پژوهنده (مجله پژوهشي دانشگاه علوم پزشكي شهيد بهشتي)
سال دوازدهم, شماره ۴, پي در پي ۵۸ ، صفحات ۳۲۹ تا ۳۳۸
مهر و آبان ۱۳۸۶

تاريخ دريافت مقاله ۸۴/۱۱/۳۰
تاريخ تجديد نظر ۸۵/۱۲/۲۲
تاريخ پذيرش مقاله ۸۶/۳/۷

مقايسه ی نتايج سنجش سطح خوني هموگلوبين A_2 به روش كروماتوگرافي تعويض كاتيوني دستگاه **HbGold** با روش مرجع ميكروكروماتوگرافي

دكتر پيمان محمدی تربتی[1] *، دكتر نازيلا رستگار راد[2]

چكيده

سابقه و هدف: *بيماري تالاسمي يكي از شايع ترين بيماريهاي ارثي كشور ماست. لذا استفاده از بهترين روش‌هاي آزمايشگاهي براي غربالگري زوجين از نظر افزايش سطح خوني HbA_2 حائز اهميت و ضروري است. هدف از اين مطالعه مقايسه كارآيي روش كروماتوگرافي تعويض كاتيوني دستگاه HbGold با روش مرجع يا استاندارد طلايي ميكروكروماتوگرافي مي‌باشد.*

مواد و روش ها: *اين تحقيق به روش كارآزمايي باليني تشخيصي بر روي ۳۲۱ نمونه خون EDTA كه به طور تصادفي بر مبناي نتايج آزمون‌هاي RDW-CBC به عنوان فرد سالم يا ناقل بتاتالاسمي شناسايي و تفكيك شده بودند، انجام گرفت. مؤلفه‌هاي عملكردي هر دو متد از جمله عدم دقت، عدم صحت و حداكثر خطاي مجاز آناليتيك روش كروماتوگرافي تعويض كاتيوني HbGold با روش استاندارد طلايي ميكروكروماتوگرافي مورد مقايسه قرار گرفت.*

يافته ها: *نتايج نشان مي‌دهد كه عدم دقت و عدم صحت روش HbGold از حد مجاز تعريف شده كم تر است. خطاي سيستماتيك و خطاي رندوم اين متد به ترتيب ۲/٤ و ۲/۵% بود. و خطاي مجاز كلي آناليتيك ٤/۹% مي‌باشد كه هر سه مؤلفه در دامنه قابل قبول است. عملكرد اين متد ۳/۲ سيگما بوده و در محدوده مارژينال است و دامنه مرجع آن ۳/۱۸-۱/٦۲% مي‌باشد.*

نتيجه گيري: *نقطه عملكرد دستگاه HbGold در مقايسه با روش استاندارد طلايي در سطح پايين‌تر يعني سطح مارژينال قرار دارد. لذا استفاده از اين متد نيازمند به كار گرفتن ضوابط كنترلي چند قانوني و چندسطحي است تا با حفظ احتمال رد كاذب جواب به ميزان كم تر از ۳% احتمال شناسايي خطاهاي واقعي را در محدوده بيش از ۹۰% تنظيم نمايد. وجود دامنه پنجره به ميزان ۰/۳۲ در روش HbGold امكان تفكيك بهتر افراد سالم و ناقلين بتاتالاسمي را در مقايسه با روش مرجع فراهم مي‌آورد.*

واژگان كليدي: *هموگلوبين A_2 ، كروماتوگرافي تعويض كاتيوني، ميكروكروماتوگرافي، **HbGold***

مقدمه

يكي از شايع ترين بيماري هاي ارثي سيستم خونساز در خاورميانه و از جمله كشور ما بيماري تالاسمي مي‌باشد. با توجه به فراواني ازدواج‌هاي فاميلي و وجود تعداد قابل توجهي از افراد ناقل بتاتالاسمي، انجام آزمايشات CBC و الكتروفورز هموگلوبين براي شناسايي زودرس ناقلين و پيشگيري از تولد احتمالي نوزادان مبتلا به بتاتالاسمي ماژور از ديـدگاه بهـداشتي، اجتـماعي و اقتصادي از اهميت ويژه‌اي برخوردار است (۱).

مبتلايان به بتاتالاسمي ماژور نياز به ترانسفوريون‌هاي مكرر دارند كه خـود منـجر به عـوارض متعدد و تحميل هزينه‌هاي گزاف بر نظام بهداشتي- درماني كشور مي‌گردد، لذا ضروري مي‌نمايد كه به هنگام انجام آزمايشات پيش از ازدواج، بهترين روش‌هاي آزمايشگاهي براي غربالگري زوجين از نظر افزايش سطح خوني HbA_2 به كار گرفته شود (۲و۳).

۱ * . نويسنده مسؤول : استاديار، گـروه پاتولـوژی، دانشـگاه علـوم پزشكي شهيد بهشتي. آدرس براي مكاتبه: تهـران، خيابان پاسداران، بوستان نهم، بيمارستان دكتر لباف‌نژاد. كـدپستي ۱٦٦٦٦. تلفن:۲۲۵٤۹٤۲۱ و ۲۲۵٤۹۰۱۰-۱۸ داخلي (۲۵۷). نمابر: ۲۲۵٤۹۰۳۹. پسـت الكترونيک: **p2000torbati@yahoo.com**
۲ . دستيار پاتولوژی، دانشكده پزشكی، دانشگاه علوم پزشكي شهيد بهشتي

طبـق توصيـه International committee for standardization in hematology(ICSH) بهتر است در اين موارد HbA_2 به روش الكتروفورز استات سلولز و يا كروماتوگرافي تعويض يوني اندازه‌گيري شود. با اين حال ساير روش‌ها مثل دانستيومتري، ايمونوديفيوژن شعاعي (SRID)، HPLC ياكروماتوگرافي مايع با فشار زياد در سال‌هاي اخير براي اندازه‌گيري سطح HbA_2 و جداسازي هموگلوبين‌هاي غيرطبيعي مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۴و۵).

در حال حاضر در بيش تر آزمايشگاه هاي تشخيص طبي كشور، روش الكتروفورز استات سلولز به علت قدمت بيش تر، دسترسي ساده‌تر و ارزان تر به مواد مصرفي و آشنايي تكنيكي پرسنل، انتخاب و به كار گرفتـه شـده است. با اين حال، اين روش قادر به شناسايي برخي از حاملين بتاتالاسمي يا مبتلايان به آنمي بتاتالاسمي نمي‌باشد. از همين رو در سال هاي اخير تكنيك‌هاي دقيق تر همچون HPLC و كروماتوگرافي تعويض يوني در كشورما جايگزين متد استات سلولز شده است (۶). در سال ۲۰۰۱ ميلادي، در كتابچه راهنماي H9-A از مستندات National committee for clinical laboratory science (NCCLS) روش ميكروكروماتوگرافي به عنوان استاندارد طلايي براي اندازه‌گيري HbA_2 معرفي گرديد. درهمان سال دستگاه HbGold با روش كروماتوگرافي تعويض كاتيوني وارد كشور شد و به علت نياز به حجم كم تر نمونه، اتوماتيك بودن روش، سرعت جواب دهي بيش تر، سهولت كاربردي، كاهش نيروي انساني مورد نياز، مقرون به صرفه بودن از نظر اقتصادي و دارا بودن توانايي‌هاي جانبي مشتمل بر شناسايي انواع غيرطبيعي هموگلوبين و HbA_1C مورد توجه و اقبال قرار گرفت (۴).

هدف كلي اين تحقيق مقايسـه مؤلفه‌هاي عمـلكردي متد HbGold (همچون عدم دقت، عدم صحت و ميزان خطاي كلي مجاز آناليتيك بر اساس استانداردهاي تعيين شده) توسط Clinical laboratory improvement amendment 88 يا به اختصار CLIA 88 با روش مرجع ميكروكروماتوگرافي و بررسي كارآيي متد بر اساس ضوابط سيگماتريك و نهايتاً ارزيابي دامنه مرجع اين متد مي‌باشد.

مواد و روش ها

تحقيق حاضر به روش تشخيـصي انجام گرفت. روش ميكروكروماتوگرافي به عنوان روش مرجع و كروماتوگرافي تعويض كاتيوني با استفاده از آنالايزر HbGold به عنوان روش *"مورد مقايسه"*، انتخاب گرديدند و مقدار HbA_2 در افراد سالم و ناقلين بتاتالاسمي مورد سنجش قرار گرفت. در اين مطالعه ۳۲۱ نمونه خون EDTA به طور تصادفي از بين نمونه‌هاي خون مربوط به مراجعين به بيمارستان‌هاي لبافي‌نژاد و پارس تهران كه در غربالگري اوليه بر مبناي نتايج آزمـون‌هاي CBC، RDW به عنوان فـرد سالـم يا ناقل بتاتالاسمي شناسايي شده بودند، مورد آناليز قرار گرفتند.

نمونه‌هاي خون فقـط بايد با ضـد انعقاد EDTA تهيـه مي شدند. ليپميك، ايكتريك يا ليز بودن تأثيري بر نتيجه آزمايش به روش HbGold يا ميـكروكروماتوگرافي نداشته و لـذا در ورود به مطالعـه در نظر گرفته نشدند. نمونه‌هايي كه RDW بيش از ۱۲/۵% و HbA_2 < ۱/۵% داشتند از مطالعه حذف شدند.

اندكس Mentzer (نسبت MCV/RBC) كم تر از ۱۳ ارزش اخباري مثبت به نفع تالاسمي و بيش تر از آن پيشگويي كننده سلامت فرد از نظر توليد هموگلوبين در نظر گرفته شد. همچنين اگر اندكس MCV كم تر از حد پايين دامنه ی مرجع وتوده RBC بيش تر از حد بالاي دامنه مرجع مربوطه بود دلالت بر وضعيت ناقل تالاسمي تلقي شد.

سنجش HbA_2 با سيستم آناليتيك HbGold در كليه مراحل طبق دستورالعمل كارخانه سازنده طي شد. خون EDTA با يك ميلي ليتر آب ديونيزه رقيق شده، به داخل ويال‌هاي نمونه منتقل گرديد. سپس توسط مخلوطكن دوار، مخلـوط و به يكـي از خـانه‌هاي اتو سمپلر انتـقال داده شـد.

هر نمونه با اعمال فشار مکش پمپ سرنگ به داخل حلقه چرخشي دريچه منتقل شده و پس از مخلوط شدن با راژنت به داخل ستون كروماتوگرافي رانده مي‌شد. با تغيير شدت جريان و فشار، اجزاي مختلف هموگلوبين تام بر اساس قدرت يوني خود به تدريج از ستون خارج و توسط اسپكتروفتومتر داخلي، ميزان جذب نوري در طول موج ٤١٥ نانومتر اندازه‌گيري گرديد.

براي سنجش HbA_2 به روش ميكروكروماتوگرافي ۵۰ ميكروليتر از نمونه‌هاي خون EDTA پس از مخلوط شدن با ۲۵۰ ميكروليتر هموليزيت به صورت كامل ليز شد. پس از آماده‌سازي ستون ميكروكروماتوگرافي حاوي ژل DE52، دقيقاً ۱۰۰ ميكروليتر از هموليزيت تهيه شده را به آهستگي به سطح ژل اضافه كرديم. به طور هم زمان ۱۰۰ ميكروليتر ديگر از همين هموليزيت در لوله آزمايش ديگري با آب مقطر خالص به حجم ۱۵ ميلي‌ليتر رسانده شد. با اضافه كردن ۲/۵ ميلي ليتر بافر به ژل به تدريج HbA_2 از داخل ستون خارج گرديد. در خاتمه جذب نوري لوله هموگلوبين تام و لوله مربوط به استخراج HbA_2 را در طول موج ٤١٥ نانومتر در مقابل آب مقطر اندازه‌گيري و با استفاده از رابطه‌ي زير درصد هموگلوبين A_2 را محاسبه نموديم؛

(OD هموگلوبين تام/OD هموگلوبينA_2) * ۲۰/۱۰۰

نتايج حاصل از مطالعه با استفاده از نرم‌افزارهاي WQC 2 ،EZrule 3 ،linear checker ،Minitab 14، Statgraph 5 مورد تجزيه و تحليل قرار گرفتند و مؤلفه‌هاي آماري مورد نظر توسط آزمون‌هاي آناليز رگرسيون خطي، Deming ، passing–Boblock ، t-student ، Peerson correlation استخراج شده و مورد پردازش قرار گرفتند.

يافته ها

*۱ـ ارزيابي عدم دقت يا خطاي راندوم سيستم آناليتيك **HbGold** (آزمون‌هاي تكرارپذيري و تعميم‌پذيري):*

۱- الف- آزمون تكرارپذيري within-run يا Intra-assay (CV-WR):

با استفاده از مواد كنترل و نمونه‌هاي خون EDTA افراد سالم و ناقل بتا بررسي شد. هر يك از نمونه‌ها براي ٤٠ نوبت متوالي درطي يك دوره كاري آناليتيك مورد سنجش قرار گرفتند. بدين ترتيب تكرارپذيري within-run براي HbA_2 بين ۳/۱-۱/۸% به دست آمد. حداكثر CV مجاز بر اساس ضوابط CLIA ۳/٤% مي‌باشد.

۱- ب- تكرارپذيري between-run يا CV Interassay (CV-BR):

٤ نمونه مشتمل بر ۲ ماده كنترل و ۲ نمونه خون EDTA فرد سالم و ناقل بتاتالاسمي انتخاب وتهيه شد. سپس هر نمونه براي ٤ نوبت وطي ۱۰ روز كاري متوالي مورد سنجش قرار گرفت، بدين ترتيب ضريب تغييرپذيري Interassay براي HbA_2 بين ٦-۳/٤% حاصل شد.

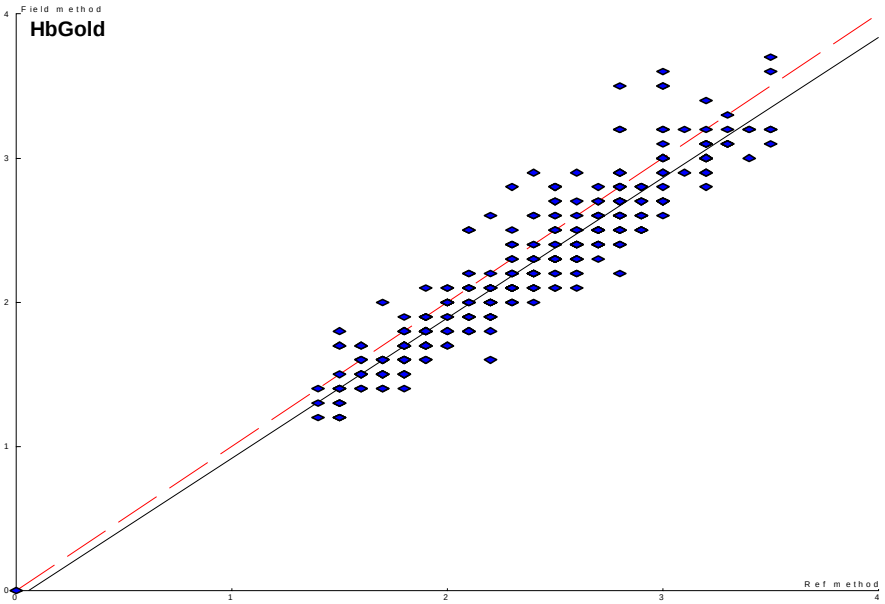
۱- ج- آزمون تعميم پذيري:

اين مطالعه با split ۲۰ نمونه خون EDTA افراد ناقل تالاسمي و ۲۰ نمونه خون افراد سالم و تقسيم آن بين ٤ سيستم آناليتيك در ٤ واحد آزمايشگاهي مستقل انجام پذيرفت. بدين ترتيب CV نتايج آزمون تعميم‌پذيري HbA_2 با استفاده از سيستم HbGold بين ۸/۸-٦/۸% به دست آمد. حداكثر CV مجاز بر اساس ضوابط CLIA ۹/۶% مي‌باشد.

*۲ـ ارزيابي عدم صحت يا خطاي سيستماتيك سيستم آناليتيك **HbGold** در مقايسه با روش مرجع ميكروكروماتوگرافي:*

هر ۳۲۱ نمونه خون EDTA مشتمل بر ۲۳٤ نمونه فرد سالم و ۸۷ نمونه افراد ناقل بتاتالاسمي توسط هر دو متد مورد آناليز قرار گرفتند.

نمودار Difference plot نشان داد كه ميانگين اختلاف بين نتايج دو متد ۰/۱۱۸- (۰/۱٤۰- تا ۰/۵۶۹- با دامنه اطمينان ۹۵%) و ضريب همبستگي نتايج r=۰/۹۷٤ مي‌باشد.



نمودار ۱- نمودار آناليز رگرسيون خطي نتايج HbA_2 بين دو متد HbGold و ميكروكروماتوگرافي

آناليز رگرسيون خطي در نقاط حائز اهميت باليني ۱/۵ ، ۲/۵ ،۳، ۳/۵ درصد (Xc) انجام گرفت. نتايج حاصل از رگرسيون در Xc=۲/۵ در نمودار۱ نشان داده شده است.:

Yc_3=۰/۹۷٤(۲/۵) -۰/۰٦=۲/۳۷۵

Yc_3-Xc_3 = -۰/۱۲۵

از آنجا كه Y-intercept= - ۰/۰٦ مي‌باشد، درصد تورش به عنوان شاخص خطاي سيستماتيك (SE) چنين محاسبه مي‌گردد:

Bias(%)= (۰/۰٦ ÷ ۲/۵) ×۱۰۰=%۲/٤

و از آنجا كه slope خط رگرسيون برابر ۰/۹۷٤ مي‌باشد لذا مي‌توان خطاي سيتماتيك نسبي (PE) و ثابت (CE) را به شرح زير محاسبه نمود:

PE=(۱-slope)×۱۰۰=(۱ -۰/۹۷٤)×۱۰۰=%۲/٦ = ۰/۰۲٦

SE=PE+CE

CE=SE-PE= ۰/۱۲۵ -۰/۰۲٦ = ۰/۰۹۹

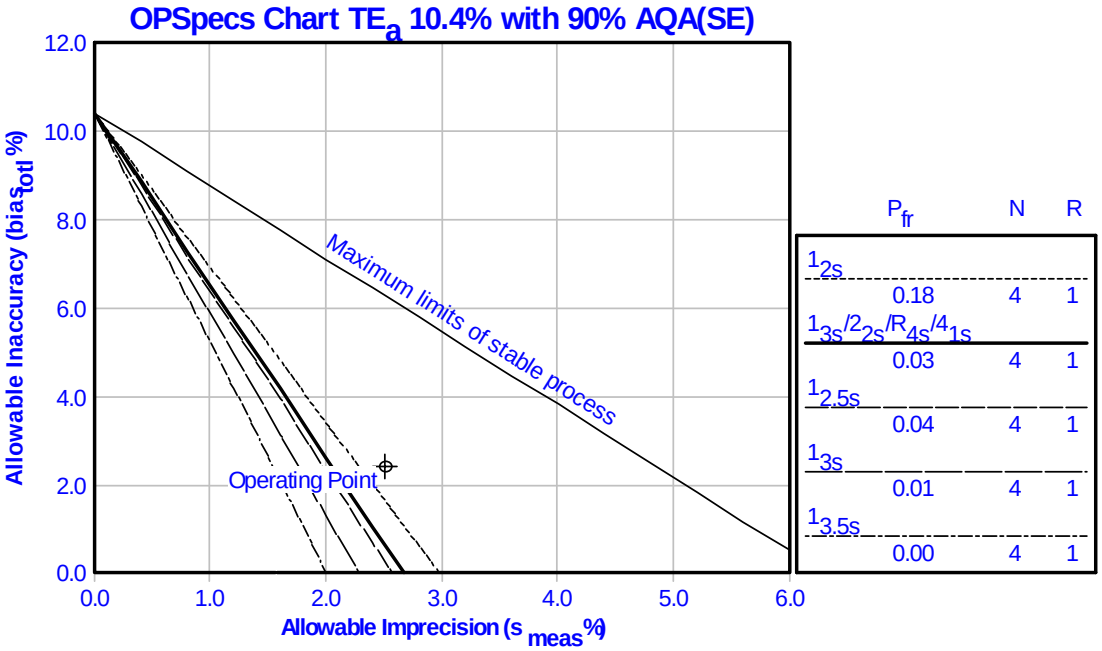
بنابراين شاخص‌هاي خطاي سيستماتيك متد HbGold حاصل از مطالعه مقايسه‌اي برحب درصد برابر CE =%۱/۹۵ ، PE = %۰/۴۵ و SE = %۲/۴ خواهد بود.

۳- ارزيابي عملكرد متد بر اساس ضوابط سيگمامتريك:

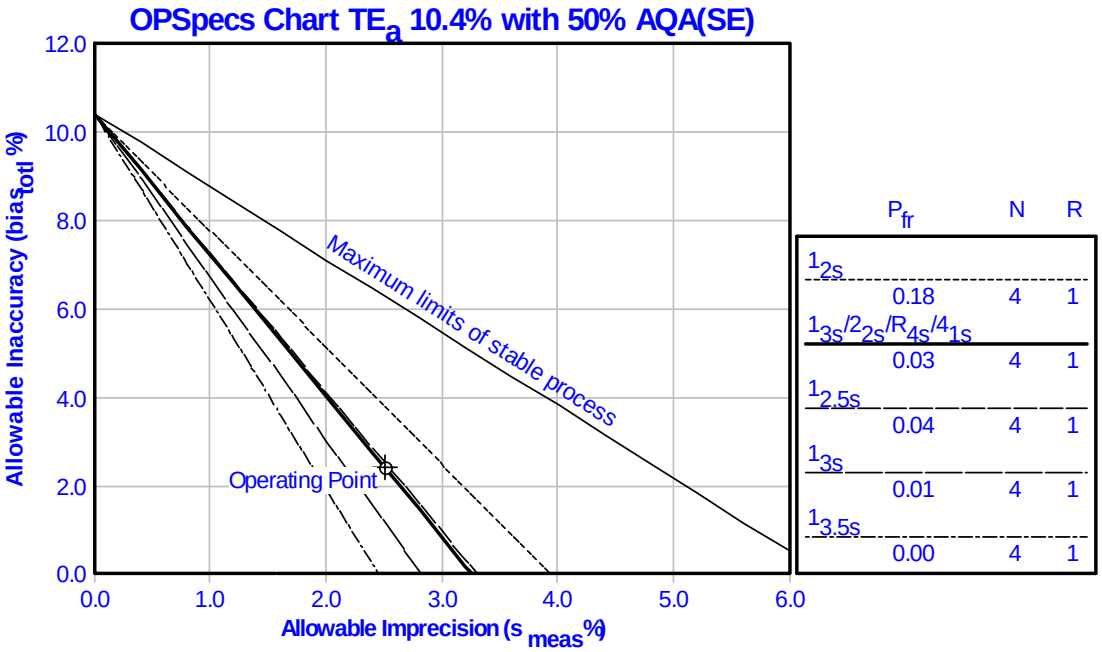
براساس ضوابط CLIA 88 حداكثر خطاي مجاز آناليتيك HbA_2 معادل ۱۰/٤% مي‌باشد. از آنجا كه مقدار تورش متد ۲/٤% و ميزان عدم دقت ۲/۵% مي‌باشد ،با استفاده از ابزار MEDx عملكرد متد معادل ۳/۲ و در حد مارژينال محاسبه گرديد،كه در مقايسه با سيگمامتريك ۵/۵ روش مرجع در حد پايينتري قرار دارد.

*٤ـ تعيين دامنه مرجع HbA_2 به روش **HbGold**:*

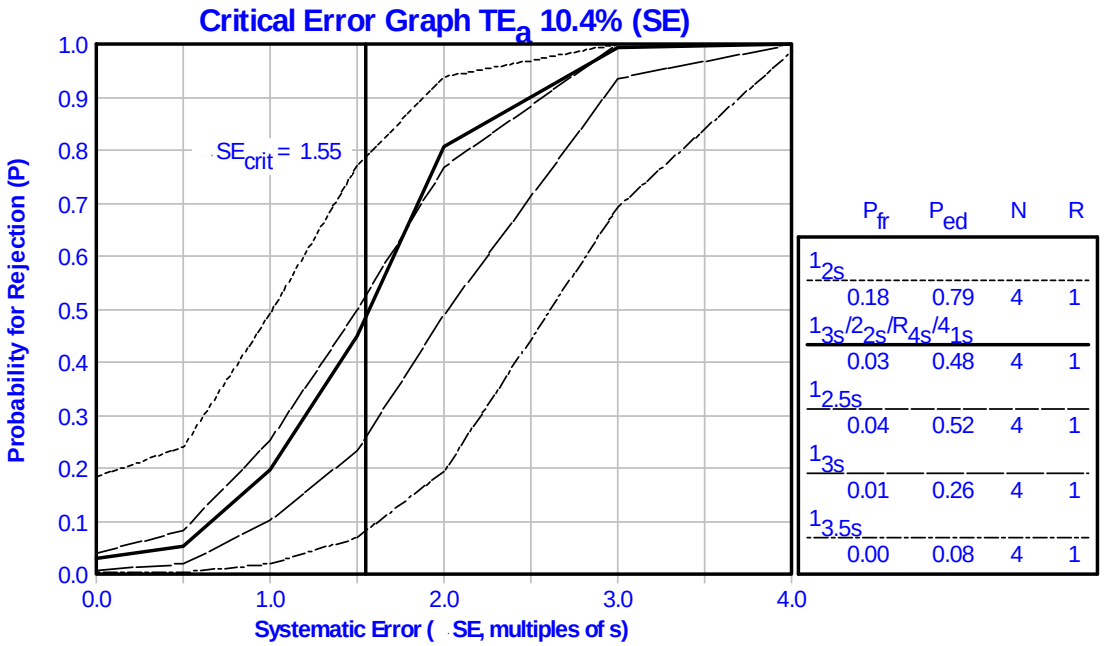
توزيع تجمع فراواني نتايج HbA_2 استخراج شده، با استفاده از نمودار Probability (P-P) و حذف مقادير خارج از صدك ۹۷/۵ و ۲/۵، دامنه مرجع HbA_2 افراد سالم با متد HbGold معادل ۳/۱۸- ۱/٦۲ به دست آمد



نمودار ۲- ارزيابي نمودار Normalized OPS pecs با AQA = ۹۰% و N=٤ براي متد كروماتوگرافي تعويض كاتيوني HbGold



نمودار ۳ - ارزيابي نمودار Normalized OPS pecs با AQA = ۵۰% و N=٤ براي متد كروماتوگرافي تعويض كاتيوني HbGold



نمودار ۴- نمودار تابع توانی متد HbGold با ضابطه $1_{3s}/2_{2s}/R_{4s}/4_{1s}$

بحث

با توجـه به اين كـه انـدازه CV-WR به دست آمده كوچك تر از حداكثر عدم دقت مجاز (CVa=۳/٤%) و كم تر از يک چهارم ميزان خطاي كلي مجاز آناليتيك (TEa) مي‌باشد، لذا آزمون تجربي تكراريذيري دلالت بر قابل قبول بودن اندازه عدم دقت درون آزموني متد دارد (۴). در مطالعه Ou و همكاران (۶) ميزان عدم دقت درون آزموني روش كروماتوگرافي تعويض كاتيوني۳/۶% اندازه گيري شده است كه همچنان در محدوده مجاز است. نكته جالب اين كه با افزايش درصد HbA_2، ميزان CV به ويژه در محدوده مرزي ۳/۵% كه نقطه عطف شناسايي ناقلين بتاتالاسمي است به ۲/۳% تقليل مي يابد. بدين ترتيب ارزش اخباري مثبت متد HbGold در شناسايي ناقلين بتاتالاسمي افزايش مي‌يابد. در مطالعه Keevil (۷)، افزايش CV بين آزموني در مقايسه با CV درون آزموني ۱/۵ تا ۳ درصد برآورد شده است، اين اختلاف با مقادير (۲/۹-۱/۶ درصد) در مطالعه حاضر نيز مورد تأييد قرار گرفته است كه به نظر مي رسد ناشي از تغيير نقطه عملكرد اپراتور، نقطه عملكرد تجهيز و نوسانات فازپره آناليز بوده باشد. بنابر ضوابط (IFCC) International Federtion of clinical chemistry ، CV بين آزموني مي‌تواند حداكثر تا ۳ برابر CV درون آزموني افزايش يابد و عملكرد متد همچنان قابل قبول باشد. لذا افزايش دو برابر CV بين آزموني در اين مطالعه دلالت بر عملكرد مطلوب روش كروماتوگرافي تعويض كاتيوني دارد (۱). درمطالعه Sangkiptron و همكاران (۸) اعتباردهي روش HbGold بر روي ۱۹٦ فرد طبيعي و ۱۲۷ ناقل بتاتالاسمي انجام گرفت. ميزان تكراريذيري درون آزمون ۳/۵-۲/٤%، تكراريذيري بين آزمون ٦/۹-۳/۸% و تعميم‌پذيري ۹/۲-۷/۵% به دست آمد كه نسبت به مطالعه فعلي كليه مؤلفه‌هاي عملكردي، تغييرپذيري بيش تري را نشان مي‌دهند كه با توجه به شرايط اقليمي منطقه مطالعه احتمالاً ناشي از عدم كنتـرل دمـاي محيـط بوده است و توصيـه مي شود تا دماي

محيط كار از°۲۲ تجاوز نكند.

تفاوت در آماده‌سازي نمونه، عملكرد اپراتورها، مشخصات فيزيكي و شيميايي آب ديونيزه مصرفي، تفاوت در peak tracking و تغيير در retention time و ناپايداري راژنت‌ها همگي عواملي هستند كه باعث افزايش CV تام به ميزان ۸/۸ - ٦/۸% گرديده‌اند. در مطالعه Ainley (۹)، CV تام معادل ۱۱/۳ درصد تعيين شده است كه ۱/۷ درصد بيش از CV مطالعه كنوني است لذا توصيه ما بر اين است كه، علاوه بر رعايت شرايط آماده‌سازي، ذخيره و نگهداري نمونه‌هاي EDTA (كم تر از ٤۸ ساعت دردماي°۸-۲ سانتيگراد)، تعداد و گردش اپراتورها حداقل باشد، كنترل كيفي آب ديونيزه در فواصل تعيين شده، انجام، ثبت و پيگيري گردد، دماي محيط بين°۳۰-۱۵ تثبيت شود و قبل از شروع هر دوره كاري آناليتيك براي كنترل موقعيت پيك A_2 از Calibrator mixture استفاده شود. مقدار CV تام متد HbGold به مراتب از روش رايج الكتروفورز استات سلولز كم تر بوده (۱۲-۱۰) و درحد HPLC است (۱۳) لذا چنان چه آزمايشگاه قادر به تهيه سيستم‌هاي پيچيده و گران HbGold نمي‌باشد توصيه مي‌شود تا به جاي روش الكتروفورز از متد مرجع ميكروكروماتوگرافي استفاده نمايد.

مقايسه زوج‌هاي متناظر داده‌ها بين روش HbGold و روش مرجع ميكروكروماتوگرافي معرف همبستگي قابل قبول داده‌هاست (P<۰/۰۰۱ و r=۰/۹۷٤). نتايج رگرسيون خطي معرف آن است كه متد كروماتوگرافي تعويض يوني در مقايسه با متد مبنا درجاتي از خطاي سيستماتيك نسبي (PE) و همچنين خطاي سيستماتيك ثابت (CE) را نشان مي‌دهد. اندازه خطاي سيستماتيك در سطوح حائز اهميت باليني بين ۰/۱۱۲- تا ۰/۱۹۹- تغيير مي‌كند، لذا نتايج روش HbGold به طور متوسط ۰/۱۲ تا ۰/۲ پايين‌تر از نتايج متد مرجع خواهد بود. تورش ۲/٤% از حداكثر تورش مجاز كه ۳/۲% مي‌باشد كم تر است. اينك با در اختيار داشتن اندازه خطاهاي رندوم و سيستماتيك مي‌توان وضعيت عملكرد متد را در مقايسه با حداكثر خطاي مجاز آناليتيك مورد بررسي قرار داد.

TE cal =bias+3CV=SE+RE= %۲/٤ + %۲/۵ = %٤/۹

TE cal = %٤/۹ < Tea = %۱۰/٤

لذا عملكرد متد بر مبناي حداكثر خطاي مجاز آناليتيك CLIA قابل قبول است (۱و۴و۱۴).

پس از صحه گذاري اعتبار متد لازم است تا كارآيي فرآيند نيز مورد ارزيابي قرار گيرد. Esser (۱۵) با استفاده از آناليز شش سيگما كارآيي فرآيند را معادل ۴/۴ و در محدوده مطلوب گزارش نموده است. Miavacca (۱۶) با استفاده از Normalized OPSpec، اندكس عملكرد فرآيند را ۳/۸ به دست آورده است. در مطالعه حاضر نقطه عملكرد متد HbGold در منطقه ۳/۲ سيگمامتريك يا منطقه مارژينال قرار دارد. اما چه عواملي مي تواند اين اختلاف نقطه عملكردي را توجيه كند. سيستم آناليتيك، هنگامي ازكارآيي مطلوب برخوردار خواهد بود كه ساير ضوابط كنترل كيفي مشتمل بر مؤلفه‌هاي آماري و غيرآماري كاملاً تحت كنترل باشند. پرسنل بايد آموزش ديده و تحت نظارت مداوم و مستمر باشند، راژنت‌ها و مواد مصرفي در shelf life مناسب مصرف شوند، تعداد مشاهدات كنترل از N=٤ كمتر نباشد و حتماً از ضوابط چند قانوني چندسطحي همچون $1_{3s}/2_{2s}/R_{4s}/4_{1s}$ استفاده گردد. در عين حال كاليبراسيون و تصديق تجهيز در فواصل زماني تعريف شده انجام گيرد (۳و۴).

باتوجه به نمودار Normalized OPSpec ضابطه كنترلي پيشنهادي براي متد كروماتوگرافي تعويض كاتيوني $1_{3s}/2_{2s}/R_{4s}/4_{1s}$ با N=٤ مي‌باشد (۱۷). حتي در صورت استفاده از اين ضابطه چند قانوني اگر بنابر شناسايي خطاهاي واقعي با احتمال۹۰% باشد، احتمال رد كاذب جواب يا Pfr=۰/۰۳ بوده و همان گونه كه در نمودار ۲ نيز نشان داده شده است نقطه عملكرد در ناحيه ضعيف قرار مي‌گيرد (۱۸).

همان گونه که پیش تر در نمودار ۳ نمایش داده شده است اگر Analytical Quality Assurance (AQA=%۵۰) باشد با حفظ احتمال رد کاذب جواب نقطه عملکرد متد در محدوده مارژینال قرار گرفته و با ضابطه فوق تحت کنترل در مي‌آيد.

چنان چه در نمودار تابع تواني شماره۴ نشان داده شده اندازه خطاي سيستماتيك بحراني (ΔSE) معادل ۱/۵۵ مي‌باشد. بنابراين در صورت شيفت ميانگين به ميزان ۱/۵۵، احتـمال شناسايي خطاي واقعي از ٤٨% ،كم تر و احتمال رد كاذب جواب از ٤%، بيش تر خواهـد شد و متد از حالت پايدار خارج مي‌گردد.

آن چـه در اين مطالعـه در مقايسه با مطالعـات Deacon-Smith (۱۳) و Brueger (۱۹) به عنوان نقطه قوت مطـرح مي‌گردد، ادامه رونـد ارزيابي عملكـرد متـد HbGold توسط سيستم سنجش شش سيگما، نمـودارهاي مختصات عملكردي، تعيين نقطـه عمـلكرد و نهـايتاً مشخص كردن ضوابط كنترلي براي مقادير معين از P_{fr}، P_{ed} به منظور حفظ بهترين نقطـه عملكـردي متـد مي‌باشد (۹و۱۷و۱۸).

نكته‌ی جالب توجـهي كه به هنـگام تعـيين دامنه مرجع HbA_2 در سيستم آناليتيك HbGold به دست آمد، آن است كه برخـلاف انتظار هميشگي دال بر ثابت بودن توليد HbA_2 پس از يك سالگي و تثبيت دامنه مرجع بين ۳/۵-۱/۵% ، اين دامنه در متد HbGold بين ۳/۱۸-۱/٦۲ مي‌باشد (۳و۱۳و۲۰). لذا فاصله بين ۳/۱۸% تا ۳/۵% از جمعيت افراد سالم و همچنين ناقلين بتاتالاسمي خالي است و پيدايش پنجره يا window بين منحني توزيـع نرمال HbA_2 از يك سو و حد پايين منحني توزيع با چولگي راست افراد ناقل، به تفكيك و شناسايي ناقلين بتاتالاسمي با قاطعيت بيش تر نسبت به ساير متدها كمك مي‌كند (۲۱).

سرانجام با اين كه متد كروماتوگرافي ريز ستوني به عنوان متد مرجع تعيين HbA_2 معرفي شده است، نتايج حاصل از اين روش به شدت تابع كيفيت طراحي و انطباق ستون، بافر، گراديان pH و اسمولايته محيط مي‌باشد (۶و۱۲). يافته‌هاي جانبي مطالعه نشان داد كه ميزان تغييرپذيري نتايج آزمون به هنگام استفاده از كيت‌هاي توليد داخل كه فاقد مراحل نظارت بر ساخت و توليد مي‌باشد به ميزان قابل توجهي فزوني مي‌يابد. به نحوي كه علاوه بر افزايش بيش از حد مجاز CV، ميزان خطاي سيتماتيك ثابت و نسبي نيز به حدي تغيير مي‌كند كه خطاي كلي آناليتيك از محدوده مجاز CLIA خارج مي‌شود (۳و۴). لذا پيشنهاد مي‌گردد كيت‌هاي ميكروكروماتوگرافي A_2 جزو اقلامي طبقه‌بندي گردد كه ارائه گواهينامه تأييد صلاحيت بين‌المللي يا تأييد صلاحيت آزمايشگاه رفرانس ايران براي آن ها الزامي باشد.

تشكر و قدرداني

در پايان نويسندگان مقاله از جناب آقاي دكترعلي جاراللهي و سركار خانم وحدت پناه، همكاران محترم آزمايشگاه بيمارستان پارس، به خاطر همكاري صميمانه ايشان تشكر و قدرداني مي‌نمايند.

REFERENCES

1. International committee for standardization in Haematology. Recommendations for selected methods for quantitative estimation of HbA2 and for HbA2 reference preparation. Br J Haematol 1978; 38: 573-8.
2. Henry JB. Clinical diagnosis and management by Laboratory methods.21st ed .New York: W.B. Saunders. 2001; P: 568-9.

3. British Committee for standardization in Hematology, Guideline. The laboratory diagnosis of hemoglobinopathies. Br J Haematol 1998; 101: 783-92.

4. National committee for clinical laboratory standards. HgA Chromatographic (microcolumn) determination of hemoglobin A2; approved standard. NCCLS publication H9A .Villanova, PA: NCCLS, 2001.

5. Tatu T, Gategasem P, Hathirat P. Hemoglobin typing by high performance liquid chromatography. South East Asian J Trop Med Public Health 1997; 28: 417-23.

6. Ou CN, Rognerud CL. Rapid analysis of Hemoglobin variant by cation- exchange HPLC. Clin Chem 1993; 39: 820-4.

7. Keevil BG, Maylor PW, Rowlands D. A rapid anion exchange high performance liquid chromatography method for the measurment of HbA2 in whole blood. Ann Clin Biochem (England) 1996; 33: 253-6.

8. Sangkiptorn S, Pung- amritt P. The validation of an automated liquid chromatography system for the diagnosis of thalassemias and hemoglobinopathies. South East Asian J Trop Med Public Health 2002; 33(4); 826-69.

9. Ainley MJ, Mathiesson B. Comparison of microcolumn chromatography and laser densitometry of isoeletric focusing strip for the quantitation of HbA_2 and Hbs. Clin Lab Hematol 1988; 10(4):461-5.

10. Fucharoen S, Winichagoon P, Wisedpanichkij. Prenatal and post natal diagnosis of thalassemias and hemoglobinopathies by HPLC. Clin Chem 1998; 44: 740-8.

11. Clarke GM, Higgins TN. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias; review and update. Clin Chem 2000; 46: 1284-90.

12. Samperi P, Testa R, Mancuso M. Comparative approach to the evaluation of hemoglobin A_2 by two different methods: high performance liquid chromatography and DE-52 microchromatography. Acta Haematol 1990; 83: 179-82.

13. Deacon-Smith R, Lord I. Hemoglobin A2 Measurement using high performance liquid chromatography. Medical Laboratory Science 1992; 49: 138-40.

14. Henry JB. Clinical diagnosis and management by laboratory methods. 21st ed. New York: W.B. Saunders. 2001; P: 134-5.

15. Esser RS, Blight L, Hjelm NM, Chambers K, James D. Automated quantitative microcolumn chromatography of hemoglobin A_2. Biomed Chromatogr 1991; 5(5): 226-8.

16. Miavacca R, Redschi S. Nonradioactive quantification of low concentrations of hemoglobin A by HPLC for midtrimester prenatal diagnosis of β- thalasemia. Clin Chem 1992; 38(9): 1906-08.

17. Westgard JO, Stein B, Westgard SA, Kennedy R. QC Validator 2.0:a computer program for automatic selection of statistical QC procedures in healthcare laboratories. Comput Method Program Biomed 1997; 53: 175-86.

18. Westgard JO, Stein B. An automatic process for selecting statistical QC procedures to assure clinical or analytical quality requirements. Clin Chem 1997;43: 400-3.

19. Berndt B, Brueger B, Keenan DH. Quantification of Hemoglobin A2 and identification of hemoglobin variants using a fully automated hemoglobin analyzer. Clinical Biochemistry 1988;21:363-6.

20. Mario N, Baudin B. Capillary isoelecrtic focusing and high performance cation exchange chromatography compared for qualitative and quantitative analysis of hemoglobin variants. Clin Chem 1997;43: 2137-42.

21. National committee for clinical laboratory standards. How to Define and Determine reference intervals in the clinical laboratory; approved guidline. NCCLS publication 28-A2 .Villanova, PA: NCCLS, 2000.