اندازه گیری هموگلوبین A_2

اصول- خطاها- دامنه مرجع – تفسیر نتایج

اندازه گیری هموگلوبین F

اصول- خطا ها

ترجمه و گرداوری : دکتر کتایون خداوردیان

ویرایش دوم
تیر 1387

آزمایشگاه مرجع سلامت

اندازه گيري هموگلوبين A2

يكي از تست هاي تشخيصي مهم جهت تأئيد وجود بتا تالاسمي مينور تعيين درصد هموگلوبين A2 مي باشد .هموگلوبين A2را می توان به روش های زیر اندازه گیری نمود:

- کروموتوگرافی تعویض یونی
  1-ستون میکرو
  2- HPLC(کروماتوگرافی تعویض یونی کاتیونیک)
- الکتروفورزاستات سلولز همراه با الوشن

اندازه گیری هموگلوبین A2 با استفاده از ستون میکرو

كروماتوگرافي تعويض يوني از انواع كروماتوگرافي هاي مايع – جامد بوده كه بر اساس واكنش متقابل گروههاي باردار مولكول هموگلوبين و رزين ، جداسازي صورت مي گيرد. بر روي رزين يونهايي وجود دارد كه قابل تعويض با يونهاي همبار خود در هموليزات مي باشند. در اين روش از رزين آنيونيك دي اتيل امينواتيل سلولز DEAE52 استفاده مي گردد.

اساس روش :

1 -تورم رزين با بافر و به تعادل رسيدن آن با بافر تا PH رزين به PH بافر برسد
2 -اضافه نمودن هموليزات به ستون
3 -جداسازي انتخابي اجراي نمونه بوسيله تغيير PH يا قدرت يونيك بافر

در اندازه گيري هموگلوبين A2 به روش كروماتوگرافي ستوني با استفاده ازستون ميكرومي توان از بافر گلايسين يا بافر تريس استفاده نمود.

1) روش گلايسين : بافر اول تركيبي از گلايسين و سيانور پتاسيم (KCN) مي باشد و بافر دوم همان تركيب بافر اول به همراه كلرور سديم مي باشد كه با اضافه نمودن نمك به بافر دوم قدرت يوني آن افزايش يافته و ساير هموگلوبين ها را از ستون خارج مي سازد. PH رزين بايد توسط HCL يك مولار و به كمك PH متر طوري تنظيم شود كه پائين تر از نقطه ايزوالكتريك هموگلوبين A2 بوده و بالاتر از نقطه ايزوالكتريك ساير هموگلوبين ها باشد ، لذا بلافاصله پس از جذب هموليزات به روی رزين و اضافه نمودن بافر اول ، هموگلوبين A2 بصورت يك حلقه از ستون خارج مي شود ، سپس با اضافه كردن بافر دوم ، با افزايش قدرت يوني ، ساير هموگلوبين ها نيز از ستون خارج مي شوند.

2) روش تريس : روش پيشنهادي NCCLS مي باشد. از محلول ذخيره تريس سه بافر با PH 8/5 ، 8/3 ، 7 به كمك HCL غليظ تهيه مي گردد. جداسازي در اين روش بر اساس تغيير در PH بافر صورت مي گيرد. در اين روش PH بافر دوم (8/3) بسيار مهم مي باشد (در اين PH هموگلوبين A2 از ستون خارج مي شود)

اين روش بدليل استفاده از بافرهاي متعدد (3 بافر) در آزمايشگاهها كمتر مورد استفاده قرار مي گيرد. قابل ذكر است كه درصد هموگلوبين A2 با استفاده از بافر تريس مختصري پائين تر از روش استفاده از بافرگلايسين ميباشد.هم چنين در مقايسه با روش تريس ، بافر گلايسين حساسيت كمتري به تغييرات مختصر PH دارد.

با تهيه رزين با بافر گلايسين و PH مناسب جهت جداسازي هموگلوبين A2 مي توان نمونه هايي كه حاوي هموگلوبين S ميباشند را نيز جدا كرد. (طول رزين داخل ستون بايد افزايش يابد)
بدليل عدم ساخت رزين و بافر در آزمايشگاهها مراحل كنترل كيفي آن ذكر نميگردد.

اكثركيت هاي اندازه گيري هموگلوبين A2 موجود در ايران بر اساس كروماتوگرافي تعويض يوني با استفاده از بافر گلايسين مي باشد كه جدا سازی هموگلوبينA2 بافر دوم به كمک بافر اول يا همان محلول Developer صورت می گيرد.با تهيه لولـه تـوتال (آب مقطر به همراه هموليزات) بجای استفاده از بافر دوم درصد هموگلوبين A2 محاسبه مي گردد.

روش كار : با توجه به دستورالعمل درون كيت مي باشد لذا از ذكر آن خودداري مي گردد.
3) *دستور العمل داخل كيت بايد بدقت خوانده شود.

تهيه نمونه : خون به همراه ماده ضد انعقاد EDTA مناسب مي باشد. حداكثر زمان نگهداري خون در دماي چهار درجه (يخچال) 8 روز مي باشد . بهتر است هموليزات تازه و در روز آزمايش تهيه شود.

* نكات مهم در نقل و انتقال كيت هموگلوبين A2

1 -رعايت زنجيره سرد (در مورد كيت هايي كه بايد حتما" در يخچال نگهداري شوند)
2 -بررسي صاف بودن ستونهاي داخل كيت (سر و ته نبودن ستونها)

*** رعايت نكات زير در هنگام اندازه گيري هموگلوبين A2 توصيه مي گردد:**

1- در صورتي كه ژل داخل ستونها تغيير رنگ داده باشند نبايد مورد استفاده قرار گيرند
2- قبل از استفاده ازستونها و بافر بايد حتما" به دماي اتاق برسند. (در مورد كيت هايی كه در دمای يخچال نگه داری می شوند)
3- بهتر است ازپي پت پاستور تميزو يا سمپلربا نوك نو جهت مخلوط نمودن رزين داخل ستونها با بافر و حل شدن حبابهای هواي داخل رزين استفاده نمود.
4- ستونها بايدا زيك Flow rate مناسب برخوردار باشند $^{1ml}/_{4\min}$ ، $^{ml}/_{hour}$ 10-20
5- قبل از تهيه هموليزات بايد نمونه خون تام كاملا" مخلوط شود .
6- پس از تهيه هموليزات بهتر است سريعتر كروماتوگرافي انجام شود (پس از ليز كامل گلبول هاي قرمز)
7- قبل از نمونه گذاري به هيچ وجه نبايد رزين خشك شود. به محض اينكه محلول رويی رزين خارج شد بايد هموليزات به ستون اضافه شود.
8-از سمپلر كالبيره بايد جهت برداشت نمونه خون، بافرو هموليزات استفاده نمود.
9-بايد از لوله های مدرج استاندارد جهت جمع آوری هموگلوبين A2 از ستون و تهيه لوله توتال استفاده نمود.در صورت عدم دسترسی به لوله های فوق لوله های معمولی را به روش دستی (قلم الماس ،ماژيک) مدرج نمائيد.

10- افزودن همولیزات باید به آرامي و درست در سطح رزین صورت گیرد و سطح آن نباید در هنگام نمونه گذاري آسیب ببیند.
11- بهتر است از يك نوك سمپلر جهت ریختن همولیزات بداخل ستون و لوله توتال استفاده شود .
12- به محض جذب شدن همولیزات برروی رزین باید بلافاصله بافر اضافه شود.
13- اگر قبل از جذب کامل همولیزات برروی رزین، محلول بافر ریخته شود باعث کاهش کاذب هموگلوبین A2 مي گردد.
14- باید دقت شود تمامي بافر اضافه شده از ستون خارج شود.
15- قبل از خواندن جذب نوري ، باید لوله A2 و توتال کاملا" مخلوط شوند.
16- باید از يك اسپکتروفتومتر کالیبره جهت خواندن جذب نوري لوله ها استفاده شود.
17- باید از يك نمونه که هموگلوبین A2 آن مشخص شده است(یا در صورت دسترسی به کنترل تجاری) به عنوان نمونه کنترل در هر سری کاري استفاده گردد.
در صورتی که نمونه کنترل در محدوده مورد انتظار بخواند ، نیازی به انجام نمونه های بیماران بفرم دوتايي نمی باشد.

دامنه مرجع:
در کتب مرجع پیشنهاد میگردد که هر آزمایشگاه دامنه مرجع خود را با استفاده از حداقل 20 نمونه خون فرد سالم (هموگلوبین واندکس های گلبولی طبیعی) بدست اورد و تفسیر نتایج هموگلوبین A2 در مقابل این دامنه صورت گیرد.قابل ذکر است که دامنه مرجع ممکن است مختصری در روش های مختلف اندازه گیری هموگلوبین A2 ودر بین آزمایشگاهها متفاوت باشد. (دامنه مرجع ممکن است در روش HPLC 0.1-0.2% بالاتر باشد.)
بطور معمول دامنه مرجع هموگلوبین A2 برطبق توصیه NCCLS، 1/5-3/5% می باشد در حالی که کتاب خون شناسی Dacie 2-3/3% را پیشنهاد میکند. در ایران نیز بنظر می رسد که دامنه پیشنهادی فوق قابل قبول تر باشد.
در نهایت بدنبال تعین دامنه مرجع هم ،هنوز مشکلاتی در تفسیر نتایج لبه مرزی Border line وجود دارد.دراین موارد تکرار نتایج نیز ممکن است0.1-0.2% تفاوت نشان دهد.طبق پیشنهاد کتاب خون شناسیDacie بهتراست نتایج 3.4-3.7% هموگلوبین A2 بعنوان لبه مرزی در نظر گرفته شود و هموگلوبین A2 در همان نمونه ویک نمونه مجدد تازه تکرار شود.
* تفسیر نتایج هموگلوبین A2 باید در کنارشمارش گلبولهای قرمز، میزان هموگلوبین، اندکس های گلبولی وبررسی گسترش خون محیطی فرد صورت گیرد.در نهایت در موارد مشکوک و لبه مرزی باید بررسی فامیلی و آزمایش های تکمیلی نظیر جدا سازی زنجیره ها وبررسی DNA صورت گیرد.

دامنه مرجع%	تفسیر
>7	- وجود هموگلوبین A2 به تنهائی بسیار نادر است - موارد نادر موتاسیونهای β تالاسمی
3.8-7	- صفت β تالاسمی- هموگلوبین ناپایدار - صفت هموگلوبین S- آنمی داسی شکل- آنمی مگالوبلاستیک
3.4-3.7	- فقر اهن بسیار شدیدهمراه با صفت β تالاسمی - همراهی واریانت های زنجیره دلتا(ς) با صفت β تالاسمی - تاثیر متقابل تالاسمیα وβ - موتاسیونهای نادر β تالاسمی - حضور هموگلوبین S (در این مورد صحت اندازه گیری هموگلوبینA2 مشکل می شود) - تاثیر متقابل تالاسمیα و هموگلوبین S - خطاهای آنالیتیکال(آزمایش باید تکرار شود)
2-3.3	- فرد طبیعی - دلتا بتا (ς β)تالاسمی(اگر هموگلوبین F بالا باشد) - موارد نادر صفت β تالاسمی(شامل همراه شدنβ با دلتا تالاسمی و α وβ تالاسمی) صفتα تالاسمی
<2	- دلتا بتا (ς β)تالاسمی(اگر هموگلوبین F بالا باشد) - صفتα تالاسمی - بیماری هموگلوبین H - حضور واریانت های زنجیره دلتا

- این متد برای اندازه گیری هموگلوبین A2 اختصاصی نیست بطوری که بسیاری از هموگلوبین های همبار با هموگلوبین A2 نیز از ستون خارج می شوندکه شامل هموگلوبین C,E,O_{arab} و بعضی از واریانت های هموگلوبین A2 (A'2)و زنجیره دلتا میباشند. لذا هموگلوبین A2 از این هموگلوبین ها قابل تفکیک نیست.
- در مواردی که هموگلوبین A2 بیشتر از 7% می باشد باید به وجود هموگلوبین های C,E,O_{arab} شک نمودکه همراه با هموگلوبین A2 از ستون خارج می شوند.در این مورد نیاز به بررسی تکمیلی نظیر الکتروفورز هموگلوبین درPH=8.4 و PH=6-6.2 و بررسی فامیلی می باشد.
- اگرتمامی همولیزات اضافه شده یکباره از ستون پایین آید ،باید به وجود سایر هموگلوبینوپاتی ها نظیرهموگلوبین S یا D و G و یا هموگلوبین E,C شک نمود.

- اندازه گیری هموگلوبین A2 به روش کروماتوگرافی ستونی نباید در بیمارانی که اخیرا خون دریافت کرده اند صورت گیرد.

در صورت وجود هموگلوبینA2 بیش از 7% در کروماتوگرافی ستونی مراحل زیر می بایست انجام گیرد:

1- انجام الکتروفورز استات سلولزدرPH=8.4 ← تایید وجود باند پر رنگ در ناحیه هموگلوبین A2

2- انجام الکتروفورزسیترات اگار درPH=6-6.2

الف)در صورت مشاهده باند در منطقه هموگلوبینC ← بیمار هموگلوبین C دارد که مقدار بدست آمده برای هموگلوبینA2 مجموع هموگلوبین A2 و C است.

ب)در صورتیکه باندی در منطقه هموگلوبین C دیده نشود ← بیماراحتمالا هموگلوبین E یاO دارد که جهت تاییدوجود هموگلوبینE ، آزمایش رسوب با ایزوپروپانول انجام می گردد.

ج) در صورت مشاهده باندی در منطقه هموگلوبین S ← نمونه ممکن است حاوی هموگلوبینSیا C– Harlem باشد، که جهت تایید وجود هموگلوبین S تست حلالیت انجام می گردد.

د) اگر باندی در منطقه بین محل نمونه گذاری وباند هموگلوبین S دیده شود ← نمونه حاوی هموگلوبین O_{arab} خواهد بود.

Anode(+)

C ……..

S ..... C-Harlem

……. O_{arab}

Origin.....

A ..... D,E,G,Lepore,H,I,N,J

F .....Barts

Cathode(-)

تصویر شماتیک جدا سازی هموگلوبین ها در الکتروفورز سیترات آگار

اندازه گیری هموگلوبین A2به روشHPLC

در این روش از ستون های تعویض کننده کاتیونی استفاده می گردد و دارای دقت و صحت قابل قبول می باشد.پس از جدب همولیزات در ستون ،با تغیر قدرت یونی بافروواریانت های هموگلوبین قابل جدا سازی می باشند.هموگلوبین ها براساس شارژ الکتریکی خود در زمان مشخصی Retention Time ازستون خارج می گردنند،که مبنای جدا سازی این متد می باشد.
مزایا:
- حجم کم نمونه(در حدود 5میکرو لیتر)
- زمان کوتاه اندازه گیری
- تعیین در صد هموگلوبین A2,Fوبسیاری از واریانت های هموگلوبین در هر سری کاری(هموگلوبین های S,Cقابل جداسازی اند)

معایب :
-هموگلوبین E, Leporeبطور همزمان با هموگلوبین A2از ستون خارج می شوند.در این موارد باید از روش های تکمیلی تائید کننده استفاده گردد.
- هموگلوبین Dایران با هموگلوبین A2همزمان از ستون خارج می گردنند
-هزینه بالا

الکتروفورزاستات سلولز همراه با الوشن

بدنبال الکتروفورز استات سلولز وجداسازی باند ها،منطقه هر باند بریده شده و عمل الوشن در مجاورت آبمقطر صورت خواهد گرفت . با خواندن جذب نمونه در مقابل لوله شاهد در طول موج 415 نانومتر درصد هموگلوبین تعیین می گردد.
قابل ذکر است که این روش جهت تعیین درصد هموگلوبین A2 درحضور سایر هموگلوبین های همبار با هموگلوبین A2از صحت مناسب برخوردار نمی باشد.

هموگلوبینF

سه روش رایج اندازه گیری کمی هموگلوبینFعبارتند :
1-روشهای مقاومت نسبت به قلیا
2-کروماتوگرافی : ستونی - HPLC
3-روشهای ایمونولوژیک

¤ روش مقاومت قلیا بدلیل داشتن عدم دقت وصحت مناسب در دامنه 2-40درصدبطور گسترده در آزمایشگاهها مورد استفاده قرار میگیرد.
روش پیشنهادی NCCLS روش Betke می باشدکه قابل قبول ترین روش ، برپایه مقاومت قلیایی می باشد.در این روش پس از تبدیل هموگلوبین به سیان مت هموگلوبین (به کمک محلول درابکین) با اضافه نمودن یک قلیا قوی، و بدنبال آن توقف فرایند دناتوره شدن با اضافه نمودن محلول سولفات آمونیم ، هموگلوبین F اندازه گیری می گردد.
قابل ذکر است که روش Singer بدلیل نیاز به نمونه کمتر ومراحل ساده تر می تواند جایگزین مناسبی باشد ، ولی باید توجه نمود که جهت مقادیرهموگلوبین F کمتر از 5 درصد از صحت لازم برخوردار نیست .(هم چنین عدم دقت آن نیز کمتر است)
از مزایای تبدیل هموگلوبین به سیان مت هموگلوبین در روش بتکه، عدم افزایش کاذب هموگلوبین F در افراد سیگاری است.(بدلیل افزایش میزان کربوکسی مونوکسی هموگلوبین مقاوم به قلیا در این افراد)
روش Jonxis &Visser برای مقادیر هموگلوبین F بالای 50 درصد و خون بند ناف مناسب می باشد.در این روش افزایش مقاومت هموگلوبین F به دناتوره شدن توسط قلیا، با مشاهده تغییرات جذب نوری در طول موج 576 نانومتر که با افزودن هیدروکسید امونیوم حاصل می گردد ، قابل سنجش است.
نکته: بدلیل آنکه محدوده طبیعی هموگلوبین F وابسته به نوع روش اندازه گیری می باشد، لذا هر آزمایشگاه می بایست بر اساس روش مورد استفاده ، دامنه طبیعی را با استفاده از نمونه 20-30 فرد نرمال تعیین نماید (بخصوص در صورت استفاده از روش Singer)

¤ روش کروماتوگرافی ستونی در مورد مقادیر هموگلوبین F بیشتر از 40 درصد کاربرد دارد.

¤ روش های ایمونولوژیک (رادیو ایمونواسی یا رادیال ایمونو دیفیوژن) در مورد مقادیر هموگلوبین F کمتر از 2درصد کاربرد دارد.

روش اندازه گیری هموگلوبین F در تمامی کتب مرجع موجود است لذا از ذکر مراحل آن خوداری می گردد.

<u>منابع خطا (روش بتکه) :</u>
1- پیپت کردن نادرست
2-رعایت نکردن دقیق زمان (زمان دو دقیقه برای عمل دناتوره شدن بسیار مهم است) بهتر است از کرونومتر استفاده گردد.
3-مخلوط کردن نا کافی
4-طول موج نامناسب فتومتر، فتومتر غیر کالیبره

5- کدورت همولیزات تهیه شده
6-غلظت نامناسب سود وسولفات آمونیم. در صورت استفاده از غلظت نامناسب سود تا 25 درصد از هموگلوبین F در مرحله دناتوره شدن ویا رسوب از بین می رود.
7- استفاده از معرف های کهنه
- سود:حداکثر پایداری سود تا 30 روز است ، ولی نباید در صورت وجود هر گونه کدورت یا رسوب نیز استفاده گردد.
- سولفات آمونیم :محلول سولفات آمونیم حداقل برای سه ماه پایدار است ، در دمای 20-25 درجه قابل نگه داری است. کریستال های حل نشده در ته ظرف باید درطول مدت نگه داري قابل مشاهده باشد.
8- استفاده از کاغذ صافی نامناسب
باید از کاغذ صافی واتمن شماره 1 ویا 42 استفاده گردد.

<u>کنترل کیفی</u>
- تفاوت بین خوانده های دو تایی در هموگلوبین F کمتر از 5 درصد نباید از 0/5درصد تجاوز کند.

- تفاوت بین خوانده های دو تایی در هموگلوبینF بین 5-15 درصد نباید از 1 درصد تجاوز کند.

- تفاوت بین خوانده های دو تایی در هموگلوبین F بالاتر از 15درصد نباید بیش از 2درصد باشد.

<u>نکته :</u>
* در صورتی که در الکتروفورز هموگلوبین باندی در منطقه F دیده شود، اما در روش شیمیایی میزان هموگلوبین F طبیعی باشدباید به وجود مت هموگلوبین Aشک نمود.
*در مواردی که در الکتروفورز هموگلوبین باندی در منطقه F دیده می شود (درصد آن بالاتر از حد طبیعی باشد)حتما باید به روش شیمیایی درصد آن تایید گردد.

منابع:

1-Dacie and Lewis Practical Hematology 2006

2-Chromatographic (micro column) determination of Hemoglobin A2 NCCLS 2004
3-Henry’s Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods 2007
4-Quantitive Measurement of Fetal Hemoglobin Using the Alkali Denaturation Method Approved Guideline NCCLS 2000