تهیه گردیده ، تا ضمن آموزش اصول استاندارد انجام آزمایشهای مربوطه و روشهای کنترل کیفی ، گام کوچکی جهت ارتقاء کیفیت عملکرد این آزمایشگاهها بردارد.

فهرست **صفحه**

فهرست تجهیزات مورد نیاز در آزمایشگاههای غربالگری تالاسمی.....۴
فهرست سوابق و مدارکی که می بایست در آزمایشگاههای غربالگری تالاسمی موجود باشد.....۶
دستورالعمل جمع آوری نمونه خون وریدی.....۷
ضدانعقاد EDTA.....۹
اصول کنترل کیفی در آزمایشگاه خونشناسی.....۱۱
شناسنامه دستگاههای شمارشگر سلولی اتوماتیک.....۱۲
اصول کار با دستگاههای شمارشگر سلولی اتوماتیک.....۱۳
روش کالیبراسیون و کنترل کیفی دستگاههای شمارشگر سلولی اتوماتیک.....۱۴
اصول آزمایش اندازه گیری هموگلوبین A2 و بررسی خطاها.....۲۱
اصول آزمایش الکتروفورز استات سلولز وبررسی خطاها.....۲۳
روش مرجع آزمایش اندازه گیری PCV به روش میکرو هماتوکریت ، منابع خطا
و روش کنترل کیفی دستگاه میکروهماتوکریت.....۲۵
روش مرجع اندازه گیری هموگلوبین در خون با روش سیان مت هموگلوبین و منابع خطا.....۲۸
روش کنترل کیفی اسپکتروفوتومتر و فوتومتر.....۳۰
روش کنترل کیفی سمپلر.....۳۳

اصول ایمنی در آزمایشگاه ۳۶

تجهیزاتی که در آزمایشگاههای محیطی غربالگری تالاسمی می بایست موجود باشد

تجهیزات لازم برای نمونه‌برداری

۱- صندلی نمونه‌برداری با دسته قابل تنظیم و حفاظی جهت جلوگیری از افتادن بیمار

۲- تخت معاینه

۳- دستکش یکبار مصرف

۴- ظرف جمع آوری خون بصورت لوله خلاء یا لوله های یکبار مصرف با تاریخ انقضای معتبر یا شیشه های CBC با ضد انعقاد EDTA (با ارجحیت EDTA دی پتاسیک) با غلظت mg ۰/۲۵ +_ ۱/۵ به ازای هر میلی لیتر خون

۵- سوزن (19 – 23G)

۷- بازوبند

۸- ایزوپروپیل الکل یا اتیل الکل ۷۰٪ به عنوان ضدعفونی کننده

۹- گاز پارچه‌ای با ابعاد cm ۵*۵ یا cm ۷/۵*۷/۵

(جهت جلوگیری از خونریزی در محل خونگیری استفاده از پنبه توصیه نمی گردد و بهتر است از گاز پارچه‌ای استفاده شود .) وجود باند و گاز جهت پانسمان در صورت نیاز ضروری می باشد.

۱۰- ظرف یا محفظه ای ایمن(Safety box) جهت دفع سرسوزنهای آلوده

۱۱- روتاتور جهت مخلوط نمودن خون

۱۲-سینی یا جا لوله ای جهت حمل نمونه

تجهیزات لازم برای محل انجام آزمایش

۱- روتاتور جهت سروته نمودن نمونه

۲- سل کانتر با تائیدیه آزمایشگاههای رفرانس

۳- کیت هموگلوبین A2 با تائیدیه آزمایشگاه رفرانس

۴- لوله مدرج برای جمع آوری هموگلوبین A2

۵- دستگاه میکروهماتوکریت

۶- لوله میکروهماتوکریت وخمیر مسدود کننده

۷- خط کش میکروهماتوکریت

۸- سمپلر های ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۱۰۰۰ میکرولیتر

۹- محلول استاندراد هموگلوبین

۱۰- محلول درابکین

۱۱- فوتومتر یا اسپکتروفوتومتر

۱۲- پی پت ۵ و ۱۰میلی لیتر، بالن ژوژه ۱۰ و۱۰۰ میلی لیتر (حتی المقدور کلاس A)

۱۳- پر کننده پی پت مکانیکی (pipette filler)

۱۴- یخچال (۶C-۲)

۱۵- آب آزمایشگاهی درجه دو

۱۶- فور و اتوکلاو

۱۷- ظرف دفع مواد آلوده (Safety Box)

۱۸- ترازو حساس g ۰/۰۱

۱۹- دستگاه الکتروفورز ، مواد ومعرفهای لازم *

۲۰- رنگ سبز خوراکی ، پودر بی کرومات پتاسیم ، پارانیتروفنل ، اسید سولفوریک و هیدروکسید سدیم جهت کنترل کیفی فوتومتر یا اسپکتروفوتومتر وسمپلرها*

۲۱- تاکومتر*

۲۲-وزنه های استاندارد جهت کنترل کیفی ترازو

*** با توجه به عدم امکان دسترسی تمامی آزمایشگاههای غربالگری تالاسمی به اقلام اشاره شده در بندهای۱۹ تا ۲۲ ، می توان در هر دانشگاه یک آزمایشگاه را به اقلام مذکور و همچنین به تجهیزاتی نظیر سل کانتر کالیبره و اسپکتروفوتومتر یا فوتومتر کالیبره و... مجهز نمود تا جهت اجرای برنامه های کنترل کیفی خصوصا کنترل کیفی ابزار پایه سایر آزمایشگاههای تابعه نیز مورد استفاده قرار گیرد.**

مدارک و سوابقی که می بایست در آزمایشگاههای غربالگری تالاسمی موجود باشد:

۱-شناسنامه سل کانتر

۲-سوابق مربوط به نحوه نگهداری سل کانتر (مانند نگهداری های روزانه ، هفتگی و ماهانه بر اساس نوع دستگاه و طبق کاتالوگ مربوطه) *

۳-سوابق مربوط به خدمات پشتیبانی شرکت مربوطه

۴-سوابق کالیبراسیون و کنترل کیفی سل کانتر *

۵-سوابق کنترل کیفی اسپکتروفتومتر یا فوتومتر مورد استفاده *

۶-سوابق کنترل کیفی سایر ابزار وتجهیزات مورد استفاده نظیر یخچال ، دستگاه میکروهماتوکریت ، سمپلرها ، ترازو و... *

۷-سوابق کنترل کیفی کیت اندازه گیری هموگلوبین A2 مورد استفاده *

۸- سوابق کارکنان مربوطه شامل مشخصات فردی ، میزان تحصیلات ، تاریخ شروع و خاتمه کار ، سابقه واکسیناسیون *

۹- سوابق انجام آزمایشها

۱۰-مدارک مربوط به روش کار با سل کانتر موجود

۱۱-سوابق مربوط به اقدامات اصلاحی انجام شده در صورت قابل نبودن نتایج کنترل کیفی

*حداقل مدت زمان نگهداری سوابق مربوط به کارکنان ، نحوه نگهداری وکنترل کیفی تجهیزات دو سال می باشد.

(وجود این دستورالعمل درکلیه آزمایشگاههای غربالگری الزامی بوده و مطالعه آن برای کلیه کارکنان بخش پذیرش ، نمونه گیری و آزمایشگاه ضروری می باشد.)

دستورالعمل جمع‌آوری نمونه خون وریدی

۱- بدلیل رعایت اصول ایمنی بهتر است از سرنگ و سرسوزن استفاده نشود و لوله‌های خلاء جایگزین آن گردد .

۲- نمونه‌گیر باید از دستکش استفاده نماید.

۳- قبل از نمونه‌گیری مشخصات برگه درخواست آزمایش را با مشخصات مراجعه کننده (براساس اسناد معتبر)مطابقت دهد .

۴- هنگام نمونه گیری ، مراجعه کننده می بایست بر روی صندلی نمونه‌گیری نشسته و دست خود را جهت برجسته شدن وریدها مشت‌کرده و روی دسته صندلی نمونه‌برداری قرار داده ، به گونه‌ای که بازو تا مچ دست در یک خط مستقیم قرار گیرند . باز و بسته نمودن مشت بدلیل ایجاد تغییردر خون توصیه نمی گردد.

* در هنگام نمونه‌گیری مراجعه کننده نباید غذا ، مایعات یا آدامس در دهان خود داشته باشد .

۵- بازوبند باید ۱۰-۷/۵ سانتی‌متر بالای ناحیه نمونه‌گیری بسته شود و بیش از یک دقیقه نیز بر روی بازوی فرد ، بسته نماند ، در غیر این صورت توقف موضعی خون باعث تغلیظ خون و افزایش کاذب تمام ترکیبات پیوند شده با پروتئین ، هماتوکریت وسایر اجزای داخل سلولی می گردد. در صورتی که مراجعه کننده مشکل پوستی داشته باشد بازوبند باید بر روی لباس بیمار یا گاز بسته شود طوری که پوست او مورد فشار قرار نگیرد. در مواردی که وریدهای سطحی کاملاً مشخص نباشند می‌توان با ماساژ دادن از مچ تا آرنج و یا به کمک وسیله گرم کننده موضعی باعث اتساع وریدها گردید.

۶- ورید median cubital بدلیل سطحی بودن، بهتر ثابت شدن ، کمتر دردناک بودن نسبت به ورود سوزن و احتمال کمتر آسیب رسیدن به عصب (در صورت قرارگیری نادرست سوزن در رگ) برای خونگیری ارجحیت دارد .

* موارد زیر باید در انتخاب ورید مناسب در نظر گرفته شود :

_ نواحی سوخته التیام یافته نباید انتخاب شوند .

_ هماتوم : از ناحیه هماتوم (بدلیل ایجاد خطا در نتایج آزمایش) نباید نمونه‌گیری صورت گیرد .

در صورتی که ورید مناسب دیگری قابل دسترسی نباشد باید نمونه‌گیری از ناحیه‌ای دورتر از محل هماتوم صورت گیرد .

۷- ناحیه نمونه‌گیری به کمک گاز آغشته به ایزوپروپیل الکل یا اتیل الکل ٪۷۰ بصورت حرکت دورانی از داخل به خارج تمیز شود و پس از خشک شدن موضع درهوا (به منظور جلوگیری از همولیز) نمونه‌گیری صورت گیرد .

* در صورت نیاز به تماس مجدد پوست جهت لمس ورید مناسب ، موضع مجددا باید ضدعفونی گردد .

۸- سر سوزن می بایست با زاویه ۳۰ درجه یا کمتر در حالی که قسمت مورب نوک آن به سمت بالا است ، وارد ورید شود . به محض ورود خون بداخل سرنگ یا لوله خلاء باید بازوبند بازگردد.
در صورت استفاده از لوله خلاء باید تمهیدات زیر صورت گیرد :
_ حتی‌الامکان سوزن در رگ ثابت نگه داشته شده و لوله با فشار به سوزن مرتبط شود.
_ لوله‌ها باید تا خاتمه مکش پر از خون شوند .
* در صورت عدم ورود خون به داخل سرنگ یا لوله خلاء ، ابتدا سوزن راکمی جابجا نموده تا بدرستی درون ورید قرار گیرد. (جابجایی بیش از حد سوزن به دلیل ایجاد درد برای نمونه دهنده توصیه نمی‌گردد) ، اگر خونگیری کماکان موفقیت آمیز نبود ، نمونه‌گیری مجدد در محل زیر نمونه‌گیری اولیه یا استفاده از بازوی دیگر بیمار پیشنهاد می‌گردد . در صورت عدم موفقیت بیش از دو بار بهتر است فرد دیگری خون‌گیری را انجام دهد و در صورت نیاز پزشک را مطلع نماید .
۹- پس از جاری شدن روان خون به داخل سرنگ یا لوله‌های خلاء ، مراجعه کننده می بایست مشت خود را باز نماید . پس از پایان نمونه‌گیری، سرسوزن به آرامی از رگ خارج گردیده و گاز تمیز با فشار کم بر روی موضع قرار داده می شود .
۱۰- با استفاده از ظروف یا محفظه های مخصوص دفع ایمن سرسوزن ، سرسوزنهای آلوده از سرنگ جدا شده و نمونه خون به آرامی در ظروف مربوطه تخلیه شود .(یادآوری می گردد ، سرپوش سوزن به هیچ عنوان روی سوزن گذاشته نشود .)
۱۱- نمونه می بایست بلافاصله با حداقل ۵ تا۱۰ بار سروته نمودن ظرف حاوی نمونه با ماده ضدانعقاد مخلوط شود (با دست یا روتاتور) ولی شدت مخلوط کردن نباید به حدی باشد که موجب لیز نمونه گردد .
۱۲- پس از خاتمه نمونه‌گیری،می بایست موضع از نظر بندآمدن خون‌ریزی و یا بوجود آمدن هماتوم کنترل گردد . درصورتی که خون‌ریزی بیش از ۵ دقیقه ادامه یابد باید برای بندآمدن خون ، به محل نمونه‌گیری فشار آورده و سپس موضع بانداژ شود .

- بلافاصله پس از اتمام نمونه‌گیری باید برچسبی حاوی اطلاعاتی نظیر نام ، نام خانوادگی بیمار و شماره شناسایی برروی ظرف حاوی نمونه خون الصاق گردد.

برای جلوگیری از هماتوم می بایست :
- تنها دیواره بالائی ورید سوراخ شود . در صورت عبور سرسوزن از جدار زیرین رگ ، خون به بافت اطراف نفوذ کرده و سبب هماتوم در ناحیه می‌شود .
_ قبل از خارج ساختن سوزن حتماً بازوبند باز شود .
_ از وریدهای سطحی اصلی استفاده شود .
_ پس از نمونه‌گیری به محل خونگیری اندکی فشار وارد آید .

برای جلوگیری از همولیــزمی بایست :
_ موضع نمونه‌گیری پس از ضدعفونی‌کردن ، در مجاورت هوای محیط کاملا خشک شود.
_ از سوزن با اندازه کوچک استفاده نشود.
_ از محل هماتوم نمونه‌گیری نشود.

_ سرسوزن کاملاً به سرنگ متصل باشد تا هیچ‌گونه حباب هوا هنگام نمونه‌گیری تشکیل نشود.
_ پیستون سرنگ به آرامی عقب کشیده شود .
_ مخلوط نمودن نمونه به آرامی صورت گیرد.

ضد انعقاد EDTA

جهت انجام آزمایش های هماتولوژی استفاده از ضدانعقادی توصیه می گردد که دارای ویژگی هایی نظیر عدم تغییر دراندازه گلبولهای قرمز و ایجاد همولیز بوده ، تجمع پلاکتی را به حداقل رسانده و برروی رنگ آمیزی گسترش خونی و همچنین مرفولوژی گلبولهای سفید کمترین اثر را دارا باشدکه از میان ضد انعقادهای موجود EDTA بیشتر از سایر ضدانعقادها دارای ویژگی های فوق می باشد.
نمکهای (Ethylenediamin Tetera acetic Acid) EDTA ضمن پیوند با کلسیم باعث خروج آن از محیط و در نتیجه جلوگیری از انعقاد می گردند . نمونه خون تهیه شده با ضد انعقاد EDTA جهت انجام آزمایش CBC در مدت ۶ ساعت در حرارت آزمایشگاه و در دمای یخچال تا ۲۴ ساعت پایدار می باشد.

انواع این ضدانعقاد شامل ، EDTA دی پتاسیک به همراه دو ملکول آب (EDTA –K2,2H2O) ، EDTA تری پتاسیک(EDTA –K3) و EDTA دی سدیک با دو مولکول آب(EDTA –NA2,2H2O) می باشد . EDTA تری پتاسیک معمولا بصورت مایعی شفاف می باشد و دو نوع دیگر بصورت پودر کریستال هستند.

EDTA دی پتاسیک علاوه بر حلالیت بیشتر نسبت به انواع حاوی سدیم ، **بهترین نوع ضدانعقاد جهت انجام آزمایش CBC نیز می باشد.هنگام اندازه گیری میزان هماتوکریت به روش دستی استفاده ازاین ضدانعقاد جهت کالیبراسیون سل کانتر الزامی است.**

ضد انعقاد K3 EDTA با ایجاد چروکیدگی در گلبولهای قرمز باعث ۲٪کاهش در میزان هماتوکریت و بدلیل ایجاد رقت در نمونه، موجب کاهش مقدار هموگلوبین تا ۱٪ می شود .

پایداری نمونه

در حرارت آزمایشگاه نمونه خون حاوی EDTA از زمان خونگیری تا ۶ ساعت پایدار بوده و در حرارت ۴ درجه سانتیگراد (یخچال) نیز تا ۲۴ ساعت پارامترهای MCV, Platelet , PCV , Hb , W.B.C , R.B.C قابل اندازه گیری است.

مقدار مورد نیاز ضدانعقاد

به ازای هر میلی لیتر خون ۲۵ /۰+_ ۱/۵میلی گرم EDTA دی پتاسیک یا دی سدیک (همراه با دو مولکول آب) و۱/۲ میلی گرم EDTA-K3 مورد نیاز می باشد. مقدار EDTA مصرفی می بایست متناسب با مقدار خون باشد. استفاده از غلظت بیش ا ز ۲ میلی گرم برای هر میلی لیتر خون موجب چروکیدگی گلبولهای سرخ شده که این امر خود سبب خطا در اندازه گیری PCV ، MCH و MCHC می گردد . افزایش غلظت این ضد انعقاد برروی میزان هموگلوبین اثری نداشته ولی موجب چروکیدگی گلبولهای سفید و تورم واز هم پاشیده شدن پلاکتها می شود.

کاهش میزان EDTA با ایجاد لخته در نمونه موجب تاثیر قابل توجهی درشمارش پلاکتها می گردد.

محلول EDTA دی سدیک ویا دی پتاسیک را می توان باغلظتهای متفاوت تهیه نمود .در صورتیکه ضد انعقاد با غلظت کم تهیه و بصورت مایع استفاده شود ، موجب رقت نمونه وخطا در نتایج آزمایشها می گردد. بنابراین توصیه می شود که ضدانعقاد پس از تهیه خشک شود.

در صورتیکه تهیه EDTA در آزمایشگاه صورت می گیرد ، توصیه می شود جهت یکسان سازی روشها ،کلیه آزمایشگاههای غربالگری تالاسمی از ضدانعقاد با غلظت ۶٪ استفاده نمایند. برای تهیه ضدانعقاد با این غلظت ، ۶ گرم پودر EDTA را در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کرده و برای تخمین مقدار مورد نیاز برای ۲ میلی لیتر خون به روش زیر عمل شود:

میلی گرم در صد ۶۰۰۰ =۱۰۰۰*۶

میلی گرم	میلی لیتر	
۶۰۰۰	۱۰۰	
۳	*	* = ۰/۰۵

محاسبه فوق نشان می دهد برای۲میلی لیتر نمونه خون ،که می بایست حدودا حاوی ۳ میلی گرم ضدانعقاد باشد، ۰/۰۵میلی لیتر یا ۵۰ میکرولیتر EDTA با غلظت ۶٪ لازم است . همواره باید بخاطر داشت ضدانعقاد با غلظتی تهیه شودکه نهایتا حجم مشخصی از آن برای ۲ میلی لیتر خون لازم باشد تا بتوان براحتی با استفاده از سمپلر مقدار لازم را به ظرف جمع آوری نمونه انتقال داد .

اصول کنترل کیفی در آزمایشگاه

تمامی آزمایشگاهها می بایست جهت تضمین صحت و دقت نتایج آزمایشهای خود از برنامه های تضمین کیفیت استفاده نمایند. برقراری چنین برنامه هایی در آزمایشگاههایی که مسئول انجام آزمایشهای غربالگری تالاسمی می باشند نیز می بایست به عنوان یک اصل مهم در نظر گرفته شود . اگرچه ممکن است در آزمایشگاههای یاد شده اجرای تمامی روشهای کنترل کیفی داخلی و یا شرکت در برنامه های کنترل کیفی خارجی ، امکانپذیر و یا الزامی نباشد ، ولی در هر حال وظیفه مسئول آزمایشگاه است تا با توجه به تعداد مراجعین ، تجهیزات و روشهای بکار رفته و تعداد کارکنان با کمک روشهای

گوناگون مانند آموزش کارکنان ، برقراری روشهای آزمایشگاهی استاندارد ، استفاده از روشها ی کنترل کیفی بر اساس شرایط موجود و ....، از صحیح و قابل قبول بودن نتایج اطمینان حاصل نماید.

بطور مثال ، از آزمایشهای زیر، که از جانب سازمان جهانی بهداشت پیشنهاد شده اند، می توان با توجه به امکانات وشرایط هر آزمایشگاه برای کنترل کیفی آزمایش CBC استفاده نمود.(هر یک از موارد زیر در مبحث کنترل کیفی سل کانتر شرح داده شده است .)

- استفاده از نمونه کنترل و رسم نمودار
- انجام آزمایشهای دوتایی (duplicate) برروی حداقل ۳-۴ نمونه
- انجام آزمایش های بازبینی (check test) برروی ۳-۴ نمونه از سری کاری قبلی
- استفاده از روش Delta check
- استفاده از میانگین اندکسهای خونی MCV,MCH,MCHC

یاد آوری می گردد ، کالیبراسیون وکنترل کیفی تجهیزاتی نظیر سل کانتر ، اسپکتروفوتومتر، فوتومتر ، میکروهماتوکریت ، ترازو و سمپلر ، در ابتدای بکارگیری (ابتدای خرید) و حدودا هر ۶ ماه ضروری می باشد ولی در این فاصله در صورت هرگونه تغییر در عملکرد یا تعمیر، انجام امر فوق ضروری می باشد .
دمای یخچال می بایست روزانه ثبت و نگهداری شود .

۱- نام و آدرس آزمایشگاه

۲- نام وآدرس شرکت پشتیبان

۳- مدل وشماره سریال دستگاه

۴- تاریخ نصب ، کالیبراسیون اولیه و شروع به کار دستگاه

۵- مشخصات فرد راه اندازی کننده

۶- مشخصات و نحوه آموزش کاربر دستگاه ،توسط شرکت پشتیبان

۷- مشخصات محلولها و مواد مصرفی

۸-تاریخ آخرین سرویس دوره ای و خدمات پشتیبانی

۹ -تاریخ آخرین کالیبراسیون

۱۰- تاریخ آخرین تعمیر با ذکر قطعه تعویض شده

۱۱- تاریخ آخرین مشکل و راه حل آن

اصول کار با دستگاههای شمارشگر سلولی اتوماتیک (سل کانتر)

آزمایشگاهها می بایست از دستگاههای شمارشگر سلولی اتوماتیک با تاییدیه آزمایشگاههای رفرانس استفاده نمایند.

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

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

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

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

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

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

۵- هر روز قبل از شروع آزمایش بر روی نمونه ها ، می بایست نمونه خون کنترل با تاریخ انقضای معتبر با دستگاه آزمایش شده و پس از بررسی و اطمینان از نتایج آن با استفاده از نمودار کنترل ، نسبت به آزمایش نمونه مراجعین اقدام گردد . (توضیح کیفی در مبحث کنترل کیفی سل کانتر آمده است .)

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

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

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

محلول های سل کانتر

۱ -محلولهای دستگاه می بایست با تاریخ انقضا و سری ساخت مشخص از شرکت پشتیبان ویا سایر شرکتهای معتبر تهیه شده و دارای تاییدیه آزمایشگاههای رفرانس باشند .

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

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

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

کالیبراسیون و کنترل کیفی سل کانتر

کالیبراسیون

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

درصورت عدم دسترسی به کالیبراتورهای تجارتی یاوجود هرگونه شکی نسبت به ارزش آن **استفاده ازخون کامل جهت کالیبراسیون** ضروری می باشد . برای کالیبراسیون باید از خون طبیعی تازه ، استفاده کرد. پارامترهای ۱۰-۲۰ نمونه خون کامل نظیر هموگلوبین ، هماتوکریت سه بار با روشهای مرجع دستی و سه بار با سل کانتر اندازه گیری شده و پس از محاسبه میانگین هر روش ، با استفاده از فرمول زیر فاکتور کالیبراسیون تعیین می گردد.

$$\text{(Calibration Factor)} = \frac{\text{میانگین روش دستگاهی}}{\text{میانگین روش دستگاهی}} \times ۱۰۰$$

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

$$\frac{۱۴۰ - ۱۴۵}{۱۴۵} * ۱۰۰ = -۳/۴۴$$

در نتیجه ضریب کالیبراسیون دستگاه برای هموگلوبین می بایست ۳/۴۴ کاهش یابد.

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

$$CF = \text{فاکتور کالیبراسیو} \times \frac{\text{میانگین روش دستی قبلی}}{\text{میانگین روش دستگاهی}}$$

کنترل کیفی

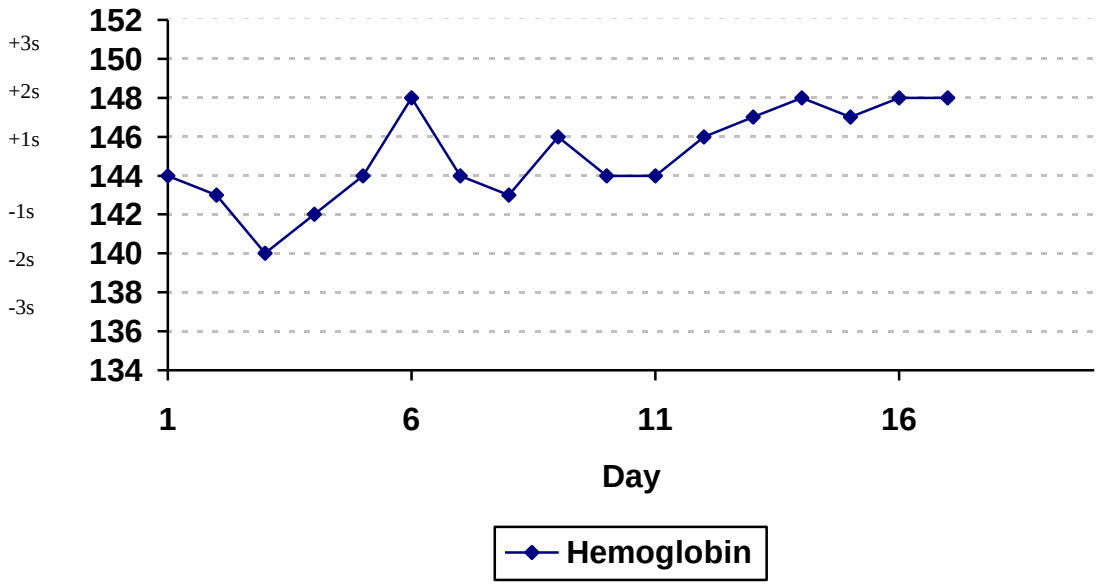
۱-از نمونه های کنترل سلولهای خونی که بطور تجارتی دردسترس می باشند می توان هرروز صبح و به فواصل درطی روز استفاده نمود و نتایج حاصله را بر روی نمودار ثبت نمود . برای رسم نمودار، می بایست نمونه کنترل ، به دفعات و درفواصل مختلف با دستگاه آزمایش شود تا حداقل ۳۰خوانده برای هر پارامتر حاصل گردد .پس ازمحاسبه میانگین و انحراف معیار های

۱+_ ، ۲SD +_ و SD ۳+_ برای هر پارامتر مقادیر آنها بر روی محور عمودی و روزها بر روی SD

محور افقی ثبت می گردد.

مثال زیر نمودار کنترل کیفی هموگلوبین با میانگین ۱۴۴ گرم در لیترو انحراف SD ۱_+، SD ۲+_و۳SD+_ معیارهای

به ترتیب ۴،۲ و۶ گرم در لیتراست . نقاط ثبت شده در نمودار نمایانگر میزان هموگلوبین خون کنترل در روزهای متوالی می باشد. نمودار کنترل کیفی با کمک قوانین لوی جنینگ یا وستگارد تفسیر می گردد که در ادامه به یکی از این قوانین اشاره می شود.



تفسیرنمودار کنترل(توصیه سازمان جهانی بهداشت)

(1) One control value outside the mean ± 2SD Warning

(2) One control value outside the mean ± 3SD Reject:SE or RE

(3) 2 consecutive controls exceed mean ±2SD Reject:SE

(4) 4 consecutive controls exceed mean +1SD or mean -1SD Reject:SE

(5)6 consecutive controls on one side of the mean Warning:SE

SE=Systematic error

RE=Random error

۲- در صورت فقدان خون کنترل وجهت کامل شدن روند کنترل کیفیت سل کانترمی توان از نمونه های خون بیماران استفاده نمود . باتوجه به پایداری پارامترهایی نظیرHCT، Hb،RBC،WBC و اندکسهای خونی درنمونه خون به مدت ۲۴ ساعت دردمای ۴ درجه سانتیگراد، میتوان در روز اول حداقل ۵ وترجیحا" ۱۰ نمونه که دارای مقادیر طبیعی می باشند را پس از آنالیز دریخچال نگهداری نموده ودر روز بعد مجددا" مورد آزمایش قرار داد و وجود اختلاف معنی دار بین مقادیر نمونه های جفت را با استفاده از آزمون آماری T-Brittin محاسبه نمود .

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

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

n تعداد جفتهای مورد بررسی

d اختلاف بین دو خوانده (روز به روز)

Sd انحراف معیار اختلافات

مقدار t برای هر متغیر محاسبه گشته که اگر مقدار آن برای ۵ نمونه از ۲/۷۸ و برای ۱۰ نمونه از ۲/۲۶ بیشتر باشد ، با اطمینان ۹۵٪ می توان گفت که بین مقادیر شمارش شده در دو روز ، اختلاف معنی دار وجود دارد . وجود اختلاف معنی دار برای یک متغیر بیانگر اشکال احتمالی بوده که در صورت تداوم آن جهت رفع اشکال می بایست اقدامی صورت گیرد.

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

91 - 9/5

Sd=√

مقدار هموگلوبین روز اول	مقدار هموگلوبین روز دوم	d	d2
123	120	-3	9
135	139	4	16
176	181	5	25
155	150	-5	25
142	138	-4	16

=
4.72

4

Σd = -3	$(\Sigma d)^2 = 9$
$\Sigma (d^2) = 91$	
$d^- = \Sigma d / 5 =$ 3/5 = 0.6	

tn = 0.6 / 4.72 ×√ 5 =0 .28

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

۳- جهت بررسی عدم دقت (CV) دستگاه می بایست **هر ماه** از نمونه کنترل و یا نمونه های روزمره برای انجام آزمایشات تکراری Replicate tests و تعیین ضریب انحراف معیار (CV) برای هرپارامتر استفاده نمود. در صورت عدم مطابقت CV هر پارامتر با ادعای دستگاه که در کاتالوگ مربوطه آمده است تماس با شرکت پشتیبان ضروری می باشد. برای تعیین میزان عدم دقت هر پارامتر ، نمونه خون را حداقل ۱۰ بار به دستگاه داده وبا محاسبه آماری و یا استفاده از ماشین حسابها یا نرم افزارهایی که که قادر به محاسبه SD وCV بوده میزان عدم دقت مربوط به هر پارامتر مشخص می گردد.

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

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

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

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

$$CV = SD / mean \times 100$$

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

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

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

2n

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

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

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

2SD=6.7

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

آزمایش بازبینی (Check Test) مانند آزمایشهای دوتایی (Duplicate) انجام می شود با این تفاوت کـه نمونـه هـا در ابتدا یا انتهای سری کاری ویا صبح وبعداز ظهر آزمایش می شوند و اختلاف نتایج آنها که طبـق فرمـول آزمایشـهای دوتـایی محاسبه می شود می بایست در محدوده SD ۲+_ قرار گیرد .اگر نمونه ها درست نگهداری شده باشند هرگونه تغییـری در نتایج خارج از این محدوده نشاندهنده اشکال درعملکرد دستگاه ویامعرفها می باشد.آیـن آزمـایش بـرای بررسـی هموگلـوبین مناسب بوده و به میزان کمتر برای شمارش گلبولهای قرمز و سفید کاربرد دارد و لی برای هماتوکریت بخصـوص اگـر فاصـله زمانی آزمایش نمونه ها بیش از ۶ ساعت باشد کارایی ندارد.

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

۵-در مراکز آزمایشگاهی با پذیرش بیمار زیاد (حداقل روزی ۱۰۰ بیمار)، اسـتفاده از مقـادیر میـانگین شاخصـهای گلبـولی **(MCHC, MCH, MCV)** بدلیل ثابت بودن در فواصل روزها و هفته هـا ، بعنـوان روشـی جهـت ارزیـابی کیفـی عملکـرد دستگاه توصیه می گردد به شرطی که نمونه های مورد آزمایش در روزهای مختلف تفاوت مشخصی با یکدیگر نداشته باشـند بطور مثال آزمایش برروی بیماران تالاسمی ویا سایر مواردیکه روی اندکسهای گلبولی اثر داشته باشد .تفاوت مقادیر میـانگین بیش از ۳٪ ، نشان دهنده بروز خطا و لزوم بررسی کالیبراسیون دستگاه می باشد.

۶-مقایسه مقادیر بدست آمده از یک نمونه با نتایج قبلی نمونه همان فرد (Delta check) به شرط درنظرداشتن نکاتی نظیر تغییرات فیزیولوژیک و روزانه پارامترهای خونی ، تحت درمان قرارگرفتن فرد به هر دلیل و تغییرات بالینی کـه باعـث

تغییرشمارش سلولها می گردند ، بعنوان روشی جهت کنترل کیفی بکار می رود . باتوجه به تغییرات روزانه طبیعی مقـادیر خون در یک فرد ، وجود اختلافات واضح بیش از مقادیر ذکر شده در زیر نشان دهنده خطا می باشد .

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

۷- کلیه روشهای کنترل کیفی داخلی ذکر شده، جهت بررسی تکرار پذیری مناسب آزمایشـها انجـام مـی گیرنـد ولـی تکـرار پذیری مناسب همواره نشاندهنده صحت نتایج نمی باشد . جهت ارزیابی صحت عملکرد تجهیزات و روشهای آزمایش می بایست از روشهای دیگری نظیر استفاده از استاندارد ،کالیبراتور و یا شرکت در برنامه های کنتـرل کیفیـت خـارجی استفاده نمود . هدف برنامه کنترل کیفیت خارجی ایجاد هماهنگی بین نتایج آزمایشگاهها و یافتن خطاهـای سیسـتمیک مـی باشد .مسئول اجرای این برنامه در ایـران آزمایشـگاههای رفـرانس مـی باشـدکه بصـورت دوره ای نمونـه هـای مجهـول را بـه آزمایشگاههای تحت پوشش ارسال می نماید . نمونه های مجهول کنترل کیفیت خارجی هماتولوژی شامل نمونه های مجهول لایز (برای بررسی صحت اندازه گیری هموگلوبین سل کانترها) ، سیان مت هموگلـوبین (بـرای بررسـی صـحت انـدازه گیـری هموگلوبین توسط فوتومترها واسپکتروفتومترها) ، گسترش خون محیطی جهت شمارش افتراقی گلبولهای سـفید و گسـترش خونی با رنگ آمیزی نیو متیلن بلو به منظور شمارش رتیکولوسیت می باشند . آزمایشگاهها پس از دریافت نمونه ها و آزمـایش آنها ، نتایج را مجددا به آزمایشگاههای رفرانس ارسال می نمایند . کلیه نتایج دریافتی از آزمایشگاهها در آزمایشگاههای رفرانس با استفاده از نرم افزارهای مخصوص بررسی شده و مقایسه نتایج هر آزمایشگاه با میانگین کل نتایج ، بصورت **Deviation Index (DI)** به اطلاع همان آزمایشگاه رسانده می شود .

.

DI	< 1	نتیجه مناسب
DI	1-2	قابل قبول ولی بینابینی
DI	2-3	نیاز به بررسی روش آزمایش و یا کالیبراسیون می باشد
DI	> **3**	اقدام فوری نیاز است

جهت اطمینان از نتایج آزمایش CBC موارد زیر می بایست رعایت گردد:

مرحله قبل از آزمایش Pre Analytical Phase:

۱- نمونه دهنده قبل از نمونه گیری ، حداقل ۵ دقیقه با آرامش بنشیند.

۲- قبل از انجام آزمایش نام ونام خانوادگی و شمارش پذیرش نمونه دهنده مندرج برروی برچسب ظرف با برگ درخواست یا برگ پذیرش مطابقت داده شود.

۳-تورنیکه بیش از یک دقیقه بر دست نمونه دهنده ، بسته نماند.

۴- به محض گرفتن خون ، نمونه با ضدانعقاد مخلوط گردد.(با میکسر یا سروته نمودن ویال)

۵-نسبت ضدانعقاد به خون رعایت گردد.

۶- ظرف حاوی نمونهCBC دربسته باشد.

۷- نمونه عاری از هر گونه لخته باشد .

۸- حداکثر فاصله زمانی بین نمونه گیری و انجام آزمایش حدود ۴ -۶ ساعت باشد.

۹- قبل از انجام آزمایش ، با استفاده از روتاتور و یا حداقل ۸ بارسر و ته نمودن کامل ویال ، نمونه هموژن و یکنواخت گردد.

مرحله انجام آزمایش Analytical Phase

در این مرحله برای اطمینان از نتایج ، رعایت فاصله زمانی مناسب بین نمونه گیری و انجام آزمایش و اصول کار با سل کانتر ، اجرای برنامه های کالیبراسیون و کنترل کیفی الزامی می باشد.

مرحله پس از آزمایشPost Analytical Phase

در هنگام بررسی نتایج آزمایش CBC موارد زیر می بایست در نظر گرفته شوند :

۱- ضد انعقاد مایع (K3EDTA) بدلیل ایجاد رقت در نمونه، مقدار هموگلوبین را تا ۱٪ کاهش می دهد.

۲- استفاده از ضد انعقاد K3 EDTA باعث چروکیدگی گلبولهای قرمز و کاهش ۲٪در میزان هماتوکریت می شود . در صورتیکه آزمایشگاهی ضد انعقاد مورد استفاده خود را از K3 EDTA به K2 EDTA تغییر دهد می بایست به این نکته توجه نماید که میانگین MCV ۲٪ افزایش یافته و میانگین MCHC به همین میزان کاهش می یابد .

۳- افزایش گلبولهای سفید بیش ازL/ ^{۹}۱۰*۲۰ مقدار هموگلوبین را به میزان g/dl ۳ افزایش می دهد.، تعداد پلاکت بیش از

L/ ^{۹}۱۰*۷۰۰ ، مقدار زیاد هموگلوبین S ، میکروسیتوز و هایپوکرومیا نیز بطور کاذب میزان Hb را بالا می برند.

اصول آزمایش اندازه گیری هموگلوبین A2

۱- خون حاوی ضد انعقاد EDTA جهت انجام آزمایش مناسب می باشد.
۲- حداکثر زمان مناسب نگهداری نمونه از زمان نمونه گیری تا انجام آزمایش اندازه گیری HbA2 ، ۸ روز می باشد که در این مدت نمونه خون می بایست در دمای یخچال نگهداری شود. بهتر است همولیزات، تازه و در روز آزمایش تهیه گردد و ازخون لیز و مانده جهت انجام آزمایش استفاده نشود.
۳- در مورد کیتهایی که نیاز به نگهداری در دمای یخچال دارند توجه به رعایت کامل حفظ زنجیره سرد ضروری می باشد.
۴- هیچگاه جعبه کیت و ستونها بصورت وارونه نگهداری نشوند.
۵- پیش از انجام آزمایش ، دستور کار همراه کیت بدقت خوانده شده و هنگام آزمایش کاملا" مطابق آن عمل شود.
۶- قبل از انجام آزمایش ستونها و معرفهایی که در یخچال نگهداری می شوند ، می بایست به دمای اتاق برسند .
۷- از ستونهایی که رزینهای آنها تغییر رنگ داده اند نباید استفاده شود .
۸- کلیه تجهیزات مورد استفاده نظیر فوتومتر و سمپلرهامی بایست دارای سوابق کنترل کیفی باشند .
۹- توصیه می گردد جهت مخلوط نمودن رزین داخل ستونها با بافر حتی المقدور از پی پت پاستور تمیز و نوک سمپلر نو استفاده شود.
۱۰-در صورت ایجاد حباب هوا در رزین هنگام مخلوط نمودن با بافر ، رزین می بایست مجددا مخلوط شده تا حباب کاملا از بین برود.
۱۱-خروج بافر از ستونها می بایست سرعتی مناسب و حدود ۱۰-۲۰ml / hour داشته باشد.
۱۲-قبل از تهیه همولیزات باید نمونه خون تام کاملاً مخلوط شود.
۱۳-پس از تهیه همولیزات و اطمینان از لیز کامل گلبولهای قرمز بهتر است آزمایش هر چه سریعتر انجام گردد .
۱۴- به محض خروج محلول روی رزین می بایست همولیزات به ستون اضافه شود. زیرا نمونه گذاری روی رزین خشک موجب خطا در نتایج آزمایش می گردد.
۱۵- افزودن همولیزات باید به آرامی و درست در سطح رزین صورت گیرد . سطح رزین در هنگام نمونه گذاری نباید آسیب ببیند.
۱۶- جهت جمع آوری بافر حاوی هموگلوبین A2 از ستون و تهیه نمونه توتال می بایست از لوله مدرج استفاده شود. در صورت عدم دسترسی به لوله های فوق لوله های معمولی را می توان با کمک قلم الماس یا ماژیک مدرج نمود. توصیه می گردد در ابتدای خرید لوله مدرج ، با استفاده از پی پت کلاس A ، از صحت حجم آن اطمینان حاصل نمود.
۱۷- جهت بالا بردن میزان دقت بهتر است از یک نوک سمپلر جهت ریختن همولیزات بداخل ستون و لوله نمونه توتال استفاده شود.
۱۸- به محض جذب شدن همولیزات بر روی رزین ، بافر اضافه شود.

۱۹- اگر قبل از جذب کامل همولیزات بر روی رزین ، محلول بافراضافه شود مقدار HbA2 بطور کاذب کاهش می یابد.
۲۰- دقت شود تمامی بافر اضافه شده از ستون خارج شود.
۲۱- قبل از قرائت جذب نوری لوله حاوی هموگلوبین A2 و نمونه توتال ، می بایست محتویات لوله هاکاملاً مخلوط شوند.
۲۲- در صورت امکان در هر سری کاری به منظور کنترل کیفی ، نمونه ای با مقدار هموگلوبین A2 مشخص به همراه سایر نمونه ها آزمایش شود.
۲۳-برای انجام آزمایش اندازه گیری هموگلوبین A2 ، استفاده از آب مقطر مناسب الزامی می باشد.

یادآورمی گردد در هر سری کاری می بایست نوع و سری ساخت کیت هموگلوبین A2بکار رفته ، ثبت گردد.

نکته:

_ روش کروماتوگرافی ستونی برای اندازه گیری HbA2 اختصاصی نبوده بطوریکه بعضی از هموگلوبینهای هم بار با HbA2 مانند **arab** O, E, C و بعضی از انواع هموگلوبین A2 (A'2) و دارای زنجیره دلتا نیز با HbA2 خارج می شوند .
_ در مواردیکه مقدار هموگلوبین A2 بیشتر از ۷٪ محاسبه گردید باید به وجود هموگلوبینهای نظیر C,E,Oarab که همراه HbA2 خارج می شوند شک نمود.
_ اگر همولیزات اضافه شده یکباره از ستون خارج شود ، وجود سایر هموگلوبین های غیر طبیعی نظیر هموگلوبین E,C,G,D,S مطرح می گردد.

اصول آزمایش الکتروفورز هموگلوبین

آزمایش الکتروفورز هموگلوبین ، جزء آزمایشات غربالگری طرح تالاسمی نبوده و به عنوان آزمایش تکمیلی در مواردی که مقدار هموگلوبین A2 بیشتر از ۷٪ بدست آمده و یا درموارد مشکوک انجام می گردد . این آزمایش به دو صورت قلیایی(استات سلولز) و اسیدی (سیترات آگار) انجام می گردد . با توجه به امکان انجام آزمایش الکتروفورز به روش استات سلولز در اکثر آزمایشگاهها، در این قسمت فقط به اصول انجام این آزمایش اشاره می گردد.

۱- خون حاوی ضد انعقاد EDTA جهت انجام آزمایش مناسب بوده ولی استفاده از سایر ضدانعقادها مانند Heparin نیز امکانپذیر می باشد.

۲- نمونه دردمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ روزقابل نگهداری می باشد. (خون هپارینه در طول نگهداری ممکن است تشکیل لخته های بسیار کوچک دهد .)

۳- نمونه مورد استفاده برای آزمایش، همولیزاتی است که ترجیحا" از گلبولهای قرمز شسته شده تهیه گردیده و برای تهیه آن می توان از محلول لیز کننده داخل کیت و یا آب مقطر و حلال آلی استفاده نمود . برای جداسازی مناسب باندها غلظت هموگلوبین همولیزات ،می بایست در محدوده gr/dl ۳-۲ باشد .

۴- در صورت استفاده از کیت ، روش انجام آزمایش ، می بایست مطابق دستورالعمل همرا بوده ولی رعایت نکات زیر در هنگام آزمایش با کلیه روشها ضروری می باشد :

_ جهت جلوگیری از ایجاد حباب هوا ، نوار استات سلولز را می بایست به آرامی در بافر فرو برد .
_ دو مخزن تانک به طور مساوی از بافر پر شوند.
_ نوار استات سلولز را می بایست به سرعت بین دو ورقه کاغذ جاذب رطوبت قرار داد تا رطوبت اضافی به طور یکنواخت گرفته شود .
_ نمونه های همولیزات را بر روی استات سلولز ، می بایست در طول یک خط و در فاصله یک سوم طول ورقه از لبه کاغذ قرارداد. نتایج خوب عموما" با مقادیر ۰/۵تا ۱میکرولیتر همولیزات حاصل می گردد.
_ نوار استات سلولز را باید طوری بر روی پل مخزن قرار داد که سمت استات سلولز نوار به طرف بافر (پائین) و محل نمونه گذاری به کاتد نزدیکتر باشد.
_ ولتاژ مناسب برای انجام آزمایش۲۵۰ - ۴۰۰ ولت (عموما" ۳۵۰) در زمان معین می باشد .(بسته به نوع و اندازه نوار استات سلولز و کارخانه تولیدکننده متغیر است.)
_ پس از گذشت زمان مورد نظر ، نوار را از مخزن بیرون آورده و می بایست بر اساس دستور العمل درون کیت آن را رنگ آمیزی ، شفاف و خشک کرد.
۵- در هر بار الکتروفورز استات سلولز باید از یک نمونه کنترل حاوی هموگلوبین های A , F , S , C در کنار نمونه های بیماران استفاده نمود.
۶- نوسانات جریان برق ، سری ساختهای مختلف بافر و نوار استات سلولز ، ممکن است سبب تغییرات در سرعت حرکت باندها شوند. الگوی حرکت نمونه های مورد آزمایش را باید با حرکت باندهای نمونه کنترل درهمان نوار مقایسه نمود.
۷- با هر شماره سریال جدید استات سلولز ، نمونه های کنترلی که حاوی ترکیبی از هموگلوبین های A , F و , C S هستند باید نمونه گذاری شوند و جداسازی مناسب هموگلوبین ها بر روی نوار استات سلولز آزمایش شود. تفکیک واضح این هموگلوبین ها باید با یک ناحیه شفاف کوچک بین آنها مشخص شود. ممکن است لازم باشد غلظت هموگلوبین ها را در نمونه کاهش داده یا زمان و ولتاژ را جهت مشاهده تفکیک دقیق باندها تنظیم نمود.
۸- تشخیص قطعی هموگلوبینوپاتی ها بر اساس الکتروفورز در PH ثابت امکان پذیرنمی باشد در عین حال این روش با وجود مشخص نمودن هموگلوبینهای مختلف، مقدار کمی و صحیح هر هموگلوبین را نیز نشان نمی دهد. اما تفاوت های آشکار را میتوان مشخص نمود.

منابع خطا

۱- کدورت و آلودگی بافر
۲ - بافر با PH یا قدرت یونی نامناسب
۳- آلودگی چاهکهای نمونه گذاری ، اپلیکاتور، کاغذهای جاذب الرطوبت ، یا آلودگی پلیت استات سلولز با گرد و خاک ، خون یا سایر پروتئین ها .
۳- استفاده از همولیزات کهنه .
- این همولیزاتها به علت داشتن استرومای گلبول قرمز و یا آلودگی باکتریال می توانند باعث تفکیک نا مناسب باندها ، ایجاد آرتفکت و یا کشیدگی غیر طبیعی (Smear)باندهای هموگلوبین گردند .

- نگهداری نامناسب نمونه و وجود مت هموگلوبین در نمونه های کهنه موجب رنگ قهوه ای همولیزات می شود. در صورت وجود مت هموگلوبین در نمونه ، باندکوچکی در سمت کاتدیک باندهای اصلی هموگلوبین دیده می شود که باافزودن یک قطره سیانیدپتاسی(KCN)۵٪ به همولیزات ، مت هموگلوبین به سیان مت هموگلوبین تبدیل شده وباند حاصل از آن حذف می گردد. با این روش جوابهای مبهم و گیج کننده از بین رفته و یک جواب واضح بدست می آید.

۴ -مکش نامناسب بافر درنوار استات سلولز ، سبب حبس شدن هوا یا پوسته پوسته شدن ورقه می شود.

۵-خشک نمودن نامناسب نوارهای استات سلولز ، سبب خشک شدن بیش از حد یا باقی ماندن رطوبت روی نوار استات سلولز آن می شود.

۶- تأخیر در:

الف) نمونه گذاری روی نوارهای استات سلولز،

ب) برقراری جریان الکتریسته ،

ج) بیرون آوردن نوارها از مخزن ،

د) رنگ آمیزی نوارها بعد از الکتروفورز .

۷- نامناسب بودن حجم نمونه گذاری . (خیلی زیاد یا کم)

۸-قراردادن نمونه ها بطور نامناسب بر روی نوار استات سلولز . نمونه ها باید نسبت به مرکز به صورت کاتدیک قرار گیرند تا فضای مناسب جهت حرکت باندهای هموگلوبین به سمت آند فراهم گردد.

۹- بخار شدن رطوبت نوارها در مدت الکتروفورز (مثلا"بدنبال حرارت بالا ، جریان خیلی بالا و غلظت های بالای بافر)که در این حالت درصورت بالاتر بودن دمای اتاق از ۲۵ درجه سانتیگراد ، خنک .کردن دستگاه توسط کیسه یخ(Icebag) ضروری

می باشد.

۱۰- در بیماران مبتلا به لکوسیتوز ، ممکن است یک باند غیرطبیعی از پروتئین هم (Hem) دیده شود با حرکتی آندیک و سریعتر از تمامی هموگلوبین ها (حتی سریعتر از HbH)که این باند احتمالا بدلیل وجود میلو پراکسیداز لکوسیتی ایجاد می شود.

۱۱- در بیمارن دیابتی که خوب تحت کنترل پزشک نیستند ، یک باند که نسبت به HbA کمی آندیک تر است ، به دلیل حضور هموگلوبین گلیکوزیله مشاهده می شود .

روش اندازه گیری PCV به روش میکروهماتوکریت

Packed cell volum (PCV) نسبت حجم گلبولهای قرمز به حجم خون کامل است . این نسبت پس از سانتریفورژ مناسب نمونه خون بدست آمده و ترجیحاً بصورت اعشاری گزارش می گردد. (مانند ۰/۴۲بجای ۴۲٪.) روش مرجع اندازه

گیری PCV روش میکروهماتوکریت می باشد که جهت کالیبراسیون سل کانترها نیز استفاده می گردد .در آزمایش اندازه گیری PCV توجه به نکته های زیر ضروریست

۱- برای انجام آزمایش می توان از خون مویرگی ، شریانی و وریدی استفاده نمود .(یادآور می گردد که مقدار PCVخون مویرگی ۱-۲٪ از خون وریدی کمتر است) . در جمع آوری نمونه به طریق مویرگی استفاده از لوله های هپارینه با کمتر از ۷ واحد هپارین به ازای یک لوله مویینه توصیه می گردد.

۲- نمونه را پس از جمع آوری می توان در دمای اتاق نگهداری و در فاصله ۶ ساعت آزمایش نمود.

۳- نمونه ها می بایست بصورت دوتایی Duplicate آزمایش شوند . تفاوت مقدار هماتوکریت نمونه های دوتایی نباید از ۰/۰۵٪ بیشتر باشد .

۴- در صورت انجام آزمایش به منظور کالیبراسیون سل کانتر ، استفاده از ضد انعقاد K2EDTA جهت جلوگیری از چروکیدگی گلبولهای قرمز الزامی می باشد. K3EDTA با ایجاد چروکیدگی در گلبولهای قرمز موجب کاهش ۲٪ در MCV می شود. در صورت استفاده از ضدانعقاد مایع ضریب رقت می بایست محاسبه گردد.

۵- توصیه می گردد جهت انجام آزمایش جهت کالیبراسیونسل کانتر از لوله های مویینه با باند آبی (بدون ضد انعقاد) استفاده شود.

۶- هنگام قرائت نتیجه با خط کش مخصوص ، مقدار بافی کوت در نظر گرفته نشود.

۷- مقدار خطای قابل قبول اندازه گیری PCV به روش میکرو هماتوکریت ۱٪ ± می باشد.

روش آزمایش: ۲/۳ تا ۳/۴ طول لوله هماتوکریت از خون کامل که حداقل ۸ بار سروته شده است پر شده و باخمیر مخصوص مسدود می گردد. طول خمیر نباید از ۴ میلی متر کمتر بوده و سطح آن نیز می بایست کاملاً صاف باشد. نمونه های دوتایی روبروی هم در دستگاه میکرو هماتوکریت قرار گرفته و دستگاه برروی زمان لازم تنظیم می شود. نتیجه آزمایش می بایست حداکثر ۱۰ دقیقه پس از توقف دستگاه با استفاده از خط کش هماتوکریت قرائت شود ، با گذشت زمان و باقی ماندن لوله ها بصورت افقی ، حد فاصل پلاسما و سلول بتدریج شیب دار شده و خواندن نتیجه را با مشکل مواجه می سازد.

منابع خطا:

- استاز خون ،بعلت بستن طولانی تورنیکه باعث افزایش غلظت خون می شود
- خونگیری سخت ،بدلیل ورود مایع بین بافتی به رگ باعث رقت و یا لخته شدن خون می گردد.
- استفاده از سر سوزن نازک ، موجب ایجاد همولیز می گردد.
- مخلوط نشدن نمونه با ضد انعقاد
- نادرست پر کردن یا مسدود نمودن لوله هماتوکریت
- مسدود نمودن انتهای لوله بوسیله حرارت
- خطای دید هنگام خواندن نتیجه آزمایش
- در نظر گرفتن بافی کوت هنگام خواندن نتیجه آزمایش

- خطـای بـدام افتـادن پلاسـما (Plasma trapping) مقـدار پلاسـمای بـدام افتـاده در آنمـی ماکروسـیتیک کـم و در اسفروسیتوز، تالاسمی و آنمی سیکل سل زیاد است. در حالت طبیعی میزان پلاسـمای بـدام افتـاده ۳٪-۱ اسـت کـه هنگـام کالیبراسیون سل کانتر این مقدار ۲٪ در نظر گرفته می شود.

علل کاهش کاذب میزان هماتوکریت : EDTA اضافی همـولیز

علل افزایش کاذب میزان هماتوکریت : هیپوناترمی بـدام افتادن پلاسما

هیپرناترمی

دستگاه میکرو هماتوکریت

دستگاه میکروهماتوکریت می بایست دارای مشخصات زیر باشد:

۱- شعاع چرخش بیشتر از ۸ سانتی متر ،

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

۳- توانایی ایجاد RCF حدود ۱۰-۱۵ هزار g در محیط بمدت حداقل ۵ دقیقه بدون افزایش دما از C ۴۵.

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

RCF=میدان نسبی سانتریفوژ

RPM=دور در دقیقه

RCF= Relative Centrifugal Field

RPM = Revolution Per Minute

$RCF=1.118 \times 10^{-5} \times r \times RPM^2$

کنترل کیفی و بررسی کالیبراسیون دستگاه میکروهماتوکریت

برای کنترل کیفی دستگاه توجه به موارد زیر ضروری می باشد

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

سرعت سانتریفوژ(دوردقیقه) وزمان سنج دستگاه بترتیب با تاکومتر کالیبره و کرونومتر قابل بررسی می باشند. برای بررسی حداکثر توان تجمع سلولی می توان از روش زیر استفاده نمود:

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

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

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

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

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

جهت بررسی ابزار قرائت هماتوکریت می توان مقدار خوانده شده هماتوکریت توسط آن را با مقدار خوانده شده توسط ابزار مورد اطمینان نظیر خط کش ، میکرومتر یا صفحه درجه بندی شده مقایسه کرد . در صورت استفاده از خط کش جهت کنترل کیفی ، لوله هماتوکریت را روی خط کش قرار داده به نحوی که ابتدای ستون گلبولهای قرمز روی صفر خط کش و انتهای ستون سلول و پلاسما درحد ۵ سانتیمتر قرار گیرد. در این صورت هماتوکریت ۰/۵ باید در حد ۲/۵ سانتیمتر خط کش قرار داشته باشد .

اندازه گیری هموگلوبین در خون با روش سیان مت هموگلوبین

روش شیمیایی اندازه گیری هموگلوبین در خون با روش سیان مت هموگلوبین روش مرجع اندازه گیری هموگلوبین به روش دستی می باشد که برای کالیبراسیون سل کانترها نیز کاربرد دارد .برای دستیابی به نتایج صحیح رعایت نکات زیر هنگام آزمایش ضروری می باشد.

۱- از ظروف شیشه ای که از نظر صحت در حد استاندارد(Class A) و از لحاظ شیمیایی تمیز باشند ، استفاده شود .

۲- از دقت و صحت عملکرد سمپلرها ، اسپکتروفتومتر و یا فوتومتر با استفاده از برنامه های کنترل کیفی ، اطمینان حاصل نمود. (کلیه مستندات کنترل کیفی ثبت گردد .)

۳-در صورت امکان از در ابکین با ترکیب توصیه شده NCCLS (کمیته بین المللی استاندارد های آزمایشگاههای تشخیص طبی) که در زیر آمده است ، استفاده شود.

KCN	0.05 g
K3Fe(CN)6	0.2g
KH2 PO4(Anhydrous)	0.140 g
Nonionic Detergent	05-1 ml
Clinical laboratory Reagent water (type I)	1000 ml

این معرف در مدت ۵ دقیقه کلیه هموگلوبینها را به سیان مت هموگلوبین تبدیل می کند (تبدیل کربوکسی هموگلوبین ،که در افراد سیگاری وجود دارد ، به فرم اکسیده به ۳۰ دقیقه زمان نیاز دارد .)

- محلول در ابکین را باید در ظروف تیره در بسته با جنس بوروسیلیکات نگهداری نمود و در صورت کدورت بدور ریخت.
- بعلت سمی بودن این محلول در هنگام آزمایش احتیاطات لازم بکار رود .
- از درابکین با ترکیبهای دیگر نیزمی توان استفاده نمود ولی زمان کامل شدن واکنش طولانی تر و احتمال ایجاد کدورت بیشتر است.

۴- از نمونه خون مویرگی یا وریدی می توان جهت انجام آزمایش استفاده نمود ولی استفاده از نمونه خون وریدی حاوی نمکهای EDTA (دی سدیک یا دی پتاسیک) به مقدار mg /ml ۲ /۲ -۱/۵ ارجح می باشد .

۵- پس از خونگیری نمونه را می بایست بلافاصله با ضد انعقاد مخلوط نمود .

۶ -میزان هموگلوبین اندازه گیری شده با استفاده ازK3 EDTA بدلیل ایجاد رقت در نمونه تا ۱٪ کاهش نشان می دهد.

۷ -استاندارد هموگلوبین بکار رفته می بایست دارای تاییدیه آزمایشگاه رفرانس و تاریخ انقضای معتبر باشد .

روش آزمایش

- در روش معمول اندازه گیری هموگلوبین به روش دستی ، ۰/۰۲میلی لیتر خون با ۵ میلی لیتر در ابکین مخلوط می گردد و پس از طی مدت لازم جهت کامل شدن واکنش جذب نوری آن با فوتومتر قرائت می شود .
- برای انجام آزمایش به منظور کالیبراسیون سل کانتراز روش رقت زیاد (Macro dilution) استفاده می شود تا احتمال خطای ناشی از رقیق سازی کاهش یابد. این روش به یکی از سه طریق زیر قابل انجام است :
  - رقیق نمودن ۱۰۰ میکرولیتر خون خوب مخلوط شده با ۲۵ میلی لیتر در ابکین یا ،
  - رقیق نمودن ۰/۴ یا ۰/۵ میلی لیتر خون با ۱۰۰ میلی لیتر در ابکین و یا ،
  - رقیق نمودن ۰/۰۴ میلی لیتر خون با ۱۰ میلی لیتر در ابکین .

در هر دو روش معمول و رقت زیاد ، ابتدا نمونه خون توسط پی پت یا سمپلر با سرعت آهسته و ثابت کشیده می شود و پس از پاک کردن سطح خارجی پی پت یا سر سمپلر با گازی که توسط آب مقطر یا نرمال سالین مرطوب شده ، تقریباً ۲/۵ سانتی متر زیر سطح در ابکین در داخل لوله آزمایش تخلیه می گردد . نمونه باقی مانده در پی پت یا سر سمپلر، می بایست با ۸-۱۰ باربرداشت و تخلیه محتویات لوله، کاملا تخلیه شود . پس از ۵-۶ بار سروته نمودن نمونه جهت مخلوط شدن کامل خون و درابکین ، می بایست این محلول را جهت کامل شدن واکنش قبل از قرائت جذب نوری آن ، ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری نمود.

جهت قرائت جذب نوری از فتومتر یا اسپکتروفوتومتر با طول موج ۵۴۰ نانومتر استفاده می شود . در صورت استفاده از استاندارد هموگلوبین جذب نوری این محلول نیز در طول موج یاد شده قرائت گردیده و مقدار هموگلوبین بر حسب g/L از فرمول زیر محاسبه می گردد.

$$\text{غلظت هموگلوبین نمونه (گرم در لیتر)} = \frac{\text{جذب نوری نمونه}}{\text{جذب نوری نمونه استاندارد}} \times \text{غلظت هموگلوبین استاندارد}$$

برای رسم منحنی استاندارد هموگلوبین ابتدا می بایست از محلول استاندارد هموگلوبین رقتهای مختلف ۱/۲ ،۱/۳ و ۱/۴ تهیه و جذب نوری آنها را در طول موج ۵۴۰ نانومتر مقابل بلانک (درابکین) قرائت نمود. پس از تعیین مقدار هموگلوبین هر رقت ، روی کاغذ نمودار خطی (شطرنجی) مقادیر جذب نوری هر رقت روی محور عرضها و مقدار غلظت هموگلوبین هر رقت روی محور طولها ثبت می گردد . خطی که از مبدا و نقاط تلاقی مقدار هموگلوبین و جذب نوری مربوطه می گذرد ، منحنی استاندارد نام دارد ، که با کمک آن می توان غلظت هموگلوبین نمونه ها را محاسبه نمود.

منابع خطا

- تکنیک نا مناسب خونگیری وریدی که باعث تغلیظ خون و در نتیجه افزایش کاذب مقدار هموگلوبین و شمارش سلولی می -گردد.
- استفاده از تجهیزاتی بدون سوابق کنترل کیفی و کالیبراسیون
- عدم آگاهی کافی کارکنان از نحوه صحیح انجام آزمایش

کنترل کیفی اسپکتروفوتومتر و فوتومتر

مهمترین موارد ارزیابی کیفی در اسپکتروفتومترعبارتند از :

۱-خطی بودن Linearity

هدف از این آزمون تعیین محدوده ای از جذب است که متناسب با غلظت می باشد . بدین صورت که به موازات افزایش غلظت محلول ، جذب نوری آن نیز باید به همان نسبت افزایش یابد.در این آزمایش میزان عدم صحت جذب نوری در هر رقت بررسی می شود.

از محلولهای مختلفی می توان برای این ارزیابی استفاده نمود که این محلولها می بایست تا حد امکان پایدار باشند .

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

جهت بررسی خطی بودن طول موج ۵۴۰ نانومتر ، می بایست با مخلوط نمودن خون با درابکین ، ذخیره ای (Stock) از محلول سیان مت هموگلوبین با جذب نوری حدود ۲ تهیه شود .(بطور مثال از اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر خون با هموگلوبین g/l ۱۷۰ به ۵ میلی لیتر در ابکین ، محلولی با جذب نوری حدود 2.09 بدست می آید .) اگر میزان هموگلوبین نمونه کم باشدحجم بیشتری از خون ، می بایست به درابکین اضافه شود.سپس از این محلول ذخیره ، حداقل ۴ رقت تهیه می شود (بطور مثال ۱/۲ ، ۱/۴، ۱/۸ و۱/۱۶) و جذب نوری محلول ذخیره و رقتهای تهیه شده در طول موج یاد شده قرائت می گردد تا ۵ خوانده بدست آید (محدوده جذب نوری رقت های تهیه شده می بایست بین ۰/۱ تا۲ باشد) . جذبهای نوری قرائت شده به عنوان مقدار مشاهده شده (Observed) در نظر گرفته می شود .

برای محاسبه میزان خطا در هر رقت ،جذب نوری(OD) رقتی از محلول که در **حدود** ۰/۴۳۴ باشد به عنوان مبنا انتخاب می گردد و میزا ن خطای سایر رقتها با توجه به آن محاسبه می شود تا جذب مورد انتظار بدست بیاید .

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

۱/۴ ۰/۴

۱/۲ X

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

$$\text{Bias} = \frac{\text{Expected - observed}}{\text{Expected}} * 100$$

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

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

میزان عدم صحت در هر رقت تا ۵٪ قابل قبول می باشد .

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

وزن یک مول پارانیتروفنل = ۱۳۹/۱۱ گرم

یک میلی مول =۰/۱۱۱۳۹ میلی گرم

برای تهیه پارانیتروفنل ۰/۰۸ میلی مول در لیتر ، با استفاده از محاسبه زیر ، می بایست ۱۱/۱۱۲۸۸ پارانیتروفنل (که بطور تقریبی ۱/۱۱۳ میلی گرم در نظر گرفته می شود) در یک لیتر هیدروکسید سدیم (Na OH) ۰/۰۱ نرمال حل شود.

۰/۱۱۱۳۹ * ۰/۰۸ = ۱۱/۱۱۲۸۸ = ۱/۱۱۳

۲-صحت فوتومتریک

بررسی صحت فتومتریک نشان می دهد که آیا جذب نوری صحیح در طول موج تعیین شده صورت می گیرد یا خیر؟ به عبارت دیگر هدف از این آزمون تعیین تفاوت جذب واقعی با جذب مشاهده شده است . صحت فتومتریک به توانایی لامپ اسپکتروفتومتر بستگی دارد.

روش بررسی : بیش از ۵۰ میلی گرم از دی کرومات پتاسیم را به مدت یکساعت در درجه حرارت ۱۱۰ درجه سانتی گراد قرارداده تا خوب خشک شود. سپس با ترازو (کنترل کیفی شده باشد) دقیقاً ۵۰ میلی گرم از ماده فوق وزن شده و در یک لیتر اسید سولفوریک ۰/۰۱ نرمال حل میگردد . سپس اسپکتروفوتومتر توسط بلانک اسید سولفوریک ۰/۰۱ نرمال در طول موج۳۵۰ نانومتر صفر شده و جذب نوری محلول دی کرومات پتاسیم در اسید سولفوریک قرائت می گردد . جذب نوری در محدوده ۰/۰۰۵ ± ۰/۵۳۶ نشاندهنده صحت فوتومتریک دستگاه می باشد.

۳-صحت طول موج

این آزمایش برای فتومترها انجام نمی شود.

ارزیابی صحت طول موج به منظور ارزیابی ادعای سیستم درتاباندن طول موجی است که دستگاه برای آن تنظیم شده است . راحتترین و قابل دسترس ترین روش برای اسپکترفوتومترهایی که با نور مرئی کار می کنند استفاده از محلول سیان مت هموگلوبین (۲۰ میکرولیتر خون و ۵ میلی لیتر در ابکین) بوده که دارای حداکثر جذب نوری در طول موج ۵۴۰ نانومتر است .ابتدا با محلول در ابکین به عنوان بلانک دستگاه را صفر کرده و سپس جذب نوری نمونه در طول موج ۵۳۰ ، ۵۳۵، ۵۴۰،۵۵۰ و ۵۵۵ نانومتر قرائت می گردد.(لازم بذکر است پس از هر تغییر طول موج ، باید جذب نوری دستگاه با محلول بلانک صفرگردد .) بر اساس طول موج و میزان جذب ،می بایست منحنی رسم نمود که در صورت وجود صحت طول موج باید به شکل زنگوله دیده شود که قله آن در ناحیه حداکثر جذب نوری یعنی ۵۴۰ نانومتر است.

۴-آزمون پایداری با رانش فوتومتری (Drift)

یکی از منابع اصلی خطا در اسپکتروفوتومتری ، که به علت فرسودگی شدید منبع نوری رخ می دهد، عدم پایداری کمیت اندازه گیری شده (مانند جذب نوری) نسبت به زمان است.

برای بررسی ، ابتدا دستگاه را با درابکین صفر نموده و پس از ریختن محلول سیان مت هموگلوبین در کووت و بستن درب آن با پارافیلم ، جذب نوری این محلول ۵ تا ۱۵ دقیقه یکبار (بمدت یکساعت) قرائت و ثبت می گردد . حداکثر تغییر مجاز در جذبهای نوری قرائت شده طی این مدت ۰/۰۰۵ ± می باشد .

۵-انوار ناخواسته (Stray light)

انوار ناخواسته به معنی نورهای ناخواسته ای هستند که غیر از نور منبع ، به نمونه تابیده می شوند و بوسیله اندازه گیری جذب نوری ماده ای که ۱۰۰٪ جذب نوری دارد (مثل استن یا نیتریت سدیم در طول موجهای خاص) مشخص می گردد .برای اینکار محلول مورد نظر را در مسیر عبور نور قرار داده و در صورت قرائت هر گونه جذبی وجود انوار ناخواسته مطرح می شود.

کنترل کیفی سمپلر

جهت دستیابی به عملکرد مناسب سمپلر ، آگاهی از روش صحیح استفاده از آنها پیش از آگاهی از اصول کنترل کیفی ضروری می باشد . روش صحیح کار با سمپلر به شرح زیر می باشد :

برای کشیدن حجم مورد نظر ، ابتدا دکمه کنترل (Control button) را تا توقف اول پائین آورده و نوک سمپلر را ۳ میلی متر (بسته به حجم سمپلر) زیر سطح محلول فرو برده ، در این حالت با رها نمودن آرام دکمه کنترل ، حجم معین وارد نوک سمپلر می گردد. برای تخلیه ، با فشار مجدد دکمه کنترل ، محلول درون سر سمپلر را ، ضمن تماس به جداره ظرف ، به آرامی خارج نموده و نهایتا پس از ۱تا۳ ثانیه با فشار به دکمه کنترل تا توقف دوم ، باقی مانده محلول نیز کاملاً خارج می گردد .

جهت رسیدن به حداکثر دقت و صحت عملکرد سمپلر ، بهتر است برای حجم های بیش از ۱۰ میکرولیتر قبل از انتقال حجم برداشتی ،۲ تا ۳ بارعمل برداشت و تخلیه تکرار وسپس حجم مورد نظر منتقل شود.

برای حجم های کمتراز ۱۰ میکرولیتر بهتر است برداشت با نوک سمپلر (Unwetted Tip) فقط یک بار انجام شده و پس از تخلیه در محل مورد نظر با محلول موجود در ظرف شسته شود.

نکاتی که هنگام کار با سمپلر می بایست رعایت گردد:

۱-اطمینان از اتصال محکم سر سمپلر

۲-عمود نگهداشتن سمپلر در زمان مکش

۳-تخلیه محلول با تماس انتهای نوک سمپلربه جداره ظرف با زاویه ۱۰ تا ۴۰ درجه
۴-رها کردن آرام دکمه در زمان پر ویا خالی کردن محتویات نوک سمپلر
۵-کشیدن کناره های خارجی نوک سمپلر پس از انجام مکش به جداره های فوقانی لوله به منظور حذف قطرات خارجی نوک سمپلر و یا در صورت نیاز خشک کردن قطرات باقی مانده در بخش خارجی نوک سمپلر به کمک پارچه ای بدون پرز (البته باید مطمئن شدکه پارچه چیزی از محلول را از داخل نوک سمپلر به خود جذب نکند)
۶- تخلیه محلول پس از توقف اول (پائین آوردن دکمه کنترل تا مرحله اول) و تامل ۳-۱ ثانیه و سپس پایین آوردن دکمه تا توقف دوم

نحوه نگهداری سمپلر:

کلیه قسمت های خارجی اغلب سمپلرها را می توان با محلول صابون تمیز کرد و پس از آب کشی با آب مقطر در دمای اتاق خشک نمود.

برای ضد عفونی کردن نیز استفاده از ایزو پروپانل ۶۰٪ توصیه می شود. (انواع قابل اتوکلاو را نیز می توان از این طریق استریل کرد)

برای تمیز کردن قسمت داخلی سمپلر باید به راهنمای همراه سمپلر رجوع شود.

کنترل کیفی سمپلر:

بررسی دقت و صحت سمپلرهای دستی ۳ تا ۴ بار در سال توصیه شده است که انجام حداقل **دوبار** الزامی می باشد . این بررسی با استفاده از روش های توزین و رنگ سنجی قابل انجام است . به علت نبود ترازوهائی با حساسیت کافی در آزمایشگاههای معمولی برای کنترل سمپلر(تا یک صدم میلی گرم) ، روش رنگ سنجی تحت شرایط موجود قابل اطمینان تر است .

در این روش با استفاده از یک محلول رنگی با جذب پایدار در طول زمان (مثل رنگ سبزخوراکی در طول موج ۶۲۰- ۶۳۰ نانومتر و یا پارانیتروفنل در طول موج ۴۰۱-۴۰۵ نانومتر) دقت و صحت عملکرد سمپلر کنترل می شود.

جهت انجام برنامه کنترل کیفی ، سمپلرها ، در کارهای روتین به دو گروه۱۰-۱۰۰ میکرو لیتر و ۱۰۰- ۱۰۰۰ میکرولیتر تقسیم می شوند که برای هر گروه باید یک محلول ذخیره از رنگ سبز تهیه نمود .

برای گروه۱۰-۱۰۰ میکرولیتر ، تهیه محلول mg/dl ۱۵۵ رنگ سبز خوراکی ضروریست که از حل کردن ۱۵۵میلی گرم پودر رنگ سبز در ۱۰۰ میکرو لیتر آب مقطر تهیه می گردد و برای گروه ۱۰۰- ۱۰۰۰ میکرو لیتر می بایست محلول ذخیره mg/dl ۱۵/۵ رنگ سبز خوراکی را از حل کردن mg ۱۵/۵ پودر در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطرتهیه نمود .

غلظت محلول های ذخیره به گونه ای انتخاب شده است که محلول mg/dl ۱۵۵پس از رقیق شدن به نسبت۱/۱۰۱ و محلول mg/dl ۱۵/۵پس از رقیق شدن به نسبت ۱/۱۱ جذبی حدود ۰/۴داشته باشد، زیرا اسپکتروفتومترها در محدوده جذبی ۰/۴ کمترین خطای عملکردی را نشان می دهند.

هنگام استفاده از پارانیتروفنل نیز سمپلر ها به دو گروه تقسیم می شوند و برای هر گروه یک محلول ذخیره تهیه می شود . برای گروه ۱۰۰-۱۰ میکرولیتر ، پارانیتروفنل با غلظت ۴۲ میلی گرم در **دسی لیتر** و برای گروه ۱۰۰۰-۱۰۰ میکرولیتر

پارانیتروفنل با غلظت ۴۲ میلی گرم در **لیتر** تهیه می شود . برای تهیه رقت از سود ۰/۰۱ نرمال استفاده می شود .تاکید می شود که تهیه stock پارانیتروفنل و رقتهای لازم ، بترتیب با استفاده از آب مقطر و سود ۰/۰۱ نرمال انجام می گردد.

کنترل دقت:

پس از آماده نمودن ۱۰ لوله آزمایش و انتخاب محلول ذخیره رنگی متناسب با حجم سمپلرمورد کنترل ، با توجه به جدول زیر مقدار مشخصی آب مقطر با دقت بسیار زیاد به لوله ها اضافه می شود ، سپس به کمک سمپلر مورد کنترل محلول رنگی کشیده شده و به لوله ها اضافه می شود . پس از مخلوط کردن محتویات لوله ها ، میزان جذب نوری هر ۱۰ لوله در مقابل آب مقطر قرائت می گردد.

ضریب رقت حاصله	حجم آب برحسب میلی لیتر	مقدار رنگ برحسب میکرولیتر	حجم سمپلر
1/101	1	10	10
1/101	2	20	20
1/101	2.5	25	25
1/101	5	50	50
1/101	10	100	100
1/11	2	200	200
1/11	5	500	500
1/11	10	1000	1000

در صورت انتقال صحیح حجم آب ، اختلاف در جذب نوری لوله ها به اختلاف در حجم رنگ انتقالی توسط سمپلر نسبت داده می شود. بدین ترتیب محاسبه ضریب انحراف معیار (CV%) بین ۱۰ خوانده معرف مقدار عدم تکرارپذیری در سمپلر خواهد بود.

در کارهای روزمره حداکثر ۳٪ خطای عدم دقت قابل قبول است.

کنترل صحت :

جهت کنترل صحت عملکرد سمپلر ،وجود بالن ژوژه های کلاس A ۱۰و۱۰۰ میلی لیتر و پی پت های کلاس A ۱و۱۰میلی لیتر ضروری می باشد .

برای انجام این آزمایش با استفاده از پی پت و بالن ژوژه رقتهای ۱/۱۰۱و۱/۱۱ از محلول رنگ سبز خوراکی تهیه می گردد، که بترتیب برای تهیه رقت ۱ /۱۰۱ ، یک میلی لیتر رنگ سبز خوراکی به بالن ژوژه حاوی ۱۰۰میلی لیتر آب مقطر و برای تهیه رقت ۱/۱۱، ده میلی لیتر رنگ سبز خوراکی به بالن ژوژه حاوی۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه می گردد. پس از مخلوط نمودن محتویات بالنها ، جذب نوری هر رقت از محلول رنگی حداقل سه بار قرائت شده و پس از محاسبه میانگین ، مقدار بدست آمده به عنوان مقدار مورد انتظار (Expected) در نظر گرفته می شود . میزان عدم صحت با استفاده از فرمول Bias برای هر سمپلر محاسبه می گردد .

میانگین جذب بدست آمده از هر سمپلر در مرحله ارزیابی عدم دقت _ میانگین جذب نوری در بالن

ژوژه (جذب واقعی)

$$\text{Bias \%} = \frac{\text{میانگین جذب بدست آمده از هر سمپلر در مرحله ارزیابی عدم دقت _ میانگین جذب نوری در بالن ژوژه (جذب واقعی)}}{\text{جذب نوری در بالن ژوژه}} * ۱۰۰$$

در کارهای روزمره حداکثر۵٪ عدم صحت قابل قبول می باشد.

نکات:

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

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

۳-تماس دست با نوک سمپلرآلوده ممنوع است.

۴-در صورت مکش محلول های اسیدی و سایر مواد با خاصیت خورندگی باید بخش نگهدارنده سر سمپلر (Tip-holder) باز شده و پیستون و حلقه پلاستیکی(O-ring) بخوبی با آب مقطر شسته شود.

۵-هرگز نباید سمپلر حاوی محلول به پهلو زمین گذاشته شود.

۶-هرگز نباید سمپلرهای متغیر را بر روی حجمی خارج از محدوده حجمی ادعائی آن تنظیم نمود.

کلیه عملیات مربوط به سرویس ونگهداری می بایست ثبت و نگهداری شود.

ایمنی در آزمایشگاه

کارکنان آزمایشگاه در معرض آلودگی به انواع عوامل بیماریزای بیولوژیک با منشا خون، مایعات بدن، مواد شیمیایی و غیره قرار دارند. این عوامل می‌توانند از طرق متفاوت مانند ترشح و پاشیدن، بلع وتنفس، تماس مستقیم با مخاط (چشم، بینی ، دهان) و یا پوست، بریدگی در اثر وسایل تیز و برنده ونیز وسایل شیشه ای شکسته، ایجاد جراحت در اثر فرو رفتن سوزن در پوست، برداشت مایعات با پی پت بوسیله دهان و نیز ایجاد خراش توسط حیوانات آزمایشگاهی سبب ایجاد بیماری گردند.

علاوه برآن درمحیط کار، خطراتی مانند مواد شیمیایی سوزاننده، مواد رادیو اکتیو، جریان الکتریسته ، آتش سوزی و غیره وجود دارند که در صورت عدم رعایت صحیح اصول ایمنی می تواند سلامت را تهدید نمایند.

بنابراین لزوم استقراربرنامه ایمنی درکلیه آزمایشگاههادرجهت حفظ ایمنی کارکنان ، بیماران ، افراد مرتبط ومحیط زیست ، امری ضروری است.

اصول کلی حفاظت وپیشگیری ازبروزآلودگی درکارکنان ومحیط آزمایشگاه ونیزاصول کلی که جهت ایمنی فضای کاری وسایر فضاهای مرتبط باید مدنظرقرارداد، شامل مواردذیل می باشد:

۱- کارکنان باید تمامی نمونه های بیماران را آلوده به ویروسHIV ویا دیگرعوامل بیماریزا بامنشاخونی فرض نمایند.

۲- همیشه باید دستکش دراندازه های متفاوت وازموادمناسب ومرغوب ، درتمام بخشهای فنی دردسترس باشد.بایدبه این نکته توجه داشت که تنها دستکشهای لاتکس محافظت کافی را ایجاد می نمایند.

۳- بهیچ وجه نباید بوسیله دست سوزنهای استفاده شده ، از سرنگ یکبارمصرف جداگردد ویادرپوش سرسوزن روی آن قرارگیرد. درموادضروری باید سرسوزن راروی یک سطح قرارداد وفقط ازیک دست جهت این عمل استفاده نمود. نباید سوزن های استفاده شده، قیچی و بریده ، خم و یا شکسته شود.

۴- هرگزعمل برداشت مایعات با پی پت نباید بوسیله دهان انجام شود .برای اینکار استفاده از پر کننده های پی پت ضروری می باشد . همچنین نباید قطرات انتهایی نمونه با فشار زیاد خارج شود ، زیرا ممکن است باعث ایجاد ذرات بسیار ریز یا آئروسل گردد.

۵- مهمترین اقدام پیشگیرانه وایمنی شست وشوی مکرر دستها می باشد ،که باید همیشه صابون (ترجیحا صابون مایع) و نیز موادضدعفونی کننده پوست دردسترس کارکنان قرار گیرد.بریدگیها ، زخمها وجراحات پوستی (اگزما) باید باپانسمان غیرقابل نفوذ به آب پوشانده شوند.

۶- باید درمواقع کارباموادسمی سوزاننده ونیز موادخطرناک شیمیایی وبیولوژی و یاهنگامی که امکان ترشح و پاشیدن خون ویامایعات بدن وجودداشته ونیزهنگام تخلیه اتوکلاو وغیره ازعینکهای حفاظتی (حفاظ دار) ونیز ماسک ویا نقابهای صورت استفاده نمود.

۷- باید سطوح میزها را فوراً بعد از آلودگی با نمونه یا بعد از اتمام کار روزانه با مواد ضدعفونی کننده مانند هیپوکلریت سدیم با رقت ۵ گرم در لیتریا۰/۵ گرم درصد و یا هرگونه محلول سفید کننده خانگی که به نسبت ۱/۱۰ رقیق شده باشد (به شرط اینکه دارای کلر فعال ۵٪ باشند) ، ضدعفونی نمود .

۸- باید سطوح کاری بعد ازاتمام کارروزانه ، باماده ضدعفونی کننده مناسب ، ضدعفونی گردد. درهنگام تمیز نمودن آزمایشگاه و تجهیزات باید از دستکش ، ماسک و پوششهای حفاظتی مناسب استفاده شود.

۹- باید کلیه وسایل و تجهیزات آزمایشگاهی مانند یخچالها ، فریزرها ، بن ماری ، سانتریفوژ وغیره بـه طـور مرتـب تمیز شده و نیز به طور متناوب منطبق بر برنامه زمانبندی که بوسیله مسئول آزمایشگاه تعیین میشود ، ضدعفونی گردند. مخصوصا درمواردی که آلودگی مهمی به وقوع می پیوندد ، باید فورا این عمل انجام شود.

۱۰- وسایل و تجهیزات باید قبـل از انتقـال بـه خـارج از آزمایشـگاه جهـت تعمیـر ویـا تعمیـر درداخـل مرکـز بـا موادضدعفونی کننده مناسب ضدعفونی شوند .

راهنمای ایمنی درموارد ریختن ویاشکستن ظروف محتوی مواد آلوده:

۱-نفس خودرانگه دارید . ۲-افراد را از محل دورکنید. ۳-لباس وپوششهای حفاظتی مناسب را بپوشید.

۴-مدتی صبرکنید تا آئروسلها ته نشست کنند. (حداقل ۱۵ دقیقـه) ۵- محـل را باحولـه کاغـذی و یـا تنزیـب بپوشانید.

۶-ازمحلول ضدعفونی کننده مناسب به آرامی درمحل بریزید . ۷-با توجه به نوع محلول استفاده شده مدتی صبر نمائید.

۸-بوسیله پنس ویا فورسپس پارچه و قطعات شیشه را داخل ظروف ایمن (Safety Box) قرار دهید.

۹-سپس محل راتمیز نموده ودرصورت لزوم مجددا با ماده ضدعفونی عمل فوق را تکرار نمائید.

راهنمای ایمنی جهت انتقال نمونه های آزمایشگاهی بوسیله پست وغیره

نمونه را داخل ظرف درپیچ دار که غیر قابل نشت وغیر قابل نفوذ به مایعات باشـد، قـرار دهیـد واطـراف آن ،مـاده جاذب الرطوبه بگذارید .سپس آن را داخل محفظه دومی که غیر قابل نشت وغیر قابل نفوذ به مایعـات بـوده ، قـرار داده ومشخصات نمونه را روی آن درج کنید.نهایتا محفظه را داخل محفظه سوم قرار داده وعلامـت خطـر زیسـتی(**Biohazard**)را روی آن نصب نموده وآدرس را روی آن بنویسید.

سترون سازی : (Sterilization)

معمولترین راههای سترون سازی درآزمایشگاه بوسیله حرارت خشک (با استفاده از دستگاه فور) وحرارت مرطـوب تحت فشار(با استفاده از دستگاه اتوکلاو) انجام می پذیرد.

ازفور جهت وسایلی که تحمل حرارت بالا رادارند ، استفاده می گردد. طبق استاندارد جدید ، درجه حرارت باید ۱۸۰ -۱۶۰ درجه سانتیگراد بوده و بمدت ۲ تا ۳ ساعت فرایند سترون سازی ادامه داشته باشد .

صحت عملکرد دستگاههای فور و اتوکلاو باید بوسیله اندیکاتورهای شیمیایی و بیولوژیکی بررسی گردد.

ضدعفونی نمودن : (Disinfection)

جهت ضدعفونی نمودن ، ارزانترین وردرسترس ترین ماده ، مایع سفید کننده خانگی می باشـد ، بـه شـرط اینکـه دارای کلرفعال به میزان ۵ ٪ باشد. جهت ضدعفونی نمودن خون ، مایعات بدن ومواد دفعی بیمـاران از رقـت ۱/۱۰ آن و نیز جهت ضدعفونی نمودن کف ، زمین ، دیوار ولباس ازرقت ۱/۵۰ آن استفاده می شود. همچنین می توان از محلول هیپوکلریت سدیم به میزان ۱۰۰ میلی لیتر در لیتر ، جهت ضدعفونی نمودن مایعات بـدن ، خـون ومـواد دفعی بیماران ویا رقت ۲۰ میلی لیتر درلیتر آ ن جهت ضدعفونی نمودن کف ، زمین ، دیوار و لباس استفاده نمود. ازمحلولهای ضدعفونی کننده دیگر که جهت سطوح می توان استفاده نمود ، الکل ۷۰ ٪ می باشد.

مدیریت پسماند: (Waste Management)

در آزمایشگاه انواع پسماندهای عادی (خانگی) ، پسـماندهای عفونی ، شیمیایی ، تیز وبرنده ، پرتوزا وترکیبی (ترکیبی ازمواد شیمیایی ، رادیواکتیو ویاعوامل عفونی) وغیره تولید میشود.

به منظور حفظ سلامت افراد ، محیط زیست وجلوگیری از اثـرات سـوء پسـماندها ، مـدیریت ایمـن وصـحیح آنهـا ضروری است. برنامه مدیریت شامل مراحل تفکیک (جداسازی) ، آلودگی زدایی ، ذخیره (انباشت) ، حمل ونقـل ودفع می باشد.

کلیه پسماندهای آلوده آزمایشگاهی باید باروش مناسب آلودگی زدایی وسپس به طریقه بهداشتی وبـه طـور روزانـه دفع گردند.پسماندهای تیز وبرنده باید درمحفظه های مقاوم مخصوص (Safety Box) قرار گرفته وقبل از اینکـه کاملا پرشوند ، به طریقه بهداشتی دفع گردند.