# اصول انجام وتضمین کیفیت آزمایشهای هماتولوژی

## 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
روشهای اندازه گیری هموگلوبین A2 و بررسی خطاها.....۲۱
اصول آزمایش الکتروفورز هموگلوبین.....۲۷
روشهای اندازه گیری هموگلوبین F و بررسی خطاها.....۳۰
روش مرجع آزمایش اندازه گیری PCV به روش میکرو هماتوکریت ، منابع خطا.....۳۲
روش مرجع اندازه گیری هموگلوبین در خون با روش سیان مت هموگلوبین و منابع خطا.....۳۵
آزمایش شمارش رتیکولوسیت.....۳۷
اصول ایمنی در آزمایشگاه .....۴۱

**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 (۲-۶°C)

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 EDTA K3 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. برقـراری چنین برنامه هایی در آزمایشگاههایی که مسئول انجام آزمایشهای غربالگری تالاسمی می باشند نیز می بایست به عنوان یک اصل مهـم 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 .**

## مشخصات  شناسنامه دستگاههای شمارشگر سلولی خودکار

**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.

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

**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:

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

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

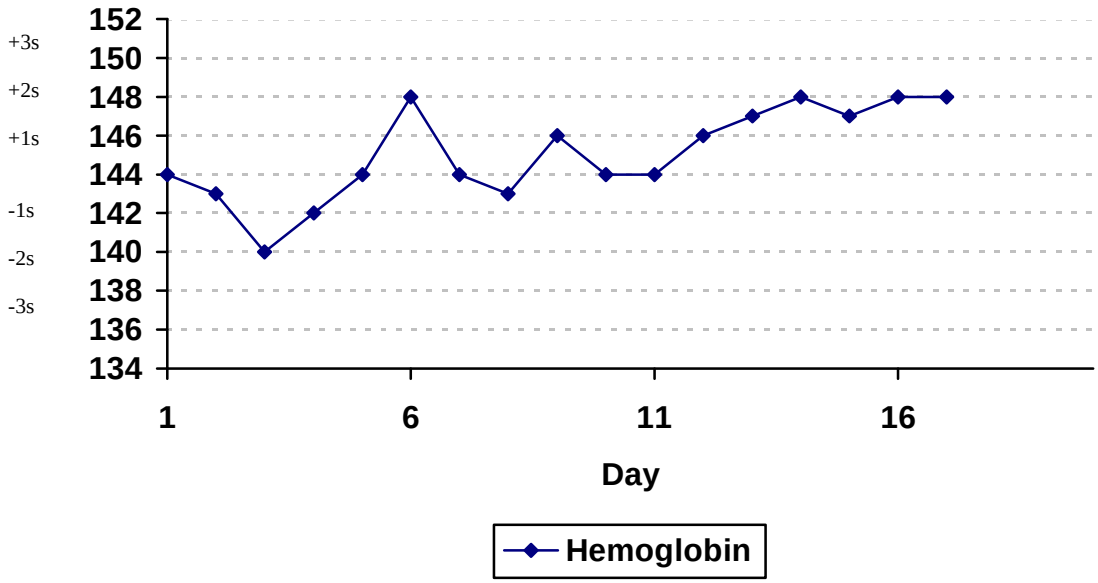
در بعضی از انواع سل کانترها مثل گروه سیسمکس ضریب کالیبراسیون جدید با استفاده از فرمول کالیبراسیون مندرج در کاتالوگ به ترتیب زیر محاسبه می شود:

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

**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 SD ۱+_ ، ۲SD +_ و SD ۳+_ برای هر پارامتر مقادیر آنها بر روی محور عمودی و روزها بر روی محور افقی ثبت می گردد.

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

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

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

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 متـوالی مطـابق جدول زیر باشد ، عملکرد دستگاه با کمک فرمول T-Brittin به صورت زیر بررسی می گردد:

| 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 |

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

$$Sd=\sqrt{\frac{91 - 9/5}{4}} = 4.72$$

$$tn = \frac{0.6}{4.72} \times \sqrt{5} = 0.28$$

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 |
| $\Sigma x=76.3$<br>$\bar{x}=7.63$ | | $(x-\bar{x})^2 = 0.201$ |

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

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

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

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

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 که نمونه ها در ابتدا یا انتهای سری کاری ویا صبح وبعداز ظهر آزمایش می شوند و اختلاف نتایج آنها که طبق فرمول آزمایشهای دوتایی محاسبه می شود می بایست در محدوده SD ۲+_ قرار گیرد .اگر نمونه ها درست نگهداری شده باشند هرگونه تغییری در نتایج خارج از این محدوده نشاندهنده اشکال درعملکرد دستگاه ویامعرفها می باشد.آین آزمایش برای بررسی هموگلوبین مناسب بوده و به میزان کمتر برای شمارش گلبولهای قرمز و سفید کاربرد دارد و لی 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.**

**۵**-در مراکز آزمایشگاهی با پذیرش بیمار زیاد (حداقل روزی ۱۰۰ بیمار )، استفاده از مقادیر میانگین شاخصهای گلبولی **(MCHC, MCH, MCV )** بدلیل ثابت بودن در فواصل روزها و هفته ها ، بعنوان روشی جهت ارزیابی کیفی عملکرد دستگاه توصیه می گردد به شرطی که نمونه های مورد آزمایش در روزهای مختلف تفاوت مشخصی با یکدیگر نداشته باشند بطور مثال آزمایش برروی بیماران تالاسمی ویا سایر مواردیکه روی اندکسهای گلبولی اثر داشته باشد .تفاوت مقادیر میانگین 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 که باعث تغییرشمارش سلولها می گردند ، بعنوان روشی جهت کنترل کیفی بکار می رود . باتوجه به تغییرات روزانه طبیعی مقادیر 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 آزمایشها انجام می گیرند ولی تکرار 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 کنترل کیفیت خارجی استفاده نمود . هدف برنامه کنترل کیفیت خارجی ایجاد هماهنگی بین نتایج آزمایشگاهها و یافتن خطاهای سیستمیک می باشد .مسئول اجرای این برنامه در ایران آزمایشگاههای رفرانس می باشدکه بصورت دوره ای نمونه های مجهول را به 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 هموگلوبین (برای بررسی صحت اندازه گیری هموگلوبین توسط فوتومترها واسپکتروفتومترها ) ، گسترش خون محیطی جهت شمارش افتراقی گلبولهای سفید و گسترش خونی با رنگ آمیزی نیو متیلن بلو به منظور شمارش رتیکولوسیت می باشند . آزمایشگاهها پس از دریافت نمونه ها و آزمایش 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/ $۲۰\times۱۰^{۹}$ مقدار هموگلوبین را به میزان g/dl ۳ افزایش می دهد.، تعداد پلاکت بیش از L/ $۷۰۰\times۱۰^{۹}$ ، مقدار زیاد هموگلوبین S ، میکروسیتوز و هایپوکرومیا نیز بطور کاذب میزان Hb را بالا می برند.

# روشهای اندازه گیری هموگلوبین $A_2$

اصول- خطاها- دامنه مرجع – تفسیر نتایج

ترجمه و گرداوری : دکتر کتایون خداوردیان

ویرایش دوم

آزمایشگاه مرجع سلامت

یکی از تست های تشخیصی مهم جهت تأئید وجود بتا تالاسمی مینور تعیین درصد هموگلوبین A2 می باشد .هموگلوبین A2را می توان به روش های زیر اندازه گیری نمود:

- کروموتوگرافی تعویض یونی

۱-ستون میکرو

۲- HPLC(کروماتوگرافی تعویض یونی کاتیونیک)

- الکتروفورزاستات سلولز

**اندازه گیری هموگلوبین A2 با استفاده از ستون میکرو**

کروماتوگرافی تعویض یونی از انواع کروماتوگرافی های مایع – جامد بوده که بر اساس واکنش متقابل گروههای باردار مولکول هموگلوبین و رزین ، جداسازی صورت می گیرد. بر روی رزین یونهایی وجود دارد که قابل تعویض با یونهای همبار خود در همولیزات می باشند. در این روش از رزین آنیونیک دی اتیل امینواتیل سلولز DEAE52 استفاده می گردد.

اساس روش :

تورم رزین با بافر و به تعادل رسیدن آن با بافر تا PH رزین به PH بافر برسد

اضافه نمودن همولیزات به ستون

جداسازی انتخابی اجرای نمونه بوسیله تغییر PH یا قدرت یونیک بافر

در اندازه گیری هموگلوبین A2 به روش کروماتوگرافی ستونی با استفاده ازستون میکرو میتوان از بافر گلایسین یا بافر تریس استفاده نمود.

**روش گلایسین** : بافر اول ترکیبی از گلایسین و سیانور پتاسیم (KCN) می باشد و بافر دوم همان ترکیب بافر اول به همراه کلرور سدیم می باشد که با اضافه نمودن نمک به بافر دوم قدرت یونی آن افزایش یافته و سایر هموگلوبین ها را از ستون خارج می سازد. PH رزین باید توسط HCL یک مولار و به کمک PH متر طوری تنظیم شود که پائین تر از نقطه ایزوالکتریک هموگلوبین A2 بوده و بالاتر از نقطه ایزوالکتریک سایر هموگلوبین ها باشد ، لذا بلافاصله پس از جذب همولیزات به روی رزین و اضافه نمودن بافر اول ، هموگلوبین A2 بصورت یک حلقه از ستون خارج می شود ، سپس با اضافه کردن بافر دوم ، با افزایش قدرت یونی ، سایر هموگلوبین ها نیز از ستون خارج می شوند.

**روش تریس** : روش پیشنهادی NCCLS می باشد. از محلول ذخیره تریس سه بافر با PH ۸/۵ ، ۸/۳ ، ۷ به کمک HCL غلیظ تهیه می گردد. جداسازی در این روش بر اساس تغییر در PH بافر صورت می گیرد. در این روش PH بافر دوم ( ۸/۳ ) بسیار مهم می باشد ( در این PH هموگلوبین A2 از ستون خارج می شود )

این روش بدلیل استفاده از بافرهای متعدد ( ۳ بافر ) در آزمایشگاهها کمتر مورد استفاده قرار می گیرد. قابل ذکر است که درصد هموگلوبین A2 با استفاده از بافر تریس مختصری پائین تر از روش استفاده از بافرگلایسین میباشد.هم چنین در مقایسه با روش تریس ، بافر گلایسین حساسیت کمتری به تغییرات مختصر PH دارد.

با تهیه رزین با بافر گلایسین و PH مناسب جهت جداسازی هموگلوبین A2 می توان نمونه هایی که حاوی هموگلوبین S میباشند را نیز جدا کرد. ( طول رزین داخل ستون باید افزایش یابد )
بدلیل عدم ساخت رزین و بافر در آزمایشگاهها مراحل کنترل کیفی آن ذکر نمیگردد.

اکثرکیت های اندازه گیری هموگلوبین A2 موجود در ایران بر اساس کروماتوگرافی تعویض یونی با استفاده از بافر گلایسین می باشد که جدا سازی هموگلوبینA2 بافر دوم به کمک بافر اول یا همان محلول Developer صورت می گیرد.با تهیه لولـه تـوتال ( آب مقطر به همراه همولیزات ) بجای استفاده از بافر دوم درصد هموگلوبین A2 محاسبه می گردد.

روش کار : با توجه به دستورالعمل درون کیت می باشد لذا از ذکر آن خودداری می گردد.
*دستور العمل داخل کیت باید بدقت خوانده شود.

## اصول آزمایش اندازه گیری هموگلوبین A2 به روش کروماتوگرافی تعویض یونی

**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.**

## 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 جذب همولیزات در ستون ،با تغییر قدرت یونی بافرواریانت های هموگلوبین قابل جدا سازی می باشند.هموگلوبین ها براساس شارژ الکتریکی خود در زمان مشخصی Retention Time ازستون خارج می گردند،که مبنای جدا سازی این متد می باشد.

مزایا:

- حجم کم نمونه( در حدود ۵میکرو لیتر)
- زمان کوتاه اندازه گیری
- تعیین در صد هموگلوبین A2,F و بسیاری از واریانت های هموگلوبین در هر سری کاری( هموگلوبین های S,C قابل جداسازی اند)

معایب :

-هموگلوبین E, Lepore بطور همزمان با هموگلوبین A2از ستون خارج می شوند.در این موارد باید از روش های تکمیلی تائید کننده استفاده گردد.

- هموگلوبین D ایران با هموگلوبین A2همزمان از ستون خارج می گردنند.

-هزینه بالا

نکته:

_ روش کروماتوگرافی ستونی برای اندازه گیری HbA2 اختصاصی نبوده بطوریکه بعضی از هموگلوبینهای هم بار با HbA2 مانند O arab, 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 و آزمایش الکتروفورز هموگلوبین انجام گیرد.

_ 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.

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

## دامنه مرجع هموگلوبین A2 :

در کتب مرجع پیشنهاد میگردد که هر آزمایشگاه دامنه مرجع خود را با استفاده از حداقل ۲۰ نمونه خون فرد سالم (هموگلوبین واندکس های گلبولی طبیعی ) بدست اورد و تفسیر نتایج هموگلوبین A2در 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، ۳/۵-۱/۵٪ می باشد در حالی که کتاب خون شناسی Dacie ۳/۳-۲٪ 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 |
| --- | --- |
| >۷ | - وجود هموگلوبین A2 به تنهائی بسیار نادر است<br>- موارد نادر موتاسیونهای β تالاسمی |
| ۳/۸-۷ | - صفت β تالاسمی- هموگلوبین ناپایدار<br>- صفت هموگلوبین S- آنمی داسی شکل- آنمی مگالوبلاستیک |
| ۳/۴-۳/۷ | - فقر اهن بسیار شدیدهمراه با صفت β تالاسمی<br>- همراهی واریانت های زنجیره دلتا( ς ) با صفت β تالاسمی<br>- تاثیر متقابل تالاسمیα وβ<br>- موتاسیونهای نادر β تالاسمی<br>- حضور هموگلوبین S (در این مورد صحت اندازه گیری هموگلوبین A2مشکل می شود )<br>- تاثیر متقابل تالاسمیα و هموگلوبین S<br>- خطاهای آنالیتیکال(آزمایش باید تکرار شود) |
| ۲-۳/۳ | - فرد طبیعی<br>- دلتا بتا (ς β )تالاسمی(اگر هموگلوبین F بالا باشد)<br>- موارد نادر صفت β تالاسمی(شامل همراه شدنβ با دلتا تالاسمی و α وβ تالاسمی)<br>صفتα تالاسمی |
| <۲ | - دلتا بتا (ς β )تالاسمی(اگر هموگلوبین F بالا باشد)<br>- صفتα تالاسمی<br>- بیماری هموگلوبین H<br>- حضور واریانت های زنجیره دلتا |

## 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 مانندHeparin 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 همراه 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 S , Cهستند 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 آرتیفکت 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 سیانیدپتاسیوم (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 بیماران 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 .

# هموگلوبین F

سه روش رایج اندازه گیری کمی هموگلوبین F عبارتند :
۱-روشهای مقاومت نسبت به قلیا
۲-کروماتوگرافی : ستونی - HPLC
۳-روشهای ایمونولوژیک

¤ روش مقاومت قلیا بدلیل داشتن عدم دقت وصحت مناسب در دامنه ۲-۴۰ درصدبطور 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 ۵ 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 ۵۰ 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 ۵۷۶ 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 ۲۰-۳۰ فرد نرمال تعیین نماید (بخصوص در صورت استفاده از روش Singer)

¤ روش کروماتوگرافی ستونی در مورد مقادیر هموگلوبین F بیشتر از ۴۰ درصد کاربرد دارد.

¤ روش های ایمونولوژیک (رادیو ایمونواسی یا رادیال ایمونو دیفیوژن ) در مورد مقادیر هموگلوبین F کمتر از ۲درصد کاربرد دارد.
روش اندازه گیری هموگلوبین F در تمامی کتب مرجع موجود است لذا از ذکر مراحل آن خودداری می گردد.

منابع خطا (روش بتکه) :

۱- پیپت کردن نادرست

۲-رعایت نکردن دقیق زمان (زمان دو دقیقه برای عمل دناتوره شدن بسیار مهم است) بهتر است از کرونومتر استفاده گردد.

۳-مخلوط کردن نا کافی

۴-طول موج نامناسب فتومتر، فتومتر غیر کالیبره

۵- کدورت همولیزات تهیه شده

۶-غلظت نامناسب سود وسولفات آمونیم. در صورت استفاده از غلظت نامناسب سود تا ۲۵ درصد از هموگلوبین F در مرحله دناتوره شدن ویا رسوب از بین می رود.

۷- استفاده از معرف های کهنه

- سود:حداکثر پایداری سود تا ۳۰ 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 ۲۰-۲۵ درجه قابل نگه داری است. کریستال های حل نشده در ته ظرف باید درطول مدت نگه داری قابل مشاهده باشد.

۸- استفاده از کاغذ صافی نامناسب

باید از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ ویا ۴۲ استفاده گردد.

کنترل کیفی

- تفاوت بین خوانده های دو تایی در هموگلوبین F کمتر از ۵ درصد نباید از ۰/۵درصد تجاوز کند.
- تفاوت بین خوانده های دو تایی در هموگلوبینF بین ۵-۱۵ درصد نباید از ۱ درصد تجاوز کند.
- تفاوت بین خوانده های دو تایی در هموگلوبین F بالاتر از ۱۵درصد نباید بیش از ۲درصد باشد.

نکته :

* 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 A شک 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

## 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

– خطای بدام افتادن پلاسما (Plasma trapping) مقدار پلاسمای بدام افتاده در آنمی ماکروسیتیک کم و در اسفروسیتوز، تالاسمی و آنمی سیکل سل زیاد است. در حالت طبیعی میزان پلاسمای بدام افتاده ۳٪–۱ است که هنگام کالیبراسیون سل کانتر این مقدار ۲٪ در نظر گرفته می شود.

**علل کاهش کاذب میزان هماتوکریت :** EDTA اضافی
همولیز
هیپرناترمی

**علل افزایش کاذب میزان هماتوکریت :** هیپوناترمی
بدام افتادن پلاسما

## 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.

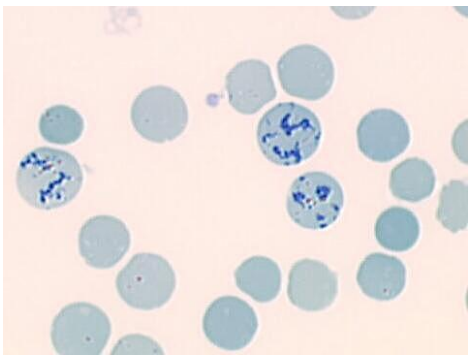
## منابع خطا

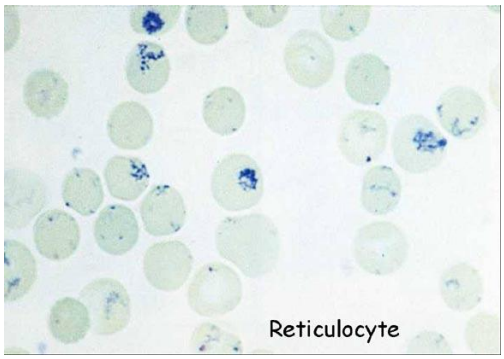
– تکنیک نا مناسب خونگیری وریدی که باعث تغلیظ خون و در نتیجه افزایش کاذب مقدار هموگلوبین و شمارش سلولی می –گردد.
– استفاده از تجهیزاتی بدون سوابق کنترل کیفی و کالیبراسیون
– عدم آگاهی کافی کارکنان از نحوه صحیح انجام آزمایش

# آزمایش شمارش رتیکولوسیت

**رتیکولوسیت ها گلبولهای قرمز نابالغ حاوی باقیمانده های اسید ریبونوکلئیک ریبوزومی هستند که به تازگی از مغز استخوان آزاد شده اند . ویژگی ریبوزوم ها ، ایجاد واکنش با رنگهای قلیائی خاص مثل آزور B ، بریلیانت کرزیل بلو یا نیو متیلن بلو (NMB) و تشکیل رسوبی بصورت گرانول یا فیلامانت آبی یا بنفش می باشد . این واکنش فقط با رنگهای حیاتی و در نمونه های فیکس نشده صورت می گیرد. به علت زنده بودن سلول ها هنگام رنگ آمیزی، به این نوع رنگ آمیزی، رنگ آمیزی حیاتی اطلاق می گردد. مراحل مختلف بلوغ رتیکولوسیت ها با توجه به مشخصات مرفولوژیکی، قابل شناسایی می باشند. نابالغ ترین رتیکولوسیت ها حاوی بیشترین مقدار مواد رسوبی ، و بالغ ترین آنها فقط دارای چند جز یا رشته کوتاه از این مواد می باشند. بر این اساس ، رتیکولوسیت ها به چهار گروه تقسیم می شوندکه گروه۱ دارای کلامپ رتیکولوم و گروه ۴ حاوی چند گرانول کوچک می باشند. گروه ۲ و۳ نیز از لحاظ مرفولوژی بین این دو گروه قرار می گیرند. چون اکثر رتیکولوسیت هایی که در خون محیطی دیده می شوند از گروه۴ هستند، شناسایی دقیق رتیکولوسیتها اثر قابل توجهی بر روی صحت شمارش این سلولها دارد . بنابراین *گلبولی می بایست به عنوان رتیکولوسیت شمارش گردد که دارای هسته نبوده و داخل آن دو یا چند قطعه از رسوب آبی رنگ ، که همان RNA ریبوزومی است، دیده شود.***

**رتیکولوسیتها در رنگ آمیزی معمولی( با رنگ های گروه رومانوفسکی)، بدلیل ترکیب بازوفیلی سیتوپلاسم و اسیدوفیل هموگلوبین حالت بازوفیل منتشری پیدا کرده و به بصورت "پلی کروماتیک" مشاهده می گردند . این پدیده بطور معمول در رتیکولوسیتهای نابالغ که دارای بیشترین میزان RNA هستند،دیده می شود .**





# رنگ آمیزی

## ۱- تهیه محلول رنگ

رنگ توصیه شده در مراجع معتبر بین المللی نیو متیلن بلو می باشد برای تهیه محلول رنگ، می بایست ۰/۱ گرم رنگ نیومتیلن بلو ( NMB) یا آزور B خالص را در ۱۰۰ میلی لیتر بافر فسفات ایزو اسموتیک با PH = ۶/ ۵ حل نمود.

برای ساخت بافر ذکر شده از محلولهای زیر استفاده می شود :

A: $NaH_2PO_4$ , $2H_2O$ 23.4g/L (150mmol/L)
B: $Na_2HPO_4$ 21.3 g/L (150mmol/L)

در صورتیکه ۵۱ میلی لیتر از محلول A با ۳۵ میلی لیتر از محلول B مخلوط گردد ، PH بافر حاصل ، ۶/۵ خواهد بود .

رنگ را میتوان در۱۰۰ میلی لیتر سیترات سالین نیز حل کرد که برای تهیه سیترات سالین ، یک حجم سیترات سدیم ۳۰ گرم در لیتر با ۴ حجم کلرید سدیم ۹ گرم در لیتر مخلوط می شود.

محلول رنگ را می بایست درون شیشه ای قهوه ای رنگ ریخته و در مدت ۲۴ ساعت به دفعات تکان داد .این محلول در دمای

۶-۲ درجه سانتیگراد قابل نگهداری می باشد . در این دما ، نیمه عمر رنگ حدود یک ماه است . هر بار قبل از استفاده، باید حجم مورد نیاز از رنگ را به منظور خارج نمودن هر گونه ذره اضافی یا رسوب ، با کاغذ صافی فیلتر نمود.

## ۲- روش رنگ آمیزی

برای رنگ آمیزی باید دو یا سه قطره رنگ NMB را با پیپت پاستور داخل لوله شیشه ای یا پلاستیکی به ابعاد ۱۰×۷۵ میلی متر ریخته و به همین حجم ، خون حاوی ضد انعقاد EDTA به آن اضافه کرده و پس از مخلوط کردن به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه نگهداری نمود . قبل از تهیه گسترش می بایست لوله را به آرامی تکان داد تا گلبولهای قرمز مجددا به حالت سوسپانسیون درآیند. گسترش ها پس از تهیه و خشک شدن، بدون فیکساسیون و انجام رنگ آمیزی دیگری،توسط میکروسکوپ قابل بررسی می باشند .

حجم دقیق خونی که به محلول رنگ اضافه می شود بستگی به تعداد گلبولهای قرمز دارد . در موارد آنمی، مقدار خون بیشتر و در پلی سیتمی، مقدار خون کمتری ، نسبت به حالت طبیعی ، می بایست با رنگ مخلوط شود .

***در یک گسترش مناسب ، ریبوزوم رتیکولوسیت ها به رنگ آبی در آمده و سلولهای بالغ در سطح لام به شکل سایه های کمرنگ آبی مایل به سبز دیده می شوند .***

**رنگ آمیزی و شمارش رتیکولوسیت خون در شرایطی که نمونه بعد از نمونه گیری در دمای ۶-۲ درجه نگهداری شود تا ۲۴ ساعت امکانپذیر می باشد . با گذشت ۸-۶ ساعت از زمان نمونه گیری و ماندن خون در حرارت آزمایشگاه ، رتیکولوسیت ها به تدریج بالغ شده و به گلبول قرمز بالغ تغییر می یابند که این امر بطور کاذب موجب کاهش درصد رتیکولوسیت ها می گردد. *بنابراین توصیه می شود شمارش رتیکولوسیت بلافاصله بعد از جمع آوری نمونه انجام شود.***

## نحوه شمارش و گزارش درصد رتیکولوسیت

**برای شمارش و تعیین درصد رتیکولوسیت ، گسترش نباید خیلی نازک تهیه شده باشد و محلی از گسترش جهت شمارش انتخاب شود که سلولها به خوبی رنگ شده و روی هم نیز قرار نگرفته باشند . برای تعیین درصد رتیکولوسیت ها از عدسی شیئ روغنی و در صورت امکان از عدسی های چشمی دارای دیافراگم قابل تنظیم استفاده میشود. تعداد گلبولهای قرمزی که باید مورد ارزیابی قرارگیرند رابطه معکوس با تعداد رتیکولوسیت ها دارد. بنابراین به منظور افزایش دقت در شمارش ، هرچه تعداد رتیکولوسیت ها کمتر باشد می بایست تعداد گلبولهای قرمز بیشتری مورد بررسی قرارگیرند و بالعکس.**

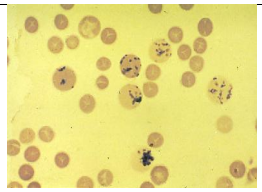
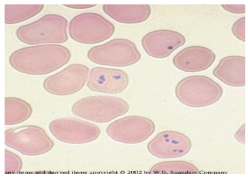
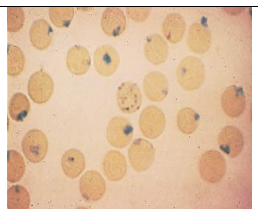
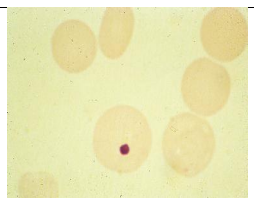
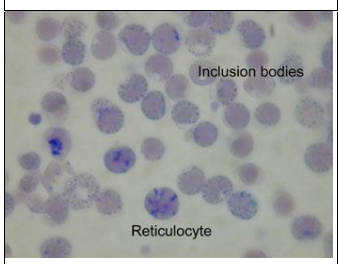
## مقادیر مرجع

**در بزرگسالان سالم شمارش رتیکولوسیت ۱/۵-۰/۵ درصد و در نوزادان ۶-۲ درصد می باشد که تا انتهای هفته دوم زندگی ، به میزان بزرگسالان تنزل می یابد.**

## افتراق رتیکولوسیت ها از دیگر انکلوزیونهای گلبولهای قرمز

**انکلوزیونهای دیگری مثل هاینز بادی, Hb H ، هاول ژولی بادی و اجسام پاپن هایمر در تشخیص افتراقی با رتیکولوم رتیکولوسیت ها قرار می گیرند که در جدول زیر مشخصات هریک آمده است. در بین این انکلوزیونها ، مشکل عمده اجسام هاینز هستند که هر چند در رنگ آمیزی NMB به رنگ آبی روشن تری مشاهده شده و عمدتا در حاشیه و نزدیک به غشا سلول قرار میگیرند ولی تفکیک آنها از دانه های ریبوزومی بسیار مشکل است . برای برطرف کردن این مشکل می توان اسمیر رنگ شده رتیکولوسیت را با متانول فیکس کرد که این امر موجب بی رنگ شدن اجسام هاینز شده ولی تاثیری بر روی رتیکولوسیت ندارد.**

جدول : مشخصات ظاهری انکلوزیون های مختلف گلبول قرمز در رنگ آمیزی روش NMB

| نام | ماهیت | مشخصات | تصویر |
|---|---|---|---|
| رتیکولوم<br>رتیکولوسیت | RNA ریبوزومی | رشته های رتیکولوم یا گرانول های کوچک پراکنده |  |
| پاپن هایمر | انکلوزیون حاوی آهن | یک یا بیشتر گرانول آبی رنگ با تمایل به حاشیه سلول که از رتیکولوم ، تیره تر رنگ می گیرند. |  |
| هاینز بادی | هموگلوبین دناچوره | بزرگتر از پاپن هایمر با شکل نامنظم ، آبی کمرنگ ، معمولا چسبیده به غشا سلول ، که گاهی باعث برآمدگی غشا به بیرون می گردد. |  |
| هاول ژولی بادی | DNA | بزرگتر از پاپن هایمربا شکل منظم، آبی کمرنگ که با فاصله از غشا سلول قرار می گیرند. |  |
| Hb H | تترامر زنجیره ß هموگلوبین | multiple ) بصورت متعدد ( و گرد ،به رنگ آبی-سبزکه به سلول ظاهر توپ گلف می- دهد، معمولا با انکوباسیون کوتاه مدت مشخص نمی گردد و برای شکل گیری نیازمند زمان است. |  |

**References:**
**1-H44-A methods for Reticulocyte counting(Flow Cytometry and Supravital Dye); Approved Guideline, NCCLS VOL.17 NO.18**
**2-Dacie and Lewis PRACTICAL HAEMATOLOGY, TENTH EDITION**

## اندازه‌گیری زمان پروترومبین[16] (PT) :

اندازه‌گیری PT که یک تست غیر اختصاصی برای تعیین عملکرد مکانیسم مسیر خارجی انعقاد است. در ابتدا بعنوان آزمایشی به منظور اندازه‌گیری میزان فعالیت فاکتور II یا پروترومبین، معرفی گردید و وجه تسمیهٔ آن نیز به همین علت است. اما در حال حاضر علاوه بر مورد فوق‌الذکر، برای تشخیص میزان فعالیت فاکتورهای VII,V و X انعقادی و فیبرینوژن (معمولاً مقادیر کمتر از mg/dl ۸۰ فیبرینوژن در این آزمایش اثر می‌گذارد) نیز بکار می‌رود.

آگاهی از زمان پروترومبین (PT) هنگام مواجهه با بیماری کبدی نیز، به دلایل زیر برای پزشک حائز اهمیت است:

۱- PT با شدت بیماری کبدی وابستگی کامل دارد زیرا تمامی فاکتورهایی که به آنها اشاره شد در کبد سنتز گردیده و بدیهی است که اختلال در عمل کبد، اختلال در سنتز آنها را بدنبال خواهد داشت که این امر بر PT اثر مستقیم دارد.

۲- قبل از انجام بیوپسی کبد، باید از توانایی هموستاتیک بیمار آگاه شد.

از آنجائیکه در سنتز فاکتورهای VII,II و X وجود ویتامین K ضروری است، علاوه بر آنچه که در مورد بیماران کبدی گفته شد، می‌توان در آزمایشگاه، از طریق اندازه‌گیری PT در بیماران مشکوک

16 - Prothrombin time



به سندرم سوء جذب ویتامین K (فقر ویتامین K)، به تخمین مقدار ویتامین K مبادرت ورزید. به این ترتیب که چنانچه پس از تجویز ویتامین K، زمان پروترومبین به حد نرمال بازگشت، تشخیص قطعیت می‌یابد.

مقدار طبیعی PT معمولاً بین ۱±۱۳ ثانیه است. در این آزمایش، ابتدا ۱/۸ میلی‌لیتر خون را با ۰/۲ میلی‌لیتر سیترات سدیم ۳/۸٪ مخلوط می‌نمائیم. کلسیم موجود در خون به سیترات سدیم متصل گردیده و حذف می‌شود و بدینوسیله از انعقاد خون ممانعت به عمل می‌آید. آنگاه به پلاسمای جدا شده، ترمبوپلاستین بافتی (فاکتور III) و کلسیم اضافه نموده و زمان لازم برای تشکیل لخته را اندازه‌گیری می‌نمائیم.

### روش آزمایش:

۱- خون محتوی ضد انعقاد را در مدتی کمتر از ۲ ساعت پس از نمونه‌گیری به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۱۵۰۰ سانتریفوژ نموده و سپس در بن ماری ۳۷ قرار دهید. باید توجه داشت که زمان انکوباسیون از ۵ دقیقه تجاوز ننماید.

۲- ml ۰/۲ از مخلوط ترومبوپلاستین و کلسیم در ویالهای جداگانه نگهداری می‌شوند که در این صورت از هر یک ml ۰/۱ در لوله آزمایش بریزید).

۳- ml ۰/۱ از پلاسمای جدا شده را به لوله محتوی ترومبوپلاستین و کلسیم، اضافه نموده و به طور همزمان کرنومتر را بکار اندازید.

٤- پس از مخلوط کردن محتویات لوله، آنرا از بن ماری بیرون آورده و بدنه لوله را خشک نمائید و در همین حال وضعیت لوله را به آرامی و مرتباً به حالتهای افقی و عمودی تغییر داده و به محض مشاهده انعقاد پلاسما، زمان را متوقف نمائید.

٥- برای به حداقل رسانیدن خطاهای احتمالی، بهتر است آزمایش دوبار انجام گیرد که در این صورت چنانچه PT کمتر از ۳۰ ثانیه بود، نتایج قرائت شده باید تنها ۰/۵ ± ثانیه با یکدیگر تفاوت داشته باشند.

٦- زمان PT بدست آمده را با استاندارد آزمایشگاه مقایسه و مقدار INR و درصد فعالیت پروترومبین را نیز می‌توان محاسبه و گزارش نمود.

عواملی که باعث افزایش PT می‌شوند عبارتند از:

۱- درمان با داروهای ضد انعقادی مانند کومادین و یا داروهای ضد ویتامین K .

۲- یرقان انسدادی (اختلال در جریان صفرا موجب جذب ناقص ویتامین K در روده می‌شود).

۳- بیماریهای کبدی.

٤- مصرف بیش از اندازه سالیسیلات‌ها (آسپیرین)

٥- در سندرومهای نفروتیک بعلت فقدان پروتئینهای انعقاد ناشی از دفع شدید آنها توسط کلیه.

٦- کمبود مادرزادی یکی از فاکتورهای II , V , VII , X یا همه آنها



۷- کمبود فیبریوژن (کمتر از mg/dl ۸۰)

۸- حالات سوء جذب (فقر ویتامین K)

همچنین ممکن است خطاهای تکنیکی در زمان پروترومبین افزایش ایجاد نمایند که اهم آنها عبارتند از:

۱- ایجاد لخته در نمونه، بعلت ضعف در تکنیک خونگیری که موجب می‌شود تا بجای پلاسما، سرم مورد آزمایش قرار گیرد.

۲- عدم رعایت نسبت دقیق ۱ به ۹ بین سیترات و خون

۳- استفاده از ضد انعقاد نامناسب مثل EDTA به جای سیترات سدیم

٤- تنظیم نبودن دقیق حرارت بن ماری

## اندازه‌گیری زمان پروترومبین پارشیال فعال شده (APTT)

## Activated Partial Thromboplastin Time (APTT):

این تست به منظور بررسی نقص در تمامی فاکتورهای انعقادی بجز فاکتورهای VII و XIII مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این آزمایش، پلاسمای فاقد پلاکت به همراه یک عامل فعال کننده، برای مدتی در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردیده و در نتیجه این عمل، زمان مورد نیاز برای واکنشهای وابسته به مرحله تماس انعقاد، قبل از اضافه نمودن کلسیم، فراهم می‌گردد.

همچنین می‌توان از فسفولیپیدهایی که دارای منشاء گیاهی یا حیوانی هستند، بجای فاکتور ۳ پلاکت ($PF_3$) استفاده نمود.

هر یک از مواد زیر می‌توانند بعنوان عامل فعال کننده، در این آزمایش مورد استفاده قرار گیرند: کائولین (Kaolin) اسید الاژیک (Elagic acid) و سلنیت کلوئیدی (Coloidal celenite) مدت زمان انکوباسیون قبل از اضافه نمودن کلسیم، با توجه به عامل فعال کنندهٔ مورد استفاده، متفاوت است، که در اینجا به توضیح روشی خواهیم پرداخت که در آن از سلنیت بعنوان فعال کننده استفاده می‌شود.

◆ مواد و وسایل مورد نیاز:

۱- مخلوط ترومبوپلاستین پارشیال و سلنیت کلوئیدی

۲- کلرید کلسیم ۰/۰۲۵ M

۳- کرنومتر

٤- بن ماری ۳۷ درجه سانتیگراد

**روش انجام آزمایش:**

۱- ۱/۸ ml خون کامل را دقیقاً با ۰/۲ ml سیترات سدیم مخلوط نمائید.

۲- خون حاوی ضد انعقاد را در دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه، سانتریفوژ نمائید.

۳- پس از اینکار، به آرامی پلاسما را جدا نمائید.

٤- با در نظر گرفتن تعداد آزمایشات درخواستی، مقادیر مناسب از کلرید کلسیم را در لوله آزمایش ریخته و در داخل بن ماری ۳۷ درجه سانتیگراد قرار دهید.



۵- در داخل یک لوله همولیز، ۰/۱ ml از نمونه را به ۰/۱ ml از مخلوط سلنیت اضافه نموده و پس از آنکه خوب مخلوط نمودید، دقیقاً به مدت ۳ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سانتیگراد قرار دهید.

٦- پس از انقضای مدت فوق، ۰/۱ ml کلرید کلسیم به لوله فوق اضافه نموده و مخلوط کنید و بطور همزمان کرنومتر را بکار اندازید.

۷- در حالیکه هر ۵ ثانیه لوله را به آرامی تکان می‌دهید، و پس از گذشت ۲۰ ثانیه، لوله را از بن ماری خارج نموده و بگونه‌ای که در مورد PT ذکر گردید، به محض مشاهده لخته، کرنومتر را متوقف کرده و زمان سپری شده را بعنوان APTT گزارش نمائید.

**نکات:**

۱- در این روش، زمان طبیعی برای تشکیل لخته، ۳۵ الی ٤۰ ثانیه است. و زمانهای کوتاهتر از محدوده ذکر شده، اگر چه ارزش پاتولوژیک ندارد، اما در اینگونه موارد، انجام مجدد آزمایش، توصیه می‌شود.

۲- افزایش بیش از ۸ ثانیه، در مقایسه با محدوده طبیعی، بعنوان یک تغییر پاتولوژیک محسوب می‌شود.

۳- هموفیلی‌های A و B، شایعترین کمبودهای مادرزادی فاکتورهای مسیر داخلی را تشکیل می‌دهند. چنانچه مقادیر فاکتورهای VIII و IX طبیعی بوده اما در APTT افزایش مشاهده شود، باید با کمبود در فاکتورهای XI و XII، پره کالیکرین Prekallikerein و یا کینینوژن با وزن ملکولی زیاد (HMWK) مشکوک شد.

۴- افزایش همزمان APTT و PT می‌تواند بیانگر نارسایی کبدی، DIC و یا وجود یک ماده ضد انعقاد در گردش خون باشد.

۵- APTT یکی از قابل اطمینان‌ترین آزمایشاتی است که در کنترل درمان توسط هپارین بکار می‌رود. به هنگام درمان صحیح با هپارین، زمان تشکیل لخته ۵۰ الی ۹۰ ثانیه بطول خواهد انجامید که این زمان، به روش تجویز و کیفیت هپارین مورد استفاده، و بویژه، شرایط کار در آزمایشگاه بستگی خواهد داشت. در اینگونه موارد، انجام آزمایش بر روی نمونه، نباید بیش از یکساعت به تعویق بیفتد و همچنین پس از سانتریفوژ نمونه، باید پلاسما را به آرامی جدا نمود زیرا در غیر اینصورت، آلوده شده پلاسما توسط فاکتور ٤ پلاکت PF4 که خاصیت ضد هپارینی دارد، باعث ایجاد نتایج اشتباه خواهد شد.

٦- در مواردی غیر از ارزیابی درمان توسط هپارین، از زمان نمونه‌گیری تا انجام آزمایش، نباید بیش از ۲ ساعت تأخیر صورت پذیرد.

## اندازه‌گیری زمان سیلان[17] (BT):

این آزمایش، جهت بررسی اختلالات مادرزادی و اکتسابی در عمل پلاکت‌ها، و تشخیص احتمالی بیماری ون ویلبراند مورد استفاده قرار می‌گیرد.

17 - Bleeding time



### طریقهٔ انجام آزمایش:

**روش دوک**[18]: ابتدا بخش انتهای لالهٔ گوش را توسط الکل ضد عفونی نموده و پس از خشک شدن، بوسیلهٔ لانست استریل، سوراخی به عمق تقریبی ۳ میلیمتر در محل مزبور ایجاد نمائید. بلافاصله پس از ایجاد سوراخ، کرنومتر را بکار اندازید و آنگاه یک کاغذ صافی را در تناوبهای ۳۰ ثانیه‌ای با خون خارج شده از گوش، تماس دهید. دقت کنید تا از تماس کاغذی صافی با محل سوراخ خودداری شود. بلافاصله پس از قطع خون‌ریزی، کرنومتر را متوقف کرده و زمان را قرائت کنید.

حد طبیعی زمان سیلان در روش دوک، بین ۱ الی ٤ دقیقه است.

افزایش زمان سیلان، معمولاً انعکاسی از ترومبوسیتوپنی خفیف تا شدید است و بنظر می‌رسد که ترومبوسیتوپنی ناشی از اختلال تولید در مغز استخوان، در افزایش زمان سیلان بیش ازترومبوسیتوپنی ناشی از تخریب پلاکت‌ها مؤثر باشد. زیرا در حالت اخیر، مغز استخوان بطور طبیعی مبادرت به تولید پلاکت می‌نماید و در نتیجه پلاکت‌های جوان‌تر و فعال‌تر، در گردش خون افزایش می‌یابد. و این امر موجب بقای BT در حد نرمال می‌شود. بطور کلی در بیماران مبتلا به ترومبوسیتوپنی ناشی از اختلال تولید در مغز استخوان، زمان سیلان با تعداد پلاکت کمتر از ۱۰۰ هزار در هر میلی‌متر مکعب، نسبت معکوس

18- Duke's Method

دارد. بدین معنی که هر چه تعداد پلاکت از این حد کمتر باشد، زمان سیلان افزایش می‌یابد.

عامل مؤثر دیگر در افزایش زمان سیلان، بیماران ون‌ویلبراند است که در طی آن عمل چسبندگی پلاکت‌ها به جداره عروق، مختل می‌شود.

در بیماران، مبتلا به اختلال عملی مادرزادی یا اکتسابی، بدلیل ناتوانی پلاکت‌ها در تجمع، زمان سیلان نسبت به حالات طبیعی افزایش می‌یابد. همچنین، آسپیرین و تعدادی دیگر از داروها از قبیل ایندومتاسین (که بر روی پلاکت‌ها تأثیری مشابه به آسپیرین دارد)، فنوتیازین‌ها و آنتی‌هیستامین‌ها (از طریق تأثیر بر غشای پلاکت‌ها) اعمال پلاکت را مختل نموده و باعث افزایش BT می‌شوند. بنابراین چنانچه امکان داشته باشد بیمار باید از خوردن اینگونه داروها خودداری نماید. بویژه در صورت مصرف آسپیرین و دیگر داروهای حاوی آسپیرین توسط بیمار، انجام آزمایش باید حداقل به مدت یکهفته به تعویق بیفتد و در خلال این مدت، در صورت نیاز بیمار به داروهای مسکن، می‌توان استفاده نمود.

و سرانجام، اگر چه معمولاً در بیماران مبتلا به اختلالات انعقادی، زمان سیلان طبیعی است، اما در این بیماران بدلیل تشکیل پلاکت‌های هموستازی ناپایدار، احتمال خونریزی مجدد در صورت کنده شده پوسته زخم، وجود دارد.



## زمان انعقاد (Clotting Time (CT)):

مدت زمان لازم برای لخته شدن خون در یک لوله شیشه‌ای، که از آن بعنوان زمان انعقاد یاد می‌شود، وسیله‌ای جهت سنجش فعالیت عوامل مؤثر در مسیر داخلی انعقاد است.

اندازه‌گیری زمان انعقاد خون کامل، آزمایشی است که از حساسیت کمی برخوردار می‌باشد و به همین دلیل، اغلب به منظور ارزیابی درمان با هپارین مورد استفاده قرار می‌گیرد، و از آنجائیکه نتایج بدست آمده از این تست غالباً غیر قابل اعتماد می‌باشد، بنابراین انجام تست‌های دیگری نظری APTT الزامی است. با این وجود هنوز در آزمایشگاهها به انجام این تست مبادرت می‌ورزند.

### طریقهٔ آزمایش:

۱- بلافاصله پس از ورود خون به داخل سرنگ نمونه‌گیری، کرنومتر را بکار اندازید.

۲- پس از اتمام نمونه‌گیری، ۱ میلی‌لیتر از خون را داخل یک لوله همولیز بریزید و لوله را در بن ماری ۳۷ درجه قرار دهید.

۳- آنگاه در تناوب‌های ۳۰ ثانیه‌ای، لوله را به آرامی و به گونه‌ای که در مورد PT ذکر گردید تکان دهید.

٤- به محض مشاهده لخته، زمان سنج را متوقف و زمان سپری شدن را بعنوان زمان انعقاد گزارش نمائید.

زمان طبیعی ایجاد لخته به این روش، بین ٤ الی ۸ دقیقه است.

## رنگ‌آمیزی آهن (آبی پروس):

این رنگ‌آمیزی در تشخیص آنمی فقر آهن و آنمی سیدروبلاستیک بسیار ارزشمند است. همانگونه که در مبحث گلبولهای قرمز ذکر گردید، اریتروبلاستهای در حال رشد موجود در مغز استخوان، حاوی دانه‌ها آهن رنگ پذیر هستند که این اریتروبلاستها، سیدروبلاست نامیده می‌شوند.

بطور طبیعی ۲۰ الی ۵۰٪ اریتروبلاستها و ماکروفاژهای مغز استخوان، حاوی چنین گرانولهایی هستند که در آنمی فقر آهن، این تعداد، کاهش یافته و حتی به صفر می‌رسد و در آنمی سیدروبلاستیک تعداد گرانولهای آهن، افزایش یافته و بصورت حلقه‌ای در اطراف هسته اریتروبلاست مشاهده می‌شوند و اریتروبلاست در این حالت سیدروبلاست حلقوی نامیده می‌شود که مشخصه آنمی سیدروبلاستیک است.

◆ مواد و وسایل مورد نیاز:

### ۱- محلول ۴٪ اسید کلریدریک در آب:

Ml ٤ از محلول غلیظ HCl را به ml ۹٦ آب مقطر اضافه نمائید و در تمام مدت انجام این کار، ظرف محتوی محلول را به آرامی تکان دهید. این محلول برای مدت چندین ماه در حرارت اتاق، پایدار است.

### ۲- محلول ۴٪ فروسیانید پتاسیم در آب:

این محلول نیز برای مدت چند ماه در درجه حرارت اتاق، پایدار است.



### ۳- محلول ذخیره (Stock) فوشین قلیایی:

۱ گرم فوشین قلیایی را در ml ۱۰ الکل مطلق حل نموده و سپس به آن ml ۹۰ محلول آبی فنل ۵٪ بیفزائید و محلول حاصل را صاف نمائید. این محلول نیز در درجه حرارت اتاق به مدت چندین ماه پایدار است.

### ۴- محلول کاری فوشین قلیایی:

ml ۳ از محلول ذخیره فوشین را توسط ml ۱۰۰ آب مقطر رقیق کنید. این محلول به مدت چندین هفته در حرارت اتاق پایدار است.

### ۵- فرمالین

## طریقهٔ رنگ آمیزی:

۱- گسترش خون یا مغز استخوان را توسط هوا خشک نمائید.

۲- نمونه را توسط بخار فرمالین فیکس نمائید. بدین ترتیب که آنرا به همراه یک پنبهٔ آغشته به فرمالین به مدت ۲ الی ۳ دقیقه در زیر یک پلیت میکروب شناسی قرار دهید.

۳- حجمهای مساوی از محلول ٤٪ اسید کلریدریک و محلول ٤٪ فروسیانید پتاسیم را مخلوط کرده و دمای آنرا به ٥٦ درجه سانتیگراد برسانید. آنگاه نمونه را در داخل آن قرار دهید.

٤- پس از ۳۰ دقیقه، لام را از ظرف محتوی رنگ خارج نموده و با آب بشوئید.

۵- آنگاه به مدت ۵ دقیقه، نمونه را در ظرف محتوی محلول کاری فوشین قلیایی قرار دهید.

٦- پس از سپری شدن این مدت، لام را ابتدا با آب، سپس با الکل اتیلیک مطلق و مجدداً با آب شستشو دهید و پس از خشک شدن، توسط میکروسکوپ مشاهده نمائید.

منطقه‌ای از گسترش مغز استخوان که در آن منطقه سلولها به خوبی از یکدیگر فاصله دارند، مناسب‌ترین محل جهت یافتن و بررسی سیدروبلاست‌هاست.

الگوهای اتفاقی توسط منابع خارجی حاوی آهن، اجتناب ناپذیر است و بنابراین برای افرادی که نمونه رنگ آمیزی شده توسط آبی پروس را مورد بررسی قرار می‌دهند، تشخیص خطاهای تکنیکی (Artifacts) از آهنی که در داخل سلولهای خونی موجود است، ضروری می‌باشد. معمولاً این مواد به شدت موجب انکسار نور می‌شوند.

گرانولهای آهن، بطور طبیعی در گلبول‌های قرمز بالغ موجود در خون محیطی مشاهده نمی‌شوند اما معمولاً متعاقب اسپلنکتومی، این امر به وقوع می‌پیوندد.

همچنین به منظور مشاهده هموسیدرین دفع شده توسط ادرار، رسوب ادرار را توسط آبی پروس رنگ‌آمیزی می‌نمایند:

ابتدا نمونه ادرار را سانتریفوژ نموده و مقداری از مایع فوقانی را دور ریخته و سپس مجدداً رسوب حاصله را در باقیمانده ادرار، شناور



نمائید. آنگاه حجم مساوی از مخلوط HCL ٤٪ و فروسیانید پتاسیم ٤٪ به آن اضافه نموده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق به شدت تکان دهید. پس ازاین مدت، یک قطره از مخلوط فوق را بر روی لام قرار داده و روی آنرا توسط لام پوشانیده و آنگاه بوسیله میکروسکوپ بررسی نمائید. همچنین به روشی که برای نمونه‌های خونی و مغز استخوان بیان شد نیز می‌توان به رنگ آمیزی رسوب ادرار مبادرت ورزید.

هموسیدرین در ادرار ممکن است بصورت گرانولهای آبی آزاد و یا بصورت گرانولهای آبی رنگ در داخل سلولهای اپی‌تلیال مشاهده شود.

هموسیدرین در ادرار بیماران مبتلا به همولیز درون عروقی وجود دارد و در هموگلوبینوری حمله‌ای شبانه، وجود آن در ادرار فرد مبتلا، کمک با ارزشی در تشخیص نهایی بیماری می‌باشد.

## رنگ‌آمیزی سودان سیاه (Black Soudan) :

یکی از روشهای مورد استفاده در رنگ‌آمیزی لیپیدها می‌باشد.

در این رنگ آمیزی چربی به رنگ سیاه یا سبز خاکستری در می‌آید و می‌تواند جانشین خوبی برای رنگ آمیزی پراکسیداز که به روش بنزیدین که ماده‌ای سرطان‌زا است باشد. دانه‌های پراکسیداز مثبت سودان مثبت نیز می‌باشند بعلاوه لامهای کهنه را نیز می‌توان به این روش رنگ‌آمیزی و حفظ نمود واکنش سودان سیاه در میلوبلاست،

نورموبلاست، لمفوبلاست، منوبلاست و لمفوسیت ـ ها منفی و در سایر رده‌های بخصوص رده میلوئیدی سلولی مثبت می‌باشد.

## رنگ‌آمیزی (Periodic Acid Schiff (PAS)):

این رنگ‌آمیزی جهت جستجوی بخصوص گلیکوژن و موکوپروتئین‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. واکنش PAS در میلوبلاست‌ها منفی اما در لمفوبلاست‌ها مثبت می‌باشد.

## رنگ‌آمیزی پراکسیداز:

واکنش پراکسیداز در سلولهای ردهٔ نوتورفیلی و ائوزینوفیلی به شدت و در سلولهای رده منوسیتی بطور ضعیفی مثبت است. بنابراین از این واکنش می‌توان در تشخیص سلولهای فوق‌الذکر از سلولهای لنفوئیدی و اریتروئیدی استفاده نمود.

آنزیم پراکسیداز باعث تغییر هیدروژن به پراکسید هیدروژن می‌شود که این امر موجب تولید رنگ آبی یا قهوه‌ای در محل فعالیت آنزیم می‌شود.

مواد مورد نیاز:

### ۱- محلول ثابت کننده فرمالین ـ اتانول ۱۰٪ :

| | |
|---|---|
| فرمالین ۳۷٪ | ۱۰ میلی‌لیتر |
| الکل اتیلیک مطلق | ۹۰ میلیدلیتر |



### ۲- محلول رنگ‌آمیزی:

| | |
|---|---|
| الکل اتیلیک ۳۰٪ | ۱۰۰ میلی‌لیتر |
| دی‌هیدروکلرید بنزیدین | ۰/۳ گرم |
| محلول سولفات روی ۳/۸٪ وزنی ـ حجمی | ۱ میلی‌لیتر |
| استات سدیم | ۱ گرم |
| پراکسید هیدروژن ۳٪ | ۰/۷ میلی‌لیتر |
| هیدروکسید سدیم نرمال | ۱/۵ میلی‌لیتر |
| سافرانین | ۰/۲ گرم |

به هنگام ساخت محلول رنگ‌آمیزی، ترتیب ذکر شده در فوق را رعایت نموده و پس از اضافه نمودن هر یک از مواد، آنرا بخوبی با مواد قبلی مخلوط نمائید. در خاتمه، محلول بدست آمده را صاف نموده و در یک ظرف درب‌دار نگهداری نمائید. این محلول به مدت ٦ ماه در درجه حرارت اتاق پایدار است.

### روش انجام رنگ‌آمیزی:

۱- گسترش تهیه شده از نمونه را به مدت ٦٠ ثانیه در محلول فرمالین ـ اتانول ۱۰٪ ثابت نمائید.

۲- برای مدت ۱۵ الی ۳۰ ثانیه، نمونه را توسط جریان ملایم آب، شستشو دهید و آب اضافی روی لام را با تکام دادن خارج نمائید.

۳- نمونه را به مدت ۳۰ ثانیه در داخل محلول رنگ‌آمیزی قرار دهید.

۴- پس از سپری شدن مدت زمان فوق، نمونه را به مدت ۱۰ ثانیه توسط جریان آب شستشو دهید و پس از خشک شدن توسط میکروسکوب بررسی نمائید.

## آلکالین فسفاتاز لکوسیتی (LAP):

## Leukocyte Alkaline Phosphatase:

تخمین فعالیت آلکالین فسفاتاز لکوسیتی (LAP) در تشخیص افتراقی CML و واکنشهای شبه لوسمی[19]، مانند آنچه که در عفونتهای مزمن و پلی ـ سیتمی حقیقی مشاهده می‌شود مفید است.

آنزیم آلکالین فسفاتاز در گرانولهای ثانویه (اختصاصی) موجود بوده و در نتیجه، فعالیت آلکالین فسفاتاز با شدت‌های متفاوتی در نوتروفیلها مشاهده می‌شود که بستگی به درجه بلوغ و تمایز سلول دارد.

در این تست فسفات نفتول ASB 1 که بعنوان سوبسترا بکار می‌رود، تحت اثر آنزیم آلکالین فسفاتاز به فسفات و آریل نفتول آمید تبدیل می‌شود. سپس آریل نفتول آمید به یک نمک دیازونیوم متصل گردیده و تشکیل یک رنگ غیر محلول را می‌دهد:

19 - Leukemoid reaction



◈ مواد مورد نیاز:

### ۱- محلول ثابت کننده:

| | |
|---|---|
| سیترات سدیم M ۳٪ (۴/۴۱ گرم در ml ۵۰۰ آب مقطر) | ۱۰۰ میلی‌لیتر |
| استون | ۱۵۰ میلی‌لیتر |

### ۲- محلول ذخیره پروپاندیول M ۰/۲ :

| | |
|---|---|
| ۲ آمینو ـ ۲ متیل ۱ و ۳- پروپاندیول | ۱۰/۵ گرم |
| آب مقطر | ۵۰۰ میلی‌لیتر |

### ۳- محلول کاری پروپاندیول:

| | |
|---|---|
| محلول ذخیره‌ی پروپاندیول M ۰/۲ | ۲۵ میلی‌لیتر |
| اسید کلریدریک N ۰/۱ | ۷ میلی‌لیتر |

با آب مقطر حجم را به ۱۰۰ میلی‌لیتر برسانید.

این محلول نیز باید در یخچال نگهداری شود اما قبل از مصرف باید دمای آن به درجه حرارت اتاق برسد.

### ۴- مخلوط سوبسترا:

| | |
|---|---|
| فسفات نفتول ASB 1 | ۵ میلی‌گرم |
| دی متیل فرمالید | ۰/۳ میلی‌گرم |
| محلول پروپاندیول | ۶۰ میلی‌لیتر |
| نمک Fast Violet B | ۳۰ میلی‌گرم |

ظرف محتوی محلول را به مدت ۳۰ ثانیه به شدت تکان دهید. آنگاه محلول را صاف نموده و حداکثر تا ۳۰ دقیقه پس از تهیه، مصرف نمائید.

### ۵- محلول رنگی هماتوکسیلین:

| | |
|---|---|
| هماتوکسیلین | ۱ گرم |
| آب مقطر | ۵۰۰ میلی‌لیتر |

محلول فوق را تا رسیدن به نقطه جوش حرارت داده، آنگاه مجدداً ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه نمائید. سپس به این محلول ۰/۲ گرم یدات سدیم و ۵۰ گرم سولفات آلومینیوم پتاسیم اضافه نموده در ظرف شیشه‌ای تیره در درجه حرارت اتاق نگهداری نمائید. محلول رنگی هماتوکسیلین را قبل از مصرف باید صاف نمود.

### ۶- محلول آمونیومی رقیق:

۱ الی ۲ قطره آمونیوم غلیظ به ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه نمائید.

### روش رنگ‌آمیزی:

۱- نمونه را به مدت ۳۰ ثانیه در محلول ثابت کننده قرار دهید و سپس توسط جریان آب به مدت ۳۰ الی ۶۰ ثانیه شستشو داده و خشک نمائید.

۲- نمونه را برای مدت ۱۰ دقیقه در مخلوط سوبسترا قرار دهید و سپس توسط جریان آب به مدت ۳۰ الی ۶۰ ثانیه شستشو دهید.



۳- نمونه را به مدت ۵ الی ۱۰ دقیقه توسط هماتوکسیلین رنگ‌آمیزی نموده، آنگاه به مدت ۳۰ الی ۶۰ ثانیه توسط جریان ملایم آب شستشو دهید.

۶- نمونه را یکبار در محلول آمونیوم رقیق فرو برده و سپس ۵ الی ۱۰ دقیقه توسط جریان آب شستشو دهید.

۵- پس از خشک کردن، توسط میکروسکوپ بررسی نمائید.

شدت این واکنش در مواردی از قبیل حاملگی، عفونتهای توأم با نوتروفیلی، پلی سیتمی حقیقی، مصرف کورتیکواستروئیدها، میلومای مولتیپل، میلواسکلروزیس و یرقان انسدادی افزایش یافته و در CML و مواردی از قبیل PNH، آنمی داسی شکل، ائوزینوفیلی شدید، و آنمی سیدروبلاستیک کاهش می‌یابد.

### نکات:

در این تست برای تهیهٔ گسترش خونی، استفاده از خون مویرگی توصیه می‌شود و چنانچه ناگزیر به استفاده از خون حاوی ضد انعقاد بودید، باید از هپارین بعنوان ضد انعقاد استفاده نموده و از مصرف EDTA اجتناب نمائید.

### طریقهٔ محاسبه:

حد طبیعی واکنش آلکالین فسفاتاز، بین ۵۰ الی ۱۰۰ می‌باشد و برای محاسبه شدت واکنش، پس از بررسی ۱۰۰۰ گلبول سفید، ابتدا براساس میزان رنگ‌پذیری و تعداد دانه‌های رسوب کرده، برای هر کدام از گلبولها، اعدادی از صفر تا ٤، در نظر می‌گیریم:

۰ عدم رنگ‌پذیری و فقدان رسوب

۱ رنگ پذیری به همراه رسوب بسیار کم

۲ رنگ پذیری گسترده به همراه رسوب چند گرانول

۳ رنگ پذیری گسترده به همراه رسوب گرانولهای فراوان

٤ رنگ پذیری شدید به همراه رسوب گرانولهای متعدد و درشت

**فرض کنید از ۱۰۰۰ گلبول شمرده شده برای ٤٥٠ عدد از آنها با توجه به خصوصیات ذکر شده، عدد صفر منظور می‌شود. در اینحالت عدد ٤٥٠ را در عدد صفر ضرب نموده و حاصل را یادداشت کنید. حال فرض کنید برای ۳۰۰ گلبول، عدد ۱، برای ۲۰۰ گلبول، عدد ۲، و برای ٥٠ گلبول، عدد ۳ منظور شود، در هر یک از این حالت‌ها نیز تعداد سلولها را در عدد منظور شده برای آنها ضرب نموده و نتیجه را یادداشت کنید. آنگاه نتایج بدست آمده را با یکدیگر جمع، و حاصل را بر عدد ۱۰ تقسیم نموده و عدد نهایی را بعنوان میزان فعالیت آلکالین فسفاتازلکوسیتی گزارش نمائید.**

**مطالب ذکر شده را می‌توان بصورت زیر خلاصه نمود:**

٤٥٠ × ۰ = ۰

۰ + ۳۰۰ + ٤۰۰ + ۱٥۰ + ۰ = ۸٥۰ ۳۰۰ × ۱ = ۳۰۰

۳۰۰ × ۲ = ٤۰۰

۸٥۰ : ۱۰ = ۸٥ ٥۰ × ۳ = ۱٥۰

SCORE = ۸٥ ۰ × ٤ = ۰

ادامه از صفحه ۱۸۸

# فصل سوم

# بیماری‌ها

## آنمی‌ها:

آنمی[1] یا کم خونی، به حالتی اطلاق می‌شود که تعداد گلبولهای قرمز و یا مقدار هموگلوبین کاهش می‌یابد. بطور معمول، تعداد گلبولهای قرمز کمتر از ٤ میلیون در هر میلی‌متر مکعب برای مردان و ۳/۵ میلیون در هر میلی‌متر مکعب برای زنان، و مقدار هموگلوبین پائین‌تر از حد طبیعی می‌تواند مشخص کننده یک نوع آنمی باشد. علل ایجاد آنمی‌ها بسیار متنوع بوده و می‌تواند ناشی از اتلاف خون (خونریزیهای حاد و مزمن)، ازدیاد تخریب گلبولهای قرمز (همولیز فیزیولوژیکی یا ایمونولوژیکی)، اختلال در آنزیمهای درون سلولی،

1 - Anemias



اشکال در غشاء گلبولهای قرمز، اشکال در سنتز هموگلوبین و بسیاری از عوامل دیگر باشد.

بنابراین آنها را به صورتهای مختلفی تقسیم‌بندی نموده‌اند که از آن میان می‌توان به تقسیم‌بندی مرفولوژیکی، و تقسیم‌بندی پاتوفیزیولوژیک اشاره نمود. در این مبحث ما به شرح مختصری از تقسیم‌بندی مرفولوژیک آنمی‌ها و انواع آنمی‌هایی که براساس خصوصیات ظاهری گلبولهای قرمز در هر یک از دستجات این تقسیم‌بندی قرار می‌گیرند، پرداخته و به هنگام بررسی برخی از انواع مهم و شایعتر آنمی، به خصوصیات پاتوفیزیولژیکی آنها نیز اشاره خواهیم نمود.

## طبقه‌بندی مرفولوژیک آنمی‌ها:

**۱- آنمی‌های ماکروسیتیک ـ نورموکرومیک**[2]: در این گونه آنمی‌ها، حجم متوسط گلبولی (MCV) افزایش یافته در حالیکه (MCHC) معمولاً تغییر چشمگیری نمی‌یابد. این حالت در اختلالات زیر مشاهده می‌گردد.

الف) آنمی مگالوبلاستیک

ب) آنمی ناشی از اختلالات کبدی

2 - Macrocytic Normochromic anemias

**۲- آنمی‌های نورموسیتیک ـ نورموکرومیک** [3]: در اینگونه آنمی‌ها، اندیس‌های گلبول قرمز معمولاً تغییری نمی‌یابند. این حالت در بیماریهای زیر مشاهد می‌شود:

الف) آنمی آپلاستیک

ب) لوسمی

ج) بیماریهای هوجکین

د) مولتیپل میلوما

هـ) لکواریتروبلاستوز

و) سرطان پیشرونده

ز) برخی از آنمی‌های همولیتیک اکتسابی

ح) آنمی داسی شکل

ط) هموگلوبینوری حمله‌ای شبانه (PNH)

ی) بیماری همولیتیک نوزادان

ک) خونریزی‌های حاد

**۳- آنمی‌های میکروسیتیک ـ هیپوکرومیک** [4]: در اینگونه آنمی‌ها، حجم متوسط گلبولهای قرمز (MCV) کاهش یافته و معمولاً MCH و MCHC نیز کاهش می‌یابند:

الف) آنمی فقر آهن

ب) تالاسمی

3 - Normocytic- Normochromic anemias
4 - Microcytic- hypochroic



ج) آنمی ناشی از خونریزی مزمن

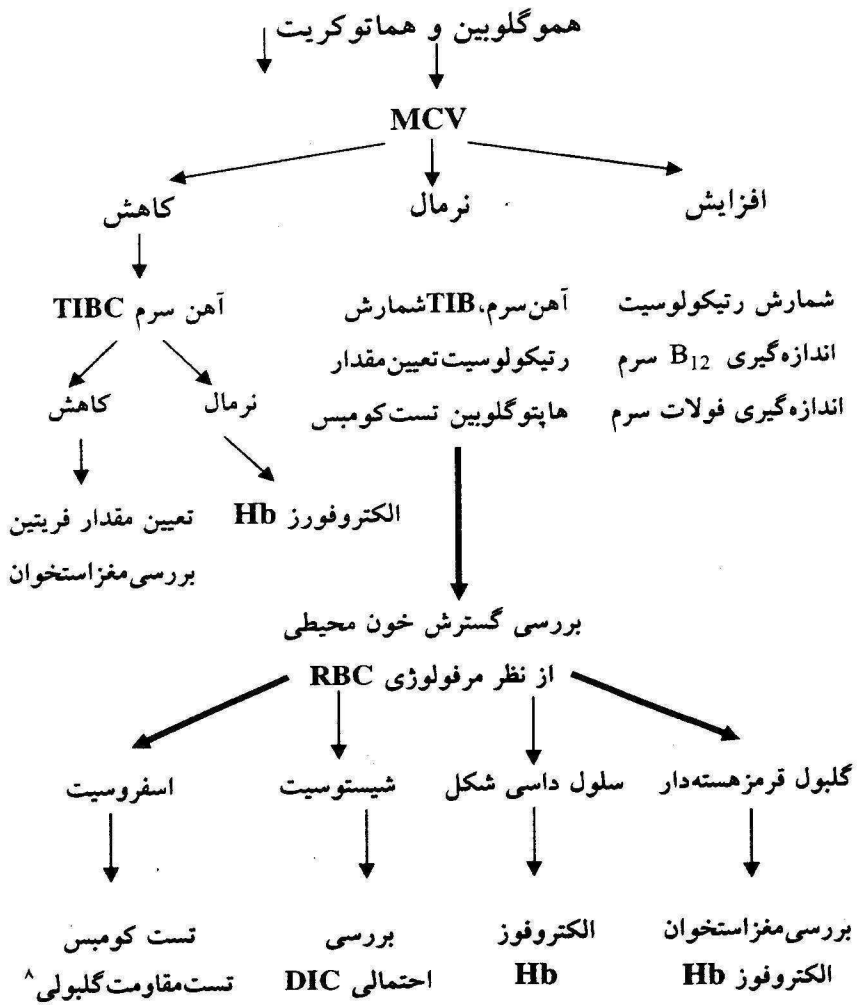
## آنمی‌های مگالوبلاستیک (Megaloblastic Anemias):

این آنمی‌ها بازتابی از فقر ویتامین $B_{12}$ و اسید فولیک بوده که به اشکال مختلف ظاهر می‌شوند. کمبود این ویتامین علاوه بر علل تغذیه‌ای، می‌تواند ناشی از اختلالات روده‌ای (سندروم ایمرس‌لاند[5] و سندروم مجرای بسته[6])، رقابت باکتریها و انگلها با میزبان برای مصرف ویتامین $B_{12}$ (E.coli و دیفلوبتریوم لاتوم) و فقدان ترشح اسید معده (گاستر کتومی)، باشد. همچنین وجود آنتی‌بادیهای اختصاصی بر ضد فاکتور داخلی و سلولهای جداری معده در نزد بیش از نیمی از بیماران مبتلا به آنمی مگالوبلاستیک، به اثبات رسیده است.

اختلال در سنتز DNA و در نتیجه، اختلال در بلوغ هسته‌ای، اساس پاتوفیزیولوژیکی این نوع آنمی را تشکیل می‌دهد که منجر به ظهور گلبولهای قرمز و گرانولوسیت‌ها و مگاکاریوسیت‌هایی بزرگتر از اندازه طبیعی می‌شود.

بارزترین نوع آنمی مگالوبلاستیک، آنمی پرنیشیوز[7] است. این بیماری در نتیجه ناتوانی مخاط معده در ترشح اسید و فاکتور داخلی بوده که در نهایت منجر به فقر ویتامین $B_{12}$ می‌شود و اکثراً در افراد بالای ۶۰ سال و بندرت در افراد زیر ۴۰ سال، بروز می‌نماید.

5 - Immerslud's syndrome
6 - Blind- loop syndrome
7 -Pernicious Anemia




(روشهای آزمایشگاهی در تجسس آنمی‌ها)

8 - Osmotic Fragility Test



### ◈ علائم بالینی:

رنگ پریدگی، تنگی نفس، درد شکم، اسهال، استفراغ، زخم بر روی زبان، درگیری سیستم عصبی مرکزی بصورت از دست دادن احساس درک موقعیت فضایی و ضعف عضلانی، و در موارد شدیدتر، تغییر در شخصیت (دیوانگی مگالوبلاستیک).

### ◈ یافته‌های آزمایشگاهی:

الف) خون:

پان سیتوپنی[9] (کاهش تمامی اجزای سلولی خون)، تعداد گلبولهای سفید بین ٤ الی ٥ هزار در هر میلی‌متر مکعب شامل ۵۰٪ لنفوسیت، ماکروسیت‌های بیضوی نورموکرومیک، دانه‌های بازوفیلیک، اجسام هاول ـ ژولی، آنیزوسیتوز، پویکیلوسیتوز نوتروفیلهای هیپرسگمنته با هسته ٦ الی ۱۰ لوبه، شمارش رتیکولوسیت‌ها پایین‌تر از حد طبیعی.

ب) مغز استخوان:

هیپرسلولار (نمایانگر خونسازی بی‌اثر) بویژه در مورد سلولهای رده اریتروئیدی، سلولهای گرانولوسیتی بزرگتر از حد طبیعی (وجود متامیلوسیت‌های غول‌آسا در مغز استخوان در این بیماری ارزش تشخیصی دارد).

9 - Pancytopenia

ج) سایر یافته‌ها:

عدم ترشح اسید معده (آکلریدری[10]) پس از تحریک توسط هیستامین‌ها، مثبت بودن تست شیلینگ[11]، کاهش ویتامین $B_{12}$ سرم، کاهش طول عمر گلبولهای قرمز، آهن سرم طبیعی یا افزایش یافته، TIBC طبیعی یا کاهش یافته، کاهش هاپتوگلوبین و افزایش بیلیروبین سرم.

## آنمی فقر آهن (Iron Deficiency Anemia) :

آنمی فقر آهن هنگامی بروز می‌نماید که ذخایر آهن بدن کاهش یافته و مقدار آهن موجود برای سنتز طبیعی هموگلوبین، کافی نباشد.

آنمی فقر آهن، شایعترین نوع آنمی در بین نوزادان و زنان بوده و احتمالاً شایعترین علت آنمی در سنین بین ٦ الی ٢٤ ماهگی است.

عوامل متعددی در بروز فقر آهن دخالت دارند که از آنها می‌توان به تغذیه نامناسب، سوء جذب آهن، آکلریدری، گاستر کتومی، حاملگی، شیردهی، خونریزی‌های مزمن، همولیز درون عروقی همراه با هموگلوبینوری، خونروش، دیالیز، و آلودگی با کرمهای قلابدار اشاره نمود.

در نزد افراد مبتلا به این بیماری، در مراحل اولیه، هیچگونه نشانه‌ای از وجود آنمی یافت نمی‌شود. بعنوان مثال، چنانچه مرد بالغ

10 - Achlorydria
11 - Schilling test



سالمی، هیچگونه غذای حاوی آهنی مصرف ننماید، ذخیره آهن بدن او به مدت سه الی چهار سال برای انجام فعالیت‌های طبیعی وابسته به آهن، کافی است. در نتیجه این بیماری در مردان، تقریباً همیشه متعاقب خونریزی مزمن بروز می‌نماید.

### ◈ علائم بالینی:

ضعف، خستگی، سستی، گیجی، طپش قلب، زبان ملتهب و گاهی زخم ترک خوردگی کنار لبها، ناخنهای قاشقی شکل، گاستریت مزمن، تمایل به خوردن چیزهای غیر معمولی از قبیل یخ و خاک (pica)، اختلال در عمل بلع.

### ◈ یافته‌های آزمایشگاهی:

الف) خون:

آنمی، آنیزوسیتوز، پویکیلوسیتوز، تعداد رتیکولوسیت‌ها در ابتدا نرمال است اما پس از درمان توسط آهن افزایش می‌یابد، پلاکت‌ها کوچکتر از حد معمول و تعداد آنها طبیعی است، گاهی تارگت سل مشاهده می‌شود.

ب) مغز استخوان:

کاهش یا فقدان سیدروبلاست‌ها در مغز استخوان، در این بیماری ارزش تشخیصی دارد.

ج) سایر یافته‌ها:

کاهش آهن سرم، افزایش TIBC، کاهش فریتین، مقاومت گلبولی نرمال، افزایش پورفیرینهای گلبول قرمز.

آنمی فقر آهن را باید از سایر آنمی‌های میکروسیتیک ـ هیپوکرومیک تشخیص داد. جدول زیر خلاصه‌ای از برخی اختلافات آزمایشگاهی موجود بین آنمی فقر آهن، تالاسمی مایئور، آنمی ناشی از بیماریهای مزمن، و آنمی سیدوبلاستیک را نشان می‌دهد:

| | آهن سرم | TIBC | فرینین | FEP | $HbA_2$ | HbF | سیدرو بلاست | ذخیره آهن |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | مغز استخوان | | |
| فقر آهن | ↓ | ↑ | ↓ | ↑ | ↓ | N | ↓ | ↓ |
| تالاسمی مایئور | N(↑) | N | N_↑ | N | ↑ | N_↑ | N | N_↑ |
| آنمی‌بیماریهای مزمن | ↓ | N-↓ | N-↑ | ↑ | N | N | ↓ | N_↑ |
| آنمی سیدروبلاستیک | ↑ | ↓ | ↑ | ↑(↓) | N | N_↑ | ↑ | ↑ |

بدلیل شیوع تالاسمی در ایران، لزوم تشخیص افتراقی بین آنمی فقر آهن و این بیماری ضرورت می‌یابد و در مواقعی که امکان استفاده از تستهای بیوشیمیایی و الکتروفورز هموگلوبین موجود نیست، برای تشخیص این دو بیماری از یکدیگر می‌توان از فرمولهای زیر استفاده کرد:

۱- گسترش خونی: در آنمی فقر آهن، با مقدار هموگلوبین در حدود ۱۴-۱۰ gr/dl، تغییرات مرفولوژیکی گلبولهای قرمز، جزئی است، در حالیکه در تالاسمی مایئور، این تغییرات چشمگیرتر است.



۲- سرم: در آنمی فقر آهن سرم بیمار بی‌رنگ است. در حالیکه در تالاسمی مایئور، سرم رنگ زرد طبیعی خود را داراست.

۳- استفاده از روش ریاضی بنام Discriminant Function تا ۹۹٪، این دو آنمی را از یکدیگر متمایز می‌سازد:

A: $DF = MCV - RBC - (5 \times Hb) - 3.4$

مقادیر بالاتر از صفر نمایانگر فقر آهن و مقادیر منفی نمایانگر تالاسمی مایئور می‌باشد.

B: $DF = \frac{MCV}{RBC}$ مقادیر بالاتر از ۱۳ نمایانگر فقر آهن و مقادیر کوچکتر از ۱۳ نمایانگر تالاسمی مایئور است.

## آنمی آپلاستیک (Aplastic Anemia):

آنمی آپلاستیک، نوعی اختلال در سلوله پایه است که با جایگزین بافت خونساز بوسیله چربی (در مغز اسخوان)، و پان سیتوپنی، مشخص می‌شود.

آنمی‌های آپلاستیک را به دو گروه ارثی (آنمی فانکونی که اکثراً در کودکان بروز می‌نماید) و اکتسابی تقسیم می‌نمایند. امروزه معتقدند که دو مکانیسم در ایجاد آنمی آپلاستیک دخالت دارند:

۱- سرکوب ایمنولوژیک خونسازی

۲- آسیب سلولهای پایه مغز استخوان

وجود سلولهای اختصاصی T سرکوبگر[۱۲] و آنتی‌بادیها ضد اریتروپویتین و یا ضد تمایز سلولهای پایه خونساز، در نزد برخی از بیماران، به اثبات رسیده است.

عوامل متعددی در ایجاد آنمی آپلاستیک مؤثرند که از میان آنها می‌توان به داروها، بخصوص کلرامفنیکل و برخی از داروهایی که در درمان لوسمی بکار می‌روند، ترکیبات بنزن و مشتقات آن، DDT، اشعه، مشتقات فلزات سنگین، هپاتیت ویروسی، سل، پانکراتیت، بیمارهای اتوایمیون، و هموگلوبینوری حمله‌ای شبانه، اشاره نمود.

### ◈ علائم بالینی:

ضعف، خستگی، تب و عفونت مکرر، خونریزی از بینی، وجود پتشی در مناطقی از بدن مانند قوزک پا،عدم اسپلنومگالی.

### ◈ یافته‌های آزمایشگاهی:

الف) خون:

آنمی، پان سیتوپنی، دانه‌های بازوفیلیک و گلبولهای قرمز هسته‌دار (که نمایانگر کاهش شدید فعالیت خونسازی در مغز استخوان است)، عدم مشاهده پلی کروماتوفیلی (رتیکولوسیت).

ب) مغز استخوان:

هیپوسلولار به همراه افزایش چربی، مشکل بودن آسپیراسیون (dry tap).

12 - Suppressor T- cells



ج) سایر یافته‌ها:

افزایش مقدار آهن سرم، افزایش سطح اریتروپویتین، در برخی موارد افزاشی هموگلوبین F.

از آنجائیکه پان سیتوپنی، یافته مشترکی بین افراد مبتلا به آنمی آپلاستیک و افراد مبتلا به بیماریهای دیگری از قبیل میلوفیبروز، لوسمی حاد، میلومای مولتیپل، بیماری هوجکین، کالاآزار، مالاریا، سل، کمبود ویتامین $B_{12}$ و اسید فولیک، و هموگلوبینوری حمله‌ای شبانه است، لذا به منظور تشخیص قطعی آنمی آپلاستیک باید به بیوپسی مغز استخوان مبادرت ورزید که در این صورت، وجود چربی زیادتر از حد معمول و فقدان اجزای سلولی مغز استخوان، نمایانگر آنمی آپلاستیک است.

## آنمی سیدروبلاستیک (Sideroblastic Anemias) :

آنمی‌های سیدروبلاستیک، گروهی نامتجانس از اختلالاتی هستند که دارای یافته‌های مشترکی از قبیل: حضور قابل ملاحظه سیدروبلاست‌های حلقوی در مغز استخوان، خونسازی غیر مؤثر، افزایش رسوب آهن در بافتهای مختلف و وجود گلبولهای قرمز هیپوکروم در خون محیطی می‌باشند. احتمالاً نقایص آنزیمی در مراحل انتهایی سنتز هم، مانع از ورود آهن به داخل حلقه پروتروپورفیرین گردیده و علیرغم طبیعی بودن مقدار آهن بدن، سنتز هموگلوبین دستخوش اختلال می‌شود.

آنمی‌های سیدروبلاستیک می‌توانند اکتسابی یا ارثی باشند:

### الف) آنمی سیدروبلاستیک اکتسابی:

شایع‌تر از نوع ارثی است و اغلب در افراد بالاتر از ۵۰ سال مشاهده می‌شود. در حدود ۱۰٪ از افراد مبتلا به این بیماری، سرانجام مبتلا به لوسمی حاد می‌شوند. آنمی سیدروبلاستیک اکتسابی ممکن است در اثر الکلیسم، مسمومیت با سرب، مصرف داروهای ضد سل، و یا مصرف دوزهای بالایی از کلرامفنیکل بروز نماید. این نوع آنمی همچنین ممکن است تظاهر ثانویه‌ای از بیماریهایی مانند: لوسمی، آنمی همولیتیک، اورمی، و بیماریهای التهابی و نئوپلاستیک باشد که در همه این حالات، آنمی، وجود گلبولهای قرمز هیپوکروم در خون محیطی، و تعداد اندکی سیدروبلاست‌های حلقوی در مغز استخوان، مشاهده می‌شود.

### ب) آنمی سیدروبلاستیک ارثی:

این عارضه بصورت صفت مغلوب وابسته به جنس، به ارث می‌رسد و عمدتاً در مردان مشاهده می‌شود. تظاهرات آنمی معمولاً در سنین نوجوانی بروز می‌نماید اگر چه ممکن است بهنگام تولد نیز پدیدار شود.

### ◈ علائم بیماری:

رنگ پریدگی، خستگی، ضعف، بزرگ شدن طحال و کبد، تظاهرات افزایش بار آهن، ظهور پیگمانهای غیر طبیعی در پوست.



### ◈ یافته‌های آزمایشگاهی:

الف) خون:

آنمی نسبتاً شدید بویژه در مردان (HCT=۲۰٪)، گلبولهای قرمز حالت دی‌مرفسیم دارند بدین ترتیب که گروهی نورموسیتیک، نورموکرومیک و گروهی میکروسیتیک، هیپوکرومیک هستند که در حالت اخیر آنیزوسیتوز، پویکیلوسیتوز تارگت سل، و دانه‌های بازوفیلیک نیز مشاهده می‌شوند.

ب) مغز استخوان:

هیپرپلازی ردهٔ اریتروئیدی، در حدود ۱ تا ٤ درصد سیدروبلاست حلقوی، افزایش ذخیره آهن.

ج) سایر یافته‌ها:

افزایش آهن سرم و درصد اشباع ترانسفرین، رسوب آهن در اعضای مختلف بویژه کبد.

## آنمی‌های همولیتیک (Hemolytic Anemias):

آنمی‌های همولیتیک در نتیجه ازدیاد سرعت تخریب گلبولهای قرمز ایجاد می‌شوند. معمولاً مغز استخوان از طریق افزایش تولید خود تا میزان ۸ برابر حالت معمولی، قادر به پاسخگویی جبرانی به این عارضه می‌باشد. بنابراین می‌توان به راحتی نتیجه گرفت که:

۱- پلی کروماتوفیلی (پلی کرومازیا) و افزایش تعداد رتیکولوسیت‌ها در خون محیطی، غالباً از یافته‌های پایدار این نوع آنمی هستند.

۲- چنانچه سرعت تخریب RBC به بیش از ۸ برابر حالت معمولی برسد عوارض آنمی همولیتیک تظاهر خواهند نمود.

در حالت طبیعی، طول عمر گلبولهای قرمز در حدود ۱۲۰ روز است. اما این مدت در آنمی‌های همولیتیک کاهش یافته و حتی ممکن است با توجه به شدت ناهنجاری بوجود آمده در گلبول قرمز، تنها به چند ساعت برسد.

بطور کلی در این بیماریها، گلبولهای قرمز غیر طبیعی، از طریق دو مکانیسم دستخوش تخریب زودرس می‌شوند:

۱- همولیز درون‌رگی[13] ، که در این حالت RBCها در بستر عروق خونی منهدم گردیده و محتویات خود را مستقیماً به داخل پلاسما آزاد می‌نمایند.

۲- همولیز برون‌رگی[14]، که عمدتاً توسط ماکروفاژهای کبد و طحال صورت گرفته و شایعتر از مکانیسم قبلی است.

13 - Intravascular hemolysis
14 - Extravascular hemolysis



عوامل موثر در ایجاد آنمی همولیتیک را به طرق مختلفی طبقه‌بندی نموده‌اند که ترکیبی از آنها در جدول زیر آمده است:

| | |
|---|---|
| اکتسابی | ۱- عوامل خارج گلبولی:<br>الف) اسپلنومگالی<br>ب) آنتی‌بادی (آنمی‌های ایمنوهمولیتیک)<br>ج) تروما (آنمی همولیتیک میکروآنژیوپاتیک)<br>د) اثر مستقیم سموم و داروها (مالاریا، عفونتهای کلستریدیایی)<br>۲- ناهنجاری‌های غشائی:<br>الف) آنمی اسپورسل (آکانتوسیتوز[15])<br>ب) هموگلوبینوری حمله‌ای شبانه |
| ارثی | ج) اسفروسیتوز ارثی<br>۳- عوامل داخل گلبولی:<br>الف) نقایص آنزیمی (کمبود G6PD و پیروات کیناز)<br>ب) نقص در شنت هگزوزمنوفسفات<br>ج) هموگلوبینوپاتی‌ها<br>د) تالاسمی‌ها |

15 - Spur cell Anemia

در مبحث آنمی‌های همولیتیک، برخی اوقات به مثبت یا منفی بودن تست کومبس مستقیم و غیر مستقیم اشاره خواهیم کرد:

این تست ابزار اصلی برای تشخیص آنمی‌های ایمنوهمولیتیک است. در تست کومبس مستقیم، آنتی‌سرمهای ویژه‌ای (آنتی IgG و آنتی $C_3d$) را مستقیماً بروی گلبول قرمز فرد مشکوک می‌ریزند. ایجاد آگلوتیناسیون دلیل بر وجود آنتی‌بادی و کمپلمان فیکس شده بر روی سطح گلبول قرمز است که نتیجه این ترکیب، بیگانه تلقی شدن گلبول مزبور از جانب سلولهای سیستم رتیکولواندوتلیال و در نتیجه، حذف و انهدام آن توسط این سلولهاست.

تست کومبس غیر مستقیم به منظور تجسس آنتی‌بادیهای گرم (که عمدتاً از کلاس IgG هستند)، بر علیه گلبولهای قرمز خود شخص، انجام می‌شود. در این تست سرم شخص مشکوک را با گلبولهای قرمز O مخلوط کرده، و پس از مدت معینی انکوباسیون آنتی سرمهای ویژه‌ای (آنتی IgG) به آن می‌افزایند. در اینحالت نیز ایجاد آگلوتیناسیون، بر مثبت بودن تست دلالت می‌کند.

## آنمی داسی شکل (Sickle cell anemia):

بیماری هموگلوبین S یا آنمی داسی شکل، در اثر جایگزینی اسید آمینه والین به جای اسید گلوتامیک، در موقعیت ششم زنجیرهٔ β بوجود می‌آید. براساس یافته‌های ژنتیکی، این بیماری را به دو دسته هتروزیگوت (Hb S/A و HbStrait) و هموزیگوت (Hb S/S یا آنمی



داسی شکل) تقسیم می‌نمایند. بدین ترتیب که وجود یک ژن هموگلوبین S منجر به ایجاد HbS trait و وجود دو ژن هموگلوبین S منجر به ایجاد بیماری هموگلوبین S یا آنمی داسی شکل می‌شود.

افراد مبتلا به نوع هتروزیگوت در برابر مالاریای فالسیپاروم مقاومند و معمولاً ۶۰٪ هموگلوبین موجود در یک گلبول قرمز آنها از HbA و حدود ۴۰٪ آن از HbS تشکیل گردیده است. در حالت هموزیگوت، حدود ۹۰٪ از هموگلوبین موجود در یک گلبول قرمز از HbS و مقدار کمی نیز از هموگلوبینهای F و $A_2$ تشکیل گردیده است.

در مواقع کاهش فشار اکسیژن، هموگلوبین S بصورت کریستالهایی در داخل گلبول قرمز افراد مبتلا به این بیماری رسوب کرده و منجر به ایجاد اختلال در غشای این سلولها می‌شود. لذا گلبولهای قرمز به هنگام عبور از مجاری کوچک خونی متلاشی گردیده و محتویات خود را به درون خود، آزاد می‌نمایند و یا اینکه موجب انسداد آنها می‌گردند.

تولید هموگلوبین F تا مدتی پس از تولد ادامه می‌یابد و از آنجائیکه هموگلوبین F فاقد زنجیره β است و این بیماری (آنمی داسی شکل) همانگونه که ذکر شد، ناشی از اختلال در زنجیره β می‌باشد، بنابراین عوارض آن به ندرت در نوزادان بروز می‌نماید.

### ◆ علائم بیماری:

درد ناشی از انسداد مجاری کوچک خونی و نکروز بافت تغذیه شونده توسط این مجاری، اختلال در رشد، ناهنجاری‌های استخوانی،

اختلالات سیستم ادراری ـ تناسلی، اسپلنومگالی[16] در کودکان، اتواسپلنکتومی در بزرگسالان، زردی و هپاتومگالی، زخم قوزک پا، آمبولی ریوی، ابتلا به عفونت‌های سالمونلایی.

**◈ یافته‌های آزمایشگاهی:**

الف) خون:

آنمی، همولیز، آنیزوسیتوز، پویکیلوسیتوز، دانه‌های بازوفیلیک، تارگت سل، گلبولهای قرمز هسته‌دار، اجسام هاول ـ ژولی، پلی کروماتوفیلی و افزایش تعداد رتیکولوسیت، لکوسیتوز، وجود سلولهای داسی شکل.

ب) مغز استخوان:

هیپرپلازی ردهٔ اریتروئیدی، افزایش آهن مغز استخوان.

ج) سایر یافته‌ها:

کاهش مقاومت گلبولی، کاهش ESR، کاهش هاپتوگلوبین سرم یا فقدان آن، افزایش آهن سرم، افزایش اوروبیلینوژن ادرار.

ادامه از صفحه ۲۱۵



## هموگلوبینوری حمله‌ای شبانه (PNH):

## Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria:

نوعی اختلال همولیتیکی اکتسابی است که در آن، گلبولهای قرمز بیمار بعلت اشکال در گلیکوپروتئین (DAF)[17] که مانع فعال شدن کمپلمان $C_3$ می‌شود نسبت به ترکیبات پلاسما حساس می‌شوند. در این بیماری همچنین حساسیت گلبولهای سفید و پلاکت‌ها نیز به ثبوت کمپلمان افزایش می‌یابد.

این بیماری معمولاً در بالغین جوان بروز نموده و همولیز مزمن درون عروقی و در شکل کلاسیک آن، هموگلوبینوری متعاقب خواب، مشخصه آن هستند. گاهی PNH منتهی به AML می‌شود.

**◈ علائم بیماری:**

ضعف، زردی پوست، اسپلنومگالی خفیف، ابتلا به بیماریهای عفونی، ترومبوز، هموراژی، درد ناحیه شکم بعلت ترومبوز کبدی، افزایش ناگهانی اندازه کبد، آسیت، سردردهای شدید بعلت ترومبوز عروق کوچک، اشکال در بلع بویژه به هنگام صبح (در این بیماران قدرت انقباض مری در حدود ۱۰ برابر افراد معمولی است که علت آن ناشناخته است).

17 - Decay Accelerating Factor

### ◆ یافته‌های آزمایشگاهی:

الف) خون:

آنمی شدید نورموسیتیک ـ نورموکرومیک، Hb < ٦ gr/dl ، پلی کروما ـ توفیلی، گاهی گلبولهای قرمز هسته‌دار (NRBC) مشاهده می‌شوند، لکوپنی، ترومبوسیتوپنی.

ب) مغز استخوان:

هیپرپلازی نورموبلاستیک، در حدود ۵۰٪ از سلولهای هسته‌دار مغز استخوان را نورموبلاست‌ها تشکیل می‌دهند، کاهش تعداد مگاکاریوسیت نیز مشاهده می‌شود.

ج) سایر یافته‌ها:

پلاسما به رنگ طلایی سوخته در می‌آید که نمایانگر افزایش میزان بیلی روبین غیر مستقیم Hb و مت هم آلبومین می‌باشد. کاهش هاپتوگلوبین سرم، افزایش LDH و SGPT سرم، افزایش اوروبیلینوژن ادرار، هموسیدرینوری، مثبت بودن تست هام و تست شوگر ـ واتر در این بیماری از ارزش تشخیصی خاصی برخوردار است و تست کومبس مستقیم در این بیماران منفی می‌باشد.



## آنمی همولیتیک اتوایمیون (AIHA):

**Autoimmune Hemolytic Anemia:**

گاهی سیستم ایمنی یک فرد بر علیه گلبولهای قرمز خودش آنتی بادیهایی تولید می‌نماید که در نتیجه ثبوت بر روی گلبولها، موجبات لیز آنها را فراهم می‌آورند.

برخی از آنمی‌های همولیتیک اتوایمیون بعلت عمل آنتی‌بادیهای که تمایل آنها برای اتصال به گلبولهای قرمز در ۳۷ °C به حداکثر می‌رسد (آنتی‌بادیهای گرم) و گروهی دیگر تحت اثر آنتی‌بادیهایی که تمایل آنها برای اتصال به گلبولهای قرمز، در ٤ °C به حداکثر می‌رسد (آنتی‌بادیهای سرد)، بروز می‌نمایند. علاوه بر آنچه که ذکر گردید، گاهی نیز آنمی‌های همولیتیک اتوایمیون، عارضه ثانویه‌ای از یک بیماری اولیه (منونوکلئوز عفونی، CLL ، SLE ، مایکوپلاسما پنومونیه) می‌باشند.

بطور کلی علت بیش از نیمی از آنمی‌های همولیتیک اتوایمیون، یک بیماری اولیه، و علت بقیه موارد آنها، ناشناخته است.

## آنمی همولیتیک اتوایمیون وابسته به آنتی بادیهای گرم:

نسبت شیوع این نوع آنمی همولیتیک، در زنان اندکی بیش از مردان است و اکثراً در سنین بالای ٤٠ سال پدید می‌آید. در این بیماری آنتی بادیهایی از کلاس IgG ($IgG_3$ , $IgG_1$) به گلبولهای قرمز

متصل شده و ممکن است باعث ثبوت کمپلمان بر روی RBC گردند. پاکسازی چنین گلبولهای قرمزی عمدتاً در طحال بوقوع می‌پیوندد و چنین بنظر می‌رسد که در صورت عدم ثبوت کمپلمان، گلبولهای قرمز پوشیده شده از آنتی‌بادی، به هنگام عبور از طنابهای بیلروت در طحال، توسط ماکروفاژهایی که در غشای خود دارای رسپتورهایی برای بخش FC آنتی بادی هستند، فاگوسیته می‌شوند. بنابراین با توجه به آنچه که گفته شد، می‌توان به راحتی نتیجه گرفت که در مورد بیمارانی که به درمان با استروئیدها پاسخ نمی‌دهند، اسپلنکتومی باعث افزایش بقای گلبولهای قرمز می‌شود.

### ◈ علائم بالینی:

علائم بالینی با شدت همولیز وابسته است و در نتیجه می‌تواند از یک زردی خفیف تـوأم با اسپلنومگـالی در مـواردی که همولیز کنـد بوده و افزایش تولید مغز استخوان جبران گلبولهای از دست رفته را می‌نماید، تا یک آنمی شدید توأم با علائم قلبی ـ عروقی، در مواردیکه میزان همولیز سریع است، متغیر باشد. ضعف، بدخلقی و تب نیز مشاهده می‌شود.

### ◈ یافته‌های آزمایشگاهی:

الف) خون:

آنیزوسیتوز، پلی کروماتوفیلی (افزایش تعداد رتیکولوسیت)، اسفروسیتوز، گاهی گلبولهای قرمز هسته‌دار، ماکروسیتوز، افزایش سیدروسیت‌ها، افزایش تعداد گلبولهای سفید.



ب) سایر یافته‌ها:

افزایش تست مقاومت گلبولی در طی فاز حاد بیماری، مثبت بودن تست کومبس مستقیم، افزایش بیلی روبین غیر مستقیم سرم در صورتی که بیلیروبین تـام بیش از 4 mg/dl بـاشد، کاهش هاپتوگلوبین سرم.

## آنمی همولیتیک اتوایمیون وابسته به آنتی بادیهای سرد:

در این نوع آنمی همولیتیک، گلبولهای قرمز فرد مبتلا معمولاً توسط IgM پوشیده می‌شود و در این حالت، غالباً ثبوت کمپلمان صورت می‌پذیرد. گاهی نیز همانند آنچه که در بیماری هموگلوبینوری حمله‌ای سرد مشاهده می‌شود، آنتی بادی از نوع IgG به گلبولهای قرمز متصل می‌گردد که توانایی فیکس کمپلمان را دارد. بطور کلی آنتی‌بادیهای سردی که موجب همولیز می‌گردند، در درجه حرارتی که از ٤°C تا کمی پائینتر از درجه حرارت بدن، متغیر است، توانایی اتصال به RBC را دارند. نمونه این درجه حرارتها، درجه حررات‌هایی است که ممکن است در خون گوش، بین، دست، و پا در صورتیکه این اعضاء در معرض سرما قرار بگیرند، بوجود آید. چنانچه ثبوت کمپلمان منجر به فعال شدن کامل سیستم کمپلمان گردد، همولیز درون عروقی صورت می‌گیرد و اگر کمپلمان فعال نشود و یا فعال گردیده و در مراحل میانی متوقف شود، همولیز برون عروقی در کبد از طریق واکنش بین جز $C_3b$ کمپلمان و سلولهای کوپفر کبد که برای این جزء

دارای رسپتور هستند، صورت می‌پذیرد. در اینگونه موارد ممکن است. گلبولهای قرمز بطور کامل فاگوسیته شده و یا بخشهایی از آنها از بین برود که حالت اخیر منجر به تشکیل گلبولهای قرمز شکسته شده و اسفروسیت می‌گردد. بروز این بیماری معمولاً در سنین بالای ۵۰ سال است و نسبت شیوع آنان در زنان بیش از مردان است.

**◆ علائم بالینی:**

در برخی از افراد، کبودی و تغییر رنگ انگشتان دست و پا (آکروسیانوز) و در برخی دیگر عوارض ناشی از همولیز، متعاقب قرار گرفتن در معرض سرما مشاهده می‌شود.

**◆ یافته‌های آزمایشگاهی:**

الف) خون:

آنمی، پلی کروماتوفیلی، آگلوتیناسیون گلبولهای قرمز که می‌بایست از رولکس تشخیص داده شود، اسفروسیتوز، لکوسیتوز خفیف.

## همولیز ناشی از آنتی بادیها:

کم خونی ایمونوهمولیتیک ناشی از آنتی‌بادیهای گرم (از جنس IgG ، بندرت IgA .)

الف) ایدیوپاتیک

ب) لنفومها

پ) لوپوس و سایر بیماریهای کلاژن و اسکولر



ت) داروها

۱- آلفامتیل دوپا

۲- انواع کینیدین (هاپتن ناپایدار)

۳- پنی سیلین (هاپتن پایدار)

ث) عفونتهای ویروسی

کم خونی ایمونو همولیتیک ناشی از انتی بادیهای سرد (از جنس IgM) بندرت IgG (Donath – landsteiner) :

الف) بیماریهای آگلوتینی سرد

۱- حاد: عفونت میکوپلاسمائی، مونونوکلئوز عفونی

۲- مزمن: ایدیوپاتیک، لنفومها

ب) هموگلوبینوری سرد حمله‌ای PNH