Payvand

Clinical Specialty Lab.

Islamic Azad University

Hematology Workshop

Quality Assurance with emphasis on IQC of Cell Counters

Day 2

Behzad Poopak, DCLS PhD

Head Payvand Clinical & Specialty Lab.

1392

اهداف و روشهای کنترل کیفی داخلی
Purpose & Method of IQC

- Once a performance baseline has been established, its control is based on methods that will detect loss of accuracy or loss of precision, or both.
- Control methods must be sensitive enough to reveal loss of performance that could compromise patient assay values, but they *cannot be oversensitive* to the point of signaling error when none exists.

کنترل کیفی داخلی

- ***As a minimum***, a performance control system must provide the following information:

1. Analytical imprecision has not deteriorated with time or use.
2. Bias has remained within the limits established at the time of calibration.

- The term “internal" indicates quality control procedures that take place within the laboratory immediately before, during, or immediately after an analysis run.

کنترل کیفی داخلی

- The procedures must be carried out as an *integral part of patient assays.*
- The definition of a "***run***" should be related to work loading and to the stability (drift) of the analyzer, not simply to elapsed time.
- Control assays performed **only once daily** may not provide enough information to ensure accuracy and consistency of results.
- *When the analyzer is restarted after complete shut-down*, precision and set point should be verified to ensure that satisfactory analytical capability has not been lost.

ERRORS: Random and Systematic

- ***All measurements performed in a hematology laboratory contain inherent variability***

- **Random errors – introduce *variance***

  - » increase the scatter of values about the true value
  - » result of chance (eg. sampling errors)
  - » do not affect an entire batch of specimens
  - » are not be detected by control samples

- **Systematic errors - introduce *bias***

  - » not due to chance
  - » eg. deteriorating reagents or loss of calibration

آیا برنامه کنترل کیفی داخلی مشخص در بخش هماتولوژی دارید؟

برای چه مواردی کنترل اساسالازم است؟

جدول برنامه کنترل کیفی داخلی در بخش هماتولوژی

نام کنترل کیفی داخلی	زمان انجام
کنترل کیفی سل کانتر:	
اندازه گیری شمارش زمینه (Background)	هر موقع که دستگاه های سل کانتر روشن می شود
آزمون همخوانی(Correlation Check)	همیشه در مورد تمام نمونه ها باید انجام شود
آزمایش دوتائی (Duplicate Test)	روزانه ۵ نمونه باید انجام شود
آزمایش بازبینی یا چک تست (Check test):	روزانه ۵ نمونه باید انجام شود
ارزیابی با استفاده از خون کنترل و رسم منحنی	روزانه یک نمونه کنترل را در ابتدا و زمان شروع به کار ، به دستگاه داده و نتایج را باید تفسیر نمود
آزمایش چک با مرکز همکار (t-test)	هفته ای یک بار – ۵ نمونه
مقایسه روش دستی با دستگاهی(t-test)	هفته ای یکبار و ۳ نمونه باید انجام شده و مقایسه با هم
مقایسه روش دستی با دستگاهی برای شمارش افتراقی(t-test)	هفته ای یکبار و ۳ نمونه باید انجام شده و با هم مقایسه گردند.
مقایسه همخوانی نتایج دو دستگاه سل کانتر بخش(t-test)	ماهیانه با استفاده از ۵ نمونه
مقایسه واریانس یا تغییرپذیری دو دستگاه با هم(F-ratio)	ماهیانه با استفاده از ۵ نمونه
ارزیابی دقت ماهیانه (CV)	ماهیانه یکبار و بعد از هر جنرال سرویس ، تعمیر یا تعویض قطعه، دقت دستگاه به روش زیر باید با ۲ نمونه انجام شود

نام کنترل کیفی داخلی	زمان انجام
کنترل کیفی دستگاه سدیمان اتوماتیک - بررسی دقت دستگاه (CV) - بررسی صحت (t-test)	ماهی یکبار و یک نمونه ۱۰ بار باید پشت سرهم آزمایش شود. هفته ای یکبار و ۳ نمونه باید با روش دستگاهی و دستی (وسترگرن) انجام شده و با هم مقایسه گردند
کنترل کیفی دستگاه کوآگولومتر - بررسی دقت دستگاه (CV) - منحنی کنترل کیفی	ماهی یکبار و یک نمونه باید پنج بار انجام شود. روزانه یکبار و یک نمونه باید انجام شده و تفسیر گردد.
کنترل کیفی محلولهای مورد استفاده در بخش - کنترل کیفی محلولهای دستگاه سل کانتر - کنترل کیفی محلول مارکانو	هر بار استفاده از محلول جدید هر بار استفاده از محلول جدید
کنترل کیفی کیتهای مورد استفاده در بخش هماتولوژی - کنترل کیفی کیت کیفی و کمی G6PD - کنترل کیفی کیت هموگلوبین - کنترل کیفی کیت های انعقادی - کنترل کیفی آنتی سرم های گروه خونی	هر بار استفاده از محلول جدید و نیز هر بار آزمایش هر بار استفاده از محلول جدید هر بار استفاده از محلول جدید و نیز هر بار آزمایش هر بار استفاده از سری جدید
کنترل کیفی رنگها - رنگ رایت –گیمسا - رنگ رتیکولوسیت - رنگ آمیزی میلو پراسیداز،سودان سیاه و بقیه رنگ آمیزی های سیتوشیمی رنگ - آمیزی آهن	هر بار استفاده از محلول رنگ جدید و نیز روزانه هر بار استفاده از محلول رنگ جدید هر بار استفاده از محلول رنگ جدید و نیز هر بار رنگ آمیزی هر بار استفاده از محلول رنگ جدید

جدول برنامه کنترل کیفی داخلی در بخش هماتولوژی

نام کنترل کیفی داخلی	زمان انجام
کنترل کیفی سل کانتر:	
اندازه گیری شمارش زمینه (Background)	هر موقع که دستگاه های سل کانتر روشن می شود
آزمون همخوانی(Correlation Check)	همیشه در مورد تمام نمونه ها باید انجام شود
آزمایش دوتائی (Duplicate Test)	روزانه ۵ نمونه باید انجام شود
آزمایش بازبینی یا چک تست (Check test):	روزانه ۵ نمونه باید انجام شود
ارزیابی با استفاده از خون کنترل و رسم منحنی	روزانه یک نمونه کنترل را در ابتدا و زمان شروع به کار ، به دستگاه داده و نتایج را باید تفسیر نمود
آزمایش چک با مرکز همکار (t-test)	هفته ای یک بار – ۵ نمونه
مقایسه روش دستی با دستگاهی(t-test)	هفته ای یکبار و ۳ نمونه باید انجام شده و مقایسه با هم
مقایسه روش دستی با دستگاهی برای شمارش افتراقی(t-test)	هفته ای یکبار و ۳ نمونه باید انجام شده و با هم مقایسه گردند.
مقایسه همخوانی نتایج دو دستگاه سل کانتر بخش(t-test)	ماهیانه با استفاده از ۵ نمونه
مقایسه واریانس یا تغییرپذیری دو دستگاه با هم(F-ratio)	ماهیانه با استفاده از ۵ نمونه
ارزیابی دقت ماهیانه (CV)	ماهیانه یکبار و بعد از هر جنرال سرویس ، تعمیر یا تعویض قطعه، دقت دستگاه به روش زیر باید با ۲ نمونه انجام شود

کنترل کیفی سل کانتر
اندازه گیری شمارش زمینه (Background):

- **زمان انجام : هر موقع که دستگاه های سل کانتر روشن می شود**
- **پس از روشن نمودن دستگاه شست و شوی اتوماتیک انجام و سپس شمارش زمینه انجام باید از مقادیر قید شده در زیر کمتر باشد. *در صورت وجود نمونه به تعداد زیاد بهتر است* در فواصل آزمایشها ، دستور شست و شوی دستگاه و شمارش زمینه اجرا شود.**

Parameter	Background result
WBC	$\leq 0.3*10^9/L$
RBC	$\leq 0.03*10^{12}/L$
HGB	≤ 0.2 g/dL
HCT	$\leq 0.5\%$
PLT	$\leq 10*10^9/L$

کنترل کیفی سل کانتر
(Background) اندازه گیری شمارش زمینه

- در صورتی که موارد فوق محقق نشود سیستم را باید طبق دستورالعمل شرکت سازنده شست وشو داده و مجددا" شمارش زمینه را انجام داد
- در مواردی که مشکل حل نشود محلولها تعویض و اگر باز هم حل نشد باید به شرکت پشتیبان مشکل را اعلام نمود.

کنترل کیفی سل کانتر
آزمون همخوانی (Correlation Check)

- **زمان انجام : همیشه در مورد تمام نمونه ها باید انجام شود**
- **در مورد تمامی نمونه باید جاری باشد نتایج گستره خون محیطی با نتایج دستگاه که به صورت جدا از هم ارزیابی شده اند مقایسه می گردند.**
- **از این جمله می توان به شمارش تخمینی پلاکت از گستره و شمارش دستگاه در موارد ترومبوسیتوپنی واقعی و یا تجمع پلاکتی اشاره داشت.**
- **مثال دیگر می توان به بررسی گستره در مواردی که هماتوکریت و هموگلوبین بیمار با هم به علت حضور آگلوتینین سرد (rbc Agglutination in PBS) همخوانی ندارد و افزایش MCVمشهود است اشاره داشت و...**

Correlation check

- Unexpectedly higher or lower Hb might be explained by a blood transfusion or a hemorrhage
- Low MCHC should be confirmed by hypochromia
- High MCV & macrocytosis
- Distinguish bet. Platelets and red cell fragments

کنترل کیفی سل کانتر
آزمایش دوتائی یا دوبل (Duplicate Test)

- **زمان انجام : روزانه ۵ نمونه باید انجام شود.**
- **هدف از آزمایش دوتائی شناسائی خطای اتفاقی یا راندوم می باشد.**
- **برای انجام روزانه در ابتدای روشن نمودن دستگاه ۵ نمونه اول را دو بار به دستگاه داده و با استفاده از نرم افزار موجود اختلاف بین دو بار سنجیده می شود.**
- ***هیچکدام از آزمایشهای دوتائی نباید بیش از 2SD با هم اختلاف داشته باشند.***
- **نمونه هائی که اختلاف بیشتر دارند را دوباره به دستگاه میدهیم معمولا" مشکل حل می شود.**
- **در صورت ادامه مشکل روند انجام آزمایش را به منظور شناسائی خطاهایی مثل عدم دقت در مخلوط نمودن را بررسی و حل می کنیم.**
- **در غیر اینصورت با شرکت پشتیبان تماس گرفته می شود.**

آزمایش دوتائی یا دوبل(Duplicate Test)

روش محاسبه آماری SD

Example

WBC (x 10^9/L)

Specimen	1st count	2nd count	d	d^2
1	5.4	5.8	0.4	0.16
2	8.3	10.5	2.2	4.84
3	17.2	18.0	0.8	0.64
4	5.4	5.4	0	0
5	12.2	11.8	0.4	0.16
6	14.3	13.8	0.5	0.25
7	6.2	6.4	0.2	0.04
8	8.2	8.6	0.4	0.16
9	7.3	7.5	0.2	0.04
10	5.4	5.9	0.5	0.25

$\sum d^2 = 6.54$

$$\frac{d^2}{2n} = \frac{6.54}{20} = 0.327$$

$$\sqrt{\frac{\sum d^2}{2n}} = 0.5718$$

Therefore SD = 0.57 2SD = 1.14

Calculate the standard deviation: $SD = \sqrt{\frac{\sum \text{ of } d^2}{2n}}$

کنترل کیفی سل کانتر
آزمایش بازبینی یا چک تست (Check test)

- **زمان انجام:** روزانه ۵ نمونه از روز، شیفت یا run قبل باید انجام شود
- در صورت نگهداری نمونه ها در دمای مناسب (یخچال) قابل اجرا می باشد.
- بدین ترتیب که در ابتدای کار ۵ – ۴ نمونه از روز قبل را از یخچال خارج نموده و پس از رسیدن به درجه حرارت اتاق و خوب مخلوط شدن مورد آزمایش قرار می گیرند
- نتایج حDمورد بررسی
- اختلاف نتایج در محدوده 2SD قابل قبول می باشد .
- در صورت نگهداری نمونه ها در شرایط مناسب ، هرگونه تغییر در نتایج خارج از این محدوده نشان دهنده اشکال درعملکرد دستگاه و یا معرفها می باشد.
- این آزمایش برای بررسی هموگلوبین مناسب بوده و به میزان کمتر برای شمارش گلبولهای قرمز و سفید کاربرد دارد ولی برای هماتوکریت بخصوص اگر فاصله زمانی آزمایش نمونه ها بیش از ۶ ساعت باشد کارایی ندارد.

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

کنترل کیفی سل کانتر
ارزیابی دقت ماهیانه

- ماهی یک بار ۲ نمونه را ۱۱ بار پس از خوب مخلوط نمودن به دستگاه داده و Mean؛ SD؛CV را ارزیابی می کنیم . CVبدست آمده باید کمتر از CVاعلام شده توسط شرکت سازنده باشد.

CV دستگاه فول دیف Mindray

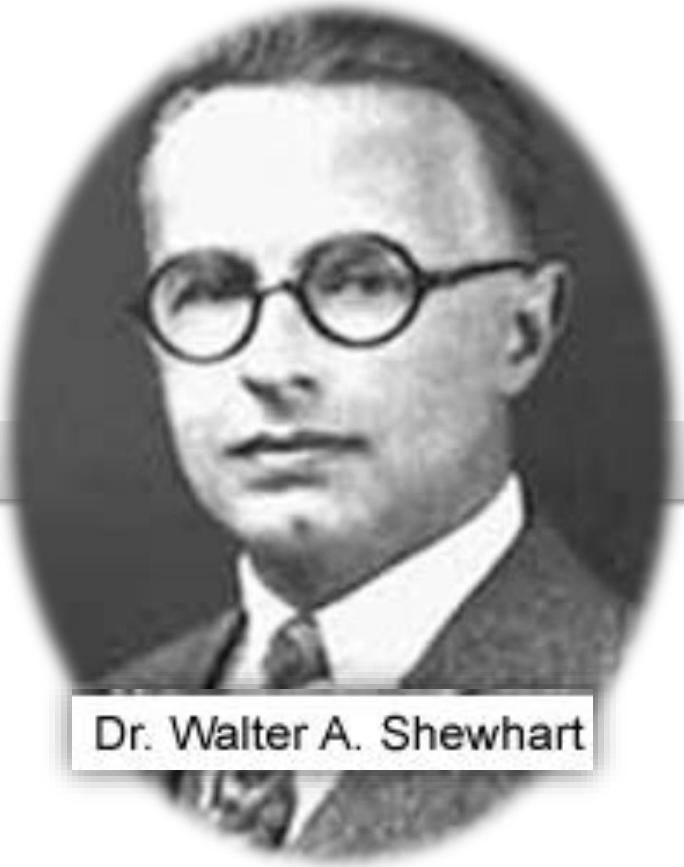
Parameter	Condition	Whole Blood Reproducibility CV / absolute devition d*
WBC	(4.0-15.0) * 10^9/L	≤ 2.5%
Net%	50.0%-60.0%	± 5.0%
Lym%	25.0%-35.0%	± 3.0%
Mon%	5.0%-10.0%	± 2.0%
Eos%	2.0%-5.0%	± 1.5%
Bas%	0.5%-1.5%	± 0.8%
RBC	(3.50-6.00) * 10^{12}/L	≤ 1.5%
HGB	(110-180)g/L	≤ 1.5%
MCV	(80-110)fL	≤ 1.5%
PLT	(100-500) * 10^9/L	≤ 4.0%
P-LCR	20%≥	≤ 8.0%
P-LCC	30-90 * 10^9/L	≤ 8.0%

CV دستگاه پارشیال دیف Sysmex

Parameter	Condition	Whole Blood Reproducibility CV / absolute devition d*
WBC	(4.0-15.0) * 10^9/L	≤ 2.5%
RBC	(3.50-6.00) * 10^{12}/L	≤ 1.5%
HGB	(110-180)g/L	≤ 1.5%
MCV	(80-110)fL	≤ 1.5%
MCH	(27-33)pg	≤ 1.5%
MCHC	(33-37)g/dl	≤ 1.5%
PLT	(100-500) * 10^9/L	≤ 4.0%

In 1931,

Dr. Walter Shewhart, a scientist at the Bell Telephone Laboratories, proposed applying **statistical based control charts** to interpret industrial manufacturing processes.



Dr. Walter A. Shewhart

In 1950,

S. Levey &

E.R. Jennings

suggested the use in the clinical laboratory.

QC at Analytical stage

کنترل کیفی سل کانتر
ارزیابی با استفاده از خون کنترل و رسم منحنی

- **زمان انجام :** روزانه یک نمونه کنترل را در ابتدا و زمان شروع به کار ، به دستگاه داده و نتایج را باید تفسیر نمود.
- طبق توصیه های مراجع معتبر خونشناسی بین المللی برای کنترل کیفی سل کانتر استفاده از خون کنترل **در دو دامنه** ضروری می باشد ولی با توجه به آنکه در کشور ما این روش کاربرد چندانی ندارد استفاده از خون کنترل در یک دامنه کافی بنظر می رسد .
- ***در صورت عدم دسترسی به خون کنترل ، استفاده از حداقل دو روش دیگر کنترل کیفی (که در فوق شرح داده شده است) که هم خطاهای سیستماتیک و هم خطاهای تصادفی را مشخص نمایند ، اجباری می باشد.***

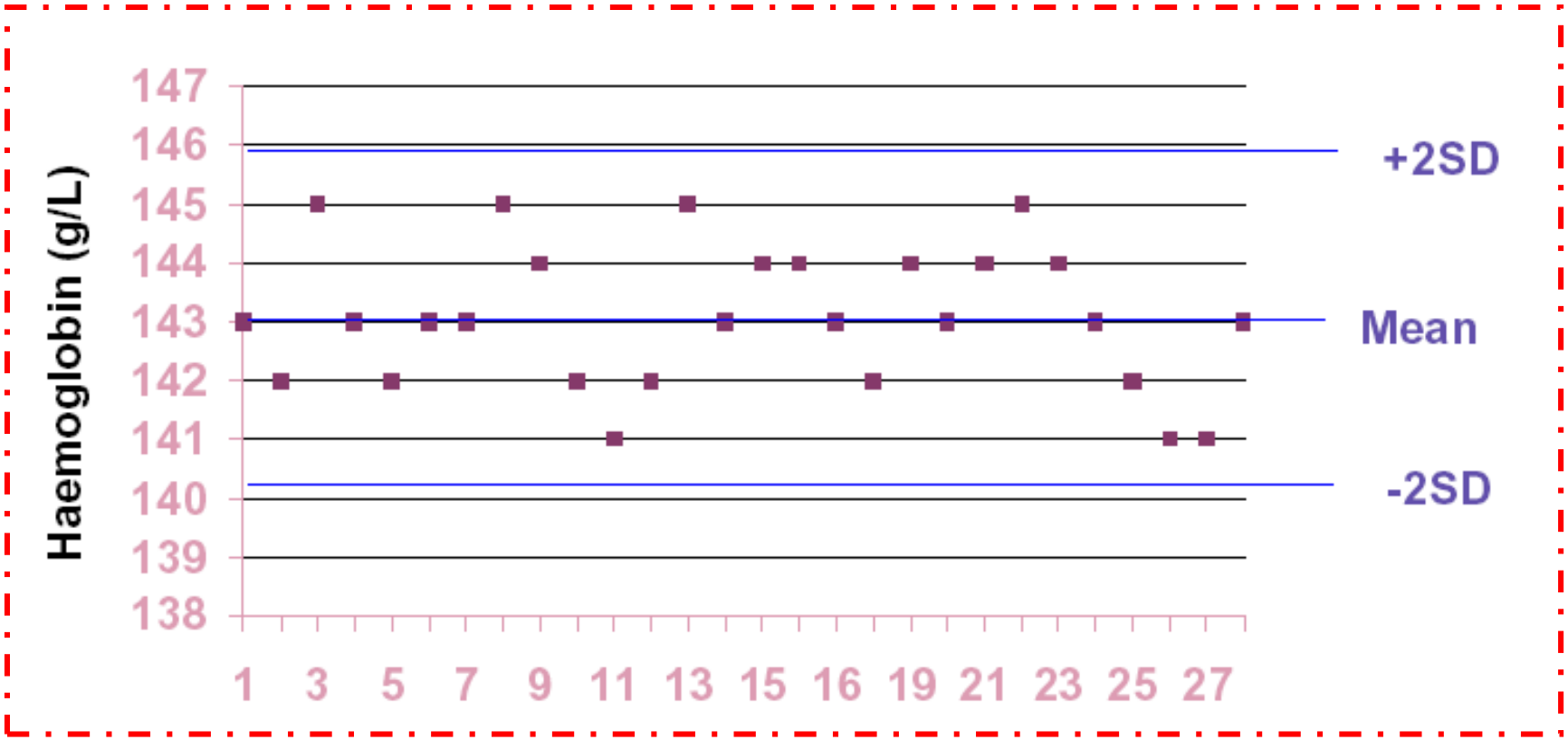
کنترل کیفی سل کانتر
ارزیابی با استفاده از خون کنترل و رسم منحنی

- از نمونه‌های کنترل سلولهای خونی که بطور تجارتی دردسترس می باشند می توان هرروز صبح استفاده 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 ۲۰خوانده برای هر پارامتر حاصل گردد .
- پس ازمحاسبه میانگین و انحراف معیار های ±1SD ، ±2SD و ±3SD برای هر پارامتر ، مقادیر آنها بر روی محور عمودی و روزها بر روی محور افقی ثبت می‌گردد.
- نمودار کنترل کیفی با استفاده از قوانین لوی جنینگ یا وستگارد یا سازمان جهانی بهداشت تفسیر می گردد
- نکته مهم : با توجه به در دسترس نبودن منظم خون کنترل توصیه می گردد قبل از اتمام خون کنترل سری جدید خریداری و ۴ روز به همراه سری قبلی ارزیابی می گردد لذا از تغییر کایبراسیون بی مورد جلوگیری می کند.

The chart will suggest that there is a fault in technique, instrument, pipette or reagents if one of the following occurs :

First check that the material itself has not become infected or in other ways has begun to deteriorate

Levey-Jennings Control chart



In control: values oscillate around mean, within +/- 2 SD

Test Replication

- The mean of replicate assays of control material is more informative than a single measurement.
- ***Paired assays*** are recommended. Not only does the mean of the pair give a **more exact value**, but the difference between members of a pair also gives an **estimate of imprecision**.
- ***Overlap*** *is a special case of test replication. When a* ***new lot*** *of control material is received, it should be* tested in parallel with the currently used lot ***for four days***.
- This will establish the ratio of the assigned values of the incoming lot to the assigned values of the currently used material.
- ***Differences in assigned values of the two lots should not be taken as an indication to recalibrate.***

When a control point is outlier…

- **You can use two types of rules for interpretation:**

WHO & Westgard

Warning rule = use other rules to inspect the control points

Rejection rule = "out of control"

- Stop testing
- Identify and correct problem
- Repeat testing on patient samples and controls
- **Do not report patient results until problem is solved and controls indicate proper performance**

Westgard Rules

- Multi-rule QC
- It uses a combination of decision criteria, usually 5 different control rules to judge the acceptability of an analytical run.

Explanation of Individual Rules

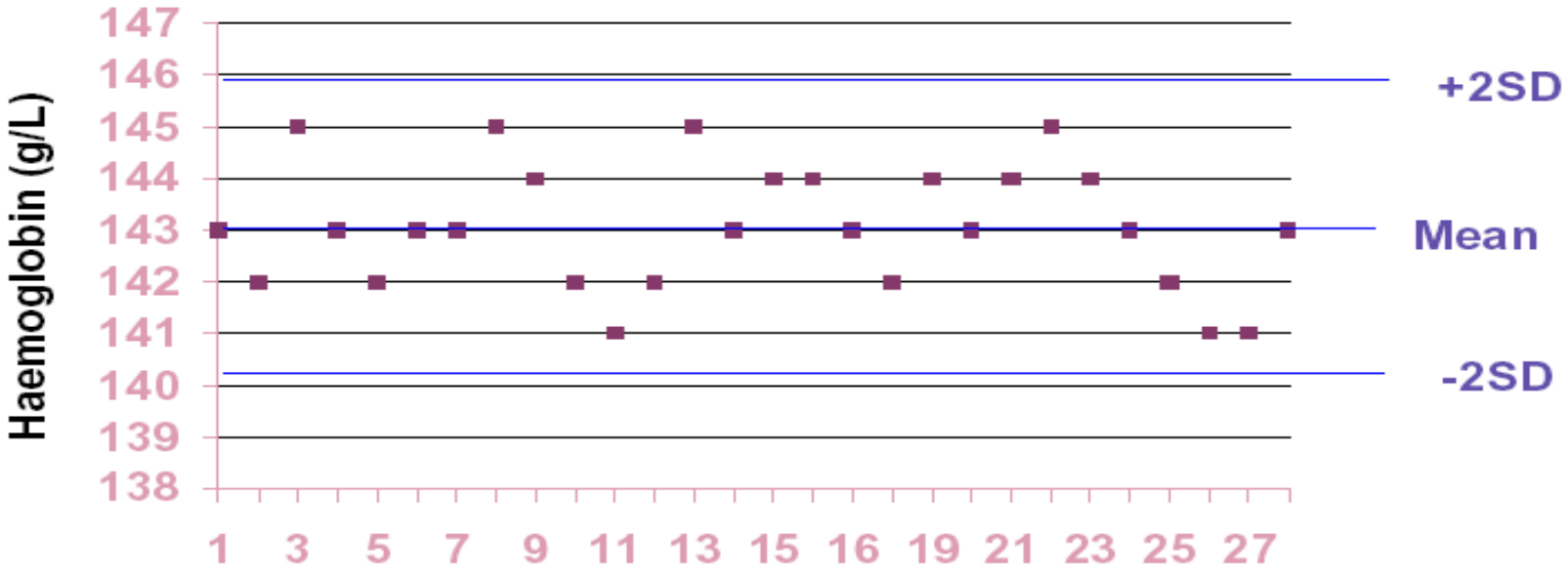
- **1_{2s} :** One control measurement exceeding 2 standard deviations of control limits either above or below the mean. This rule is used a ***warning rule*** to trigger careful inspection of the control data.
- **1_{3s} :** This rule is commonly used with a Levey-Jennings chart when the control limits are set as the mean $\pm$3 standard deviations of control limits. A run is ***rejected*** when a single control measurement exceeds the mean $\pm$3 control limits.
- **2_{2s}** : The control run is ***rejected*** with 2 consecutive control measurements 2 standard deviations of control limits on the same side of mean with this rule.
- **R_{4s}**: This rule ***rejects*** a run if two control measurements in a group exceed the mean with a 4 standard deviation difference between the 2 controls
- **4_{1s}**:This rule ***rejects*** a run with the 4th consecutive control measurement exceeding 1 standard deviation on the same side of the mean.
- **10_{x}**: This ***rule rejects*** a control run when there are 10 consecutive controls on the same side of the mean.

WHO Rules

1 control value outside the mean+/- 2SD	Warning
1 control value outside mean+/- 3SD	Reject : SE or RE
2 consecutive controls exceed mean +/- 2SD	Reject : SE
4 consecutive controls exceed mean + SD or mean – SD	Reject : SE
6 consecutive controls on one side of the mean	Warning : SE

SE : systematic error RE : random error

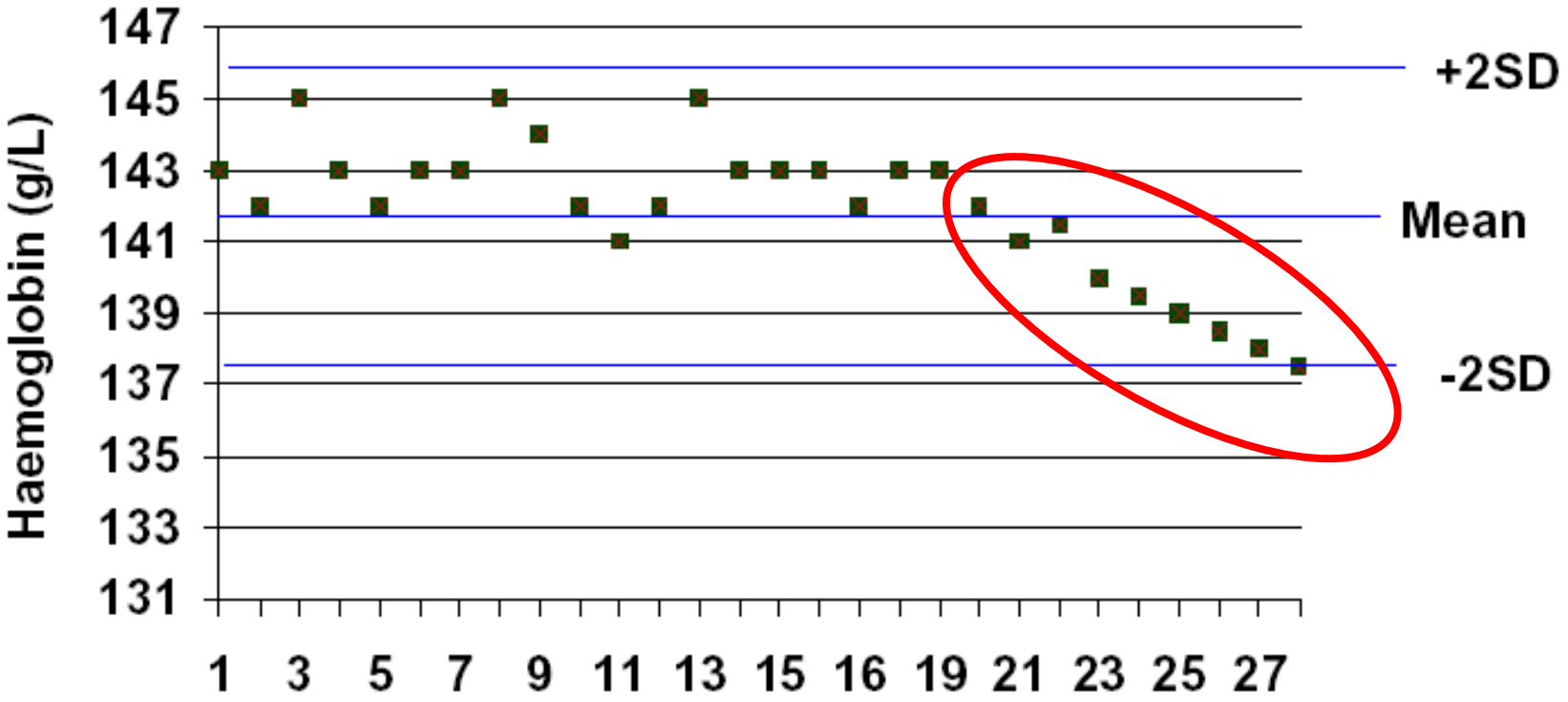
نمودار کنترل کیفی در وضعیت کنترل



In control: values oscillate around mean, within +/- 2 SD

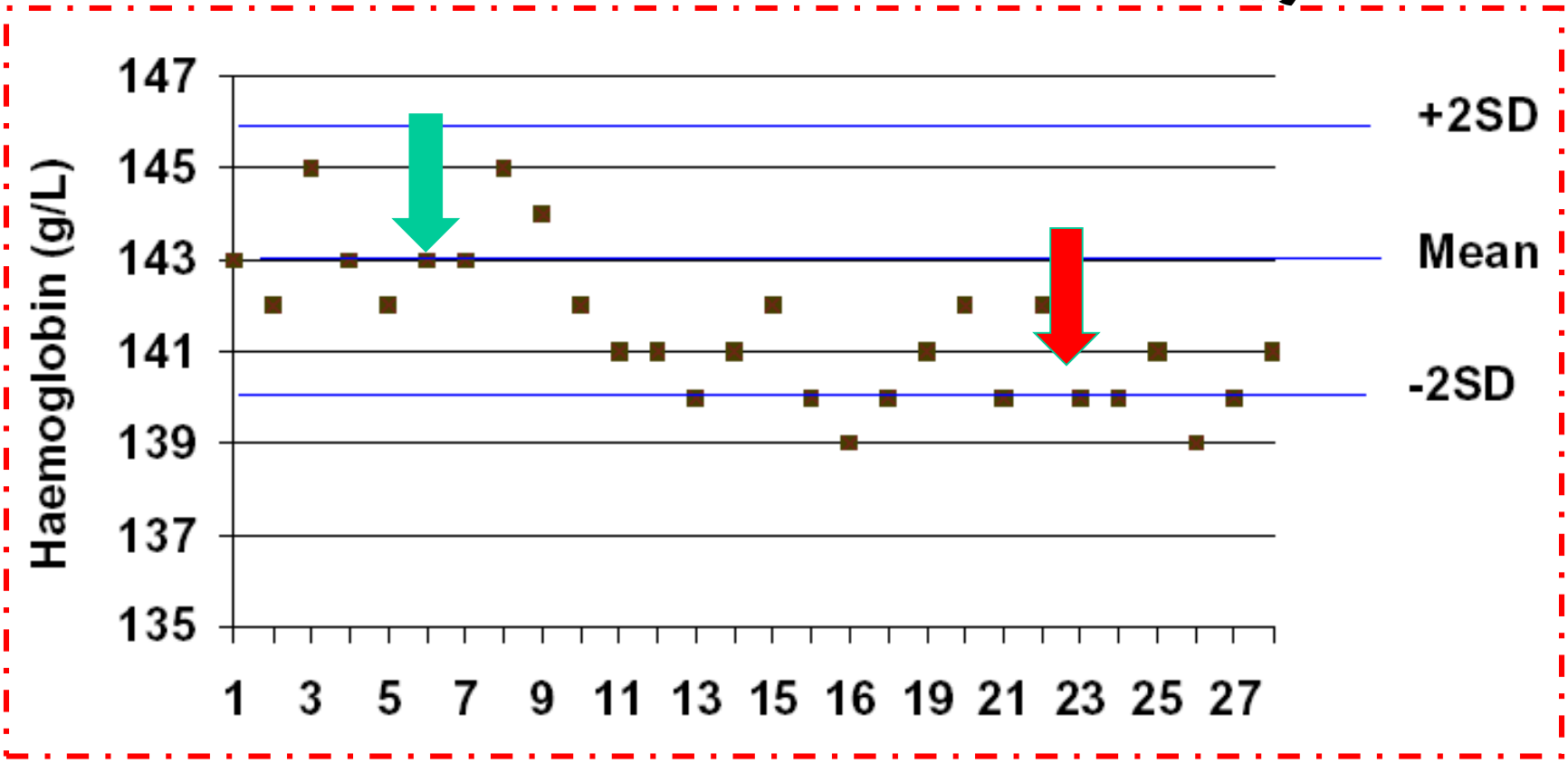
Out of control : values drift, problem progressively developing

- هر گاه نتایج ۳ روز پشت سرهم در یک سمت میانگین روند افزایش و کاهش را نشان دهد میگوئیم Drift اتفاق افتاده است. نشان دهنده خرابی کنترل یا معرف است.



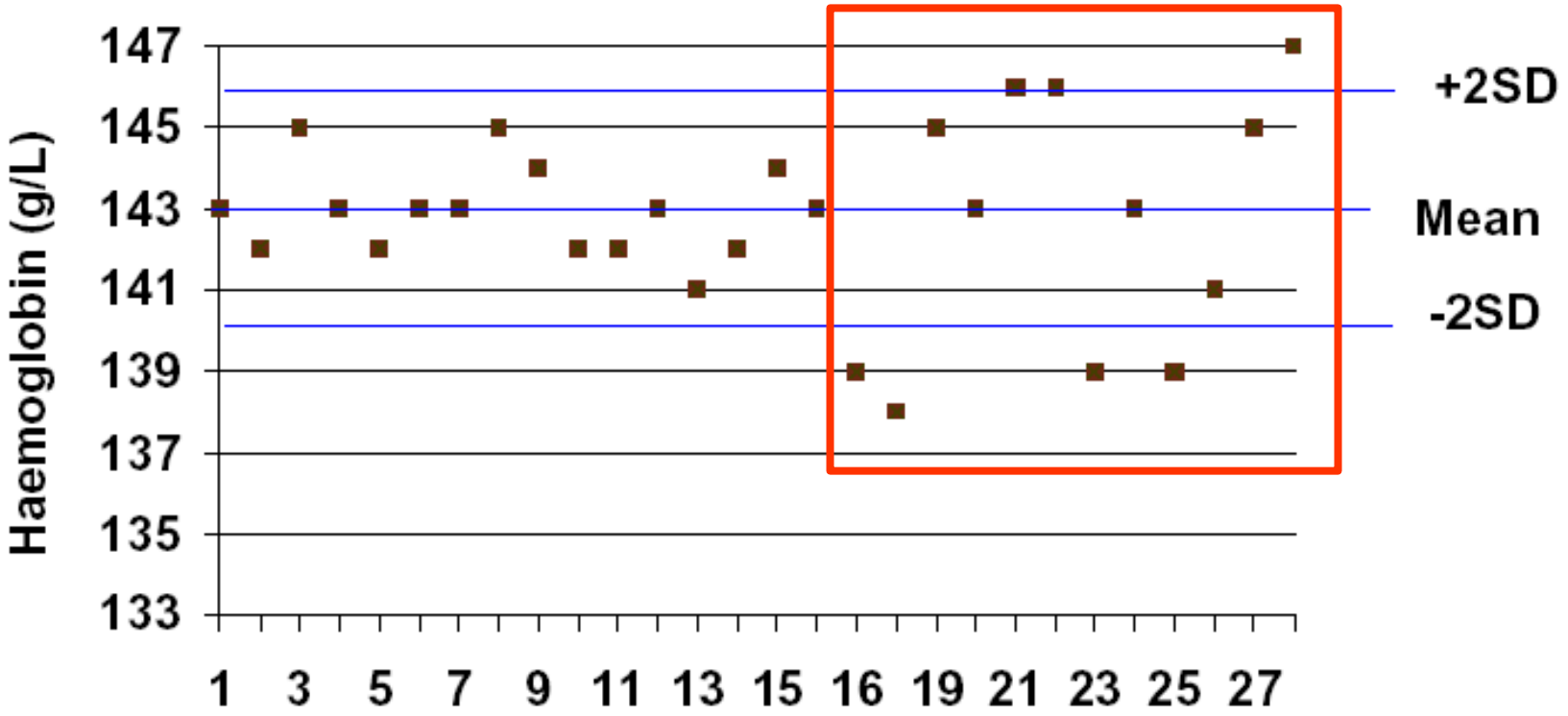
Out of control,shift: abrupt change, values oscillate around new mean

- هر گاه تغییر ناگهانی در میانگین اتفاق افتد نشان دهنده خرابی یا از کالیبر خارج شدن دستگاه و یا تغییر تکنیک است و به آن Shift گویند.



Out of control : Increased dispersion, random errors eg. technique

- هر گاه انتشار نتایج اطراف میانگین زیاد شود به آن Dispersion گویند که نشان دهنده افزایش خطای تصادفی و یا عدم ثبات در تکنیک است.



Moving Averages (*Bull's method*), Patients Data

- large laboratories (at least 100 blood count / day)
- Assumes the population sampled each day remains constant
- Therefore the calculated indices (MCV, MCH and MCHC) remain stable
- As any significant change may indicate : *instrument or technical fault*
- As accurate as 4C preparations
- For manual method use MCHC

Moving Averages

- Before setting up this procedure it is necessary to establish the SD.
- This is done by calculating the **mean on *11*** consecutive working days & calculating the SD

$$SD = \sqrt{\frac{\Sigma(x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$ where x = daily mean, $\bar{x}$ = mean of daily means and

n = number of days. In this case, therefore, n - 1 = 10.

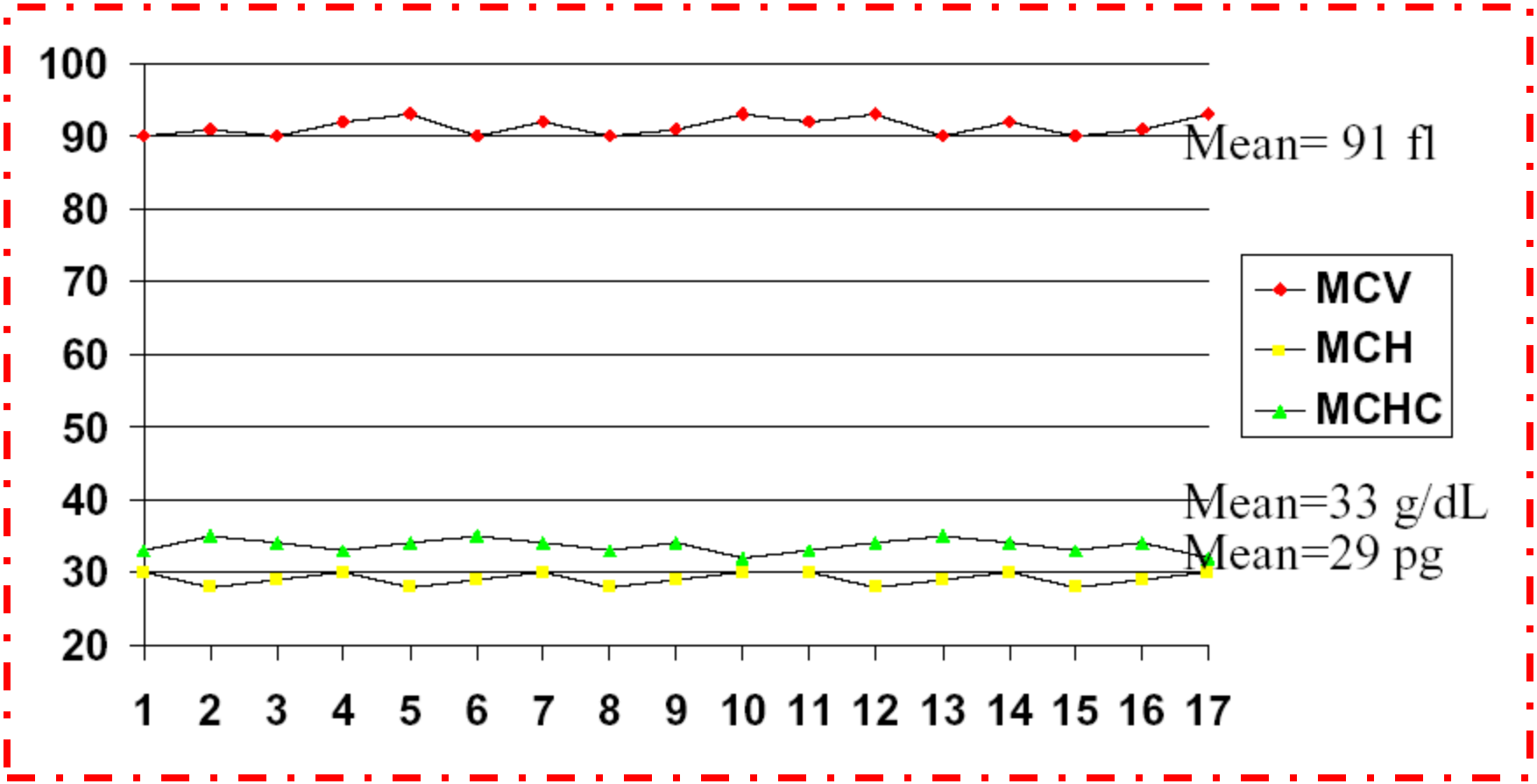
- Plot the data on a graph
- The mean rbc indecies is calculated at the end of each day
- Determine mean indecies values for each batch

of 20 patients, plot on control chart

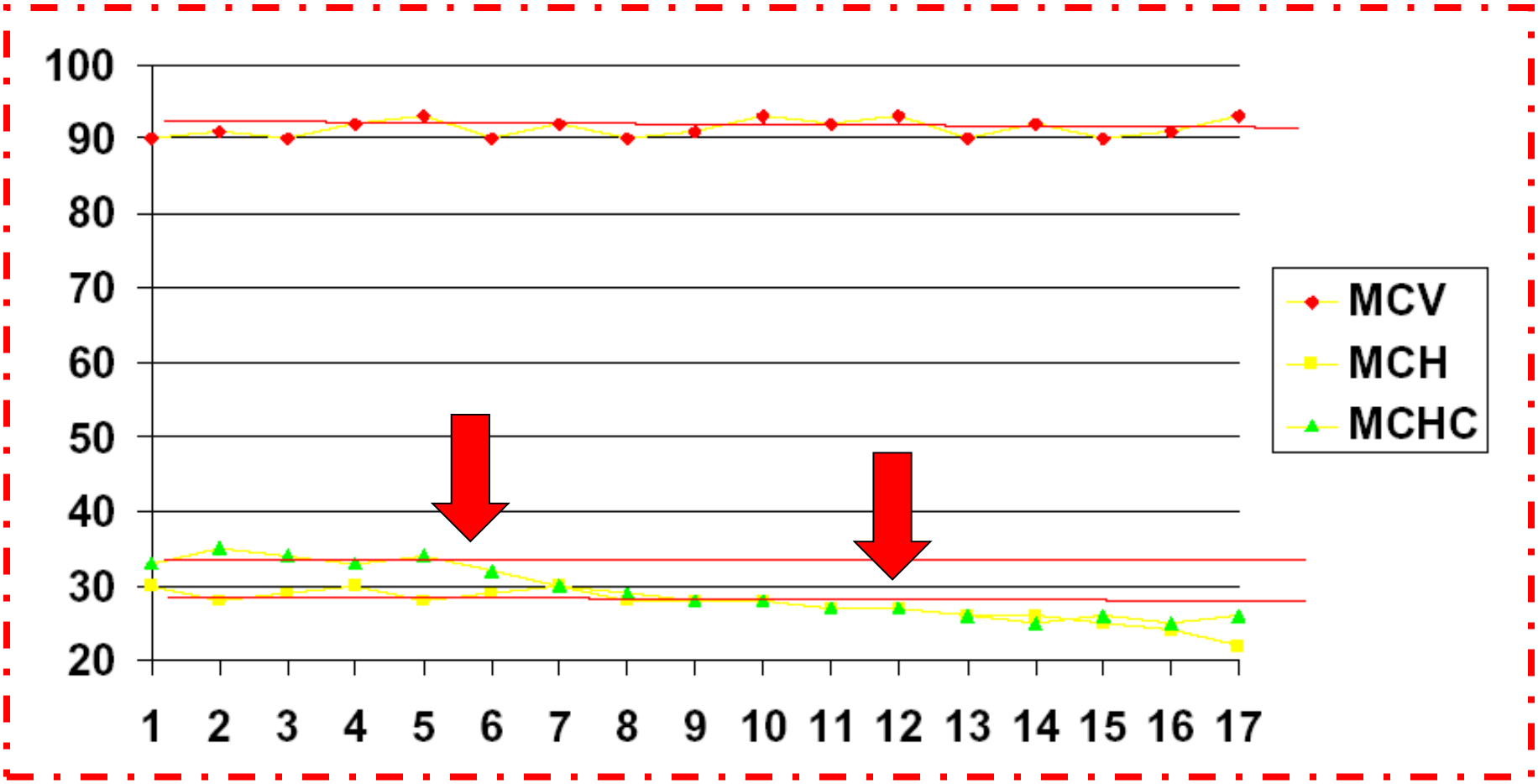
Moving Averages

- **Results are valid only if the population does not significantly from *day to day***
- **Tests are not selectively *biased* (specific outpatient clinics) (exclusion or median)**
- **Any batch of 20,no more than 7 should come from one clinical source or have the same clinical condition.**
- **If the test is being performed satisfactorily, the mean will not vary by more than 2SD on any day.**
- **The acceptable range is +/- 3% of the mean.**
- ***Moving averages cannot be used to monitor leukocyte or platelet counts, as those counts are variable within a patient population.***

Moving Averages



Moving averages - low Hemoglobin



Changes in the moving averages graphs indicate where the problem might be in the system. eg. If the light source for Hb is becoming weak, then the calculated MCH and MCHC values will fall

Moving averages

CAUSE	**MCV**	**MCH**	**MCHC**
Low Hb	no change	low	low
High Hb	no change	high	high
Low RCC	high	high	no change
High RCC	low	low	no change
Low Hct	low	no change	high
High Hct	high	no change	low