دستورکار آزمایشگاه خون‌شناسی

آزمایشگاه رفرانس قم

بهار ۱۳۹۴

دستور کار آزمایشگاه خون‌شناسی

فهرست

مقـــــدمه	۲
ضدانعقادهای هماتولوژی	۴
آزمایشات پایه و شمارش دستی سلول‌ها	۹
آنالیزورهای خون‌شناسی	۲۸
تهیه و رنگ‌آمیزی گستره خون محیطی	۴۶
مورفولوژی سلول‌های خونی	۵۴
آزمایش‌های انعقادی	۸۳
منابع	۹۳

۱

دستور کار آزمایشگاه خون‌شناسی

مقدمه

دستورالعمل استاندارد انجام آزمایش یا SOP[۱]، مدرکی است که چگونگی انجام استاندارد یک فعالیت را تشریح می‌کند. مهمترین هدفی که در تهیه و تنظیم SOP مدنظر قرار می گیرد، تهیه ساختار و قالب ثابت به منظور یکسان سازی کلیه فعالیت ها در آزمایشگاه های تشخیص طبی بوده و به عبارت دیگر، دستورالعمل ها و راهنماهای گام به گام برای انجام یک فعالیت مشخص، به شیوه استاندارد، می‌باشد.

در این دستورالعمل ها، باید روش انجام آزمایش به تفصیل و مرحله به مرحله شرح داده شود، برای هر یک از آزمایش‌هایی که در آزمایشگاه انجام می‌شود، می بایست دستورالعمل‌ها مکتوب گردد. مانند دستورالعمل رنگ‌آمیزی رایت، دستورالعمل اندازه‌گیری هماتوکریت به روش دستی و غیره. این دستورالعمل ها حداقل باید شامل نکات زیر باشند:

۱- نمونه مورد نیاز جهت انجام آزمایش و مقدار آن
۲- معیارهای رد یا قبول نمونه مورد نظر برای آزمایش
۳- محیط، معرف ها، کیت و سایر مواد مصرفی
۴- نحوه قدم به قدم انجام آزمایش
۵- چگونگی کنترل کیفی انجام آزمایش و تفسیر نتایج مربوطه و رفع خطاها

در حوزه هماتولوژی آزمایشگاهی، دستورالعمل‌های استاندارد انجام آزمایش توسط کمیته‌های زیر نگاشته و ابلاغ می شوند:

۱- کمیته بین المللی استانداردسازی در هماتولوژی (ICSH)[۲]
۲- کمیته ملی استانداردسازی آزمایشگاه‌های تشخیص طبی (NCCLS)[۳] که به موسسه استانداردهای آزمایشـــگاه و بالین (CLSI)[۴] تغییر نام داده است.
۳- لایحه ارتقاء آزمایشگاه های تشخیص طبی (CLIA)[۵]

البته لازم به ذکر است که CLSI و CLIA تمامی حوزه‌های مرتبط با آزمایشگاه تشخیص طبی را پشتیبانی می‌کنند و تنها ICSH است که بطور اختصاصی دستورالعمل‌های حوزه هماتولوژی را ساماندهی می‌کند.

[۱] Standard Operating Procedure
[۲] International Council for Standardization in Hematology
[۳] National Committe for Clinical Laboratory Standards
[۴] Clinical and Laboratory Standards Institute
[۵] Clinical Laboratory Improvement Amendment

به تمام فعالیت های لازم برای آنکه از روند آزمایش اطمینان حاصل کرده و آزمایش از کیفیت قابل قبولی برخوردار باشد، تضمین کیفیت[1] می گویند. برنامه QA تمام مراحل ورود نمونه به آزمایشگاه تا امضاء جواب را در بر گرفته و هر وسیله و هر شخصی را در ارتباط با آزمایش، درگیر می‌کند. بنابراین برای اجرای صحیح QA در آزمایشگاه، نیاز به کار گروهی منسجم و هماهنگ بوده و تمامی کارکنان بایستی خود را در انجام آن، مسئول بدانند. متغیرهای تأثیرگذار در برنامه QA عبارتند از:

۱- **متغیرهای پیش از آنالیز**[2]: مانند درخواست آزمایش، آماده سازی بیمار، شناسایی بیمار، نمونه‌گیری، حمل و نقل نمونه، پردازش و آماده سازی نمونه، تقسیم نمونه‌ها، تهیه لیست کاری و ...

۲- **متغیرهای حین آنالیز**[3]: شامل روش انجام آزمایش، کالیبراسیون، ثبت روش‌ها و دستورکارها، کنترل معرف و تجهیزات و ...

۳- **متغیرهای پس از آنالیز**[4]: این متغیرها شامل وارد کردن جواب ها، آماده سازی آنها، امضاء جواب، مقادیر نرمال، بایگانی پاسخ ها، بایگانی مستندات کنترل کیفی و ...

به مرحله تجزیه ای (آنالیز) در تضمین کیفیت، کنترل کیفیت[5] گفته می‌شود. منظور از کنترل کیفی، نظارت بر کیفیت کاری، اطمینان از صحت آزمایش‌های انجام شده و به حداقل رساندن خطاهای سیستماتیک است. به علاوه، فرآیندهای کنترل کیفی دقت و تکرارپذیری پاسخ های آزمایشگاه را تضمین می‌کنند.

[1] Quality Assurance (QA)
[2] Pre analytical variables
[3] Analytical variables
[4] Post analytical variables
[5] Quality Control

۲

دستور کار آزمایشگاه خون‌شناسی

ضدانعقادهای هماتولوژی

جهت شمارش سلول‌های خونی و همچنین ارزیابی مورفولوژیک آنها، در وهله اول بایستی از لخته شدن خون جلوگیری کرد. بطو کلی مکانیسم اثر ضدانعقادها به دو شکل است:

- واکنش با یون کلسیم و رسوب دادن آن (شلاته کردن)[۱]
- فعال کردن برخی آنزیم های آبشار انعقادی مانند آنتی ترومبین III

ضدانعقادهایی که با یون کلسیم واکنش می‌دهند شامل EDTA، سیترات سدیم و اگزالات پتاسیم یا آمونیوم می‌باشند. از دسته دوم ضدانعقادها می‌توان هپارین را نام برد که در واقع ضدانعقاد طبیعی بدن می‌باشد.

اتیلن دی آمین تترا استیک اسید[۲]

ضدانعقاد EDTA بوسیله عمل جذب و شلاته کردن کلسیم یونیزه و حذف آن از محیط پلاسما، عمل ضدانعقادی خود را انجام می دهد. EDTA که با نام های تجاری Versene و Sequestene نیز در بازار وجود دارد، به علت حفظ ساختار و مورفولوژی سلول های خونی، ضدانعقاد انتخابی جهت آزمون CBC محسوب می‌شود. EDTA بهترین ویژگی های یک ضدانعقاد مناسب جهت شمارش سلول‌ها را دارا می‌باشد که این ویژگی ها عبارتند از: پایداری نمونه، امکان نگهداری طولانی مدت نمونه قبل از آنالیز، حداقل تغییرات سلولی و پخش یکنواخت سلول‌ها. نمک های سدیم و پتاسیم آن از ضدانعقادهای قوی به حساب می آیند که علاوه بر خاصیت ضدانعقادی، با پخش یکنواخت سلول ها بر روی گستره خون محیطی، مطالعه مورفولوژی و تخمین شمارش سلولی را تسهیل می کنند.

کمیته های بین المللی ICSH، NCCLS (CLSI) و CLIA، ضدانعقاد K_2-EDTA را جهت آزمون CBC سفارش می کنند. K_2 نسبت به Na_2 از حلالیت بیشتری برخوردار است. تمامی نمک های EDTA هیپراسمولار بوده و موجب چروکیدگی گلبول‌های قرمز و کاهش میکروهماتوکریت می گردند. این مسأله در مورد K_3-EDTA چشمگیرتر بوده و در مورد K_2-EDTA و حتی Na_2-EDTA کمتر رخ می دهد زیرا که pH اسیدی این املاح (K_2 و Na_2) موجب تورم گلبول‌های قرمز و در مقابل، نمک بودن آنها موجب چروکیدگی RBCها می‌شود که این دو پدیده در کنار هم، شرایط متعادلی را بوجود آورده و از چروکیدگی

[۱] Chelating
[۲] Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid (EDTA)

RBC جلوگیری می‌کنند. طبق استاندارد ICSH، نمونه های خون گرفته شده با K_3 بایستی طی ۳ ساعت از نمونه گیری آزمایش شوند که این زمان برای نمونه های گرفته شده با K_2، ۶ ساعت می‌باشد.

مقدار مصرفی K_2-EDTA برابر با ۰/۲۵ ± ۱/۵ میلی گرم به ازاء هر میلی‌لیتر خون است و چنانچه این نسبت افزایش پیدا کند، با افزایش غلظت یونی محیط، باعث جذب آب اریتروسیت‌ها و لکوسیت‌ها و چروکیده و دژنره شدن آنها می‌شود. ضمن اینکه با شکسته و متورم کردن پلاکت‌ها، باعث افزایش کاذب شمارش پلاکتی می‌شود. افزایش EDTA به بیش از ۲ mg/mL خون، باعث کاهش قابل توجه هماتوکریت و MCV و در نتیجه افزایش کاذب در میزان MCHC می‌شود. همچنین این مسأله باعث می‌شود که گستره خون محیطی پس از رنگ‌آمیزی با رنگ های رومانوفسکی، ظاهری قرمز رنگ پیدا کند و نیز ممکن است از رنگ‌آمیزی رتیکولوسیت‌ها جلوگیری بعمل آورده و باعث محو گرانول‌های بازوفیلی منقوط[1] شود. در صورتی که نسبت EDTA کمتر از حد مجاز باشد، منجر به ایجاد لخته های کوچک و میکروترومبوزهای ریز می‌شود.

یکی از معایب EDTA این است که باعث تغییراتی در شکل ظاهری و نیز ساختار پلاکت‌ها شده، ممکن است باعث تجمع پلاکت‌ها[2] و یا ایجاد پدیده اقماری شدن [3] شود و بنابراین در شمارش دستی و دستگاهی پلاکت، با کاهش کاذب آن مواجه خواهیم شد. در صورت مشاهده این پدیده ها در خون حاوی EDTA، نمونه خون در ضدانعقاد سیترات سدیم ۳/۲٪ (با نسبت ۰/۲ میلی‌لیتر ضدانعقاد و ۱/۸ میلی‌لیتر خون) جمع آوری شود. بدلیل اینکه در این حالت خون نسبت به ضدانعقاد EDTA مقداری رقیق تر می‌شود، باید پاسخ بدست آمده از نظر ضریب رقت تصحیح شود. بنابراین نتایج حاصله را در عدد ۱/۱۱ ضرب کنیم. با تغییراتی که EDTA در شکل ظاهری و حجم پلاکت‌ها ایجاد می‌کند، اندازه‌گیری پارامترهایی نظیر MPV و PDW نیز متعاقباً مختل می‌شوند.

نمک EDTA اثر تخریبی بر روی فاکتورهای V و VIII داشته و به همین دلیل در آزمون های انعقادی از سیترات سدیم استفاده می‌شود. پدیده اقماری شدن پلاکتی تنها در حضور EDTA گزارش شده و بهمراه پدیده تجمع، باعث گزارش کاذب ترومبوسیتوپنی در سل‌کانترها می‌شود. برخی افراد دارای آنتی بادی های ضدپلاکتی می‌باشند که این آنتی بادی ها در دمای اتاق و در حضور املاح EDTA فعال شده و با پلاکت‌ها کمپلکس ایمنی می‌دهند. این کمپلکس ها از طریق گیرنده Fc، جذب سطح نوتروفیل‌ها و منوسیت‌ها شده و از این رو پلاکت‌ها در اطراف این سلول‌ها بصورت حلقه در می آیند که به این حالت پدیده اقماری می گویند. پدیده اقماری پلاکت ارزش گزارش برای پزشک ندارد و یکی از عوامل مهم کاهش کاذب پلاکت است. اخیراً در تعدادی از بیماران دارای پدیده اقماری و تجمع پلاکتی، آزمایش‌های مثبت سندروم آنتی فسفولیپید گزارش شده است.

EDTA مهار کننده تست NBT در تشخیص CGD[4] می‌باشد.

سیترات سدیم[5]

سیترات سدیم با اتصال به کلسیم و شلاته کردن آن، عمل ضدانعقادی خود را انجام می دهد. بدلیل پایدار کردن فاکتورهای V و VIII انعقادی، ضدانعقاد سفارش شده برای تست های انعقادی PT و PTT می‌باشد و با نسبت ۱ به ۹ با خون مخلوط می‌شود. سیترات سدیم کارآیی پلاکت‌ها را حفظ کرده و بنابراین جهت بررسی عملکرد پلاکت‌ها مناسب می‌باشد. از آن جایی که باعث تجمع سلولی می‌شود، برای انجام تست CBC مناسب نمی‌باشد. ضمن اینکه مایع بودن سیترات سدیم نیز به جهت رقتی که ایجاد می‌کند، از عوامل نامناسب بودن آن برای شمارش سلول ها می‌باشد.

[1] Basophilic Stippling
[2] Platelet aggregation
[3] Platelet sattelitism
[4] Chronic Granulomatous Disease
[5] Trisodium citrate

در گذشته برای انجام تست های انعقادی PT و PTT در افراد معمولی و آنمیک، از سیترات سدیم ۳/۸٪ و در افراد پلی سیتمیک از سیترات سدیم ۳/۲٪ استفاده می شده است. امروزه ۳/۸٪ بطور کلی منسوخ شده و سیترات سدیم ۳/۲٪ (سیترات دو آبه) بدلیل اسمولاریته مشابه با خون، از استاندارد بالاتری برخوردار است.[۱]

گاهی سیترات در ترکیب با دکستروز (اسید سیترات دکستروز : ACD) نیز مورد استفاده قرار می گیرد که بیشتر برای تست‌های تعیین ابوّت، HLA typing، مطالعات ژنتیکی و PCR کاربرد دارد. نوعی سیترات بنام CTAD نیز وجود دارد که حاوی سیترات، تئوفیلین، آدنوزین و دی پیرادیمول بوده و جهت تست های عملکرد پلاکتی مورد استفاده قرار می گیرد.

سیترات سدیم به عنوان ضدانعقاد در آزمایش ESR نیز استفاده شده که با نسبت ۱ به ۴ با خون مخلوط می‌شود.

اگزالات پتاسیم و اگزالات آمونیوم[۲]

این ضدانعقاد پس از ترکیب با یون کلسیم موجب رسوب و دیونیزه شدن آن شده و از شروع روند انعقاد، تجمع پلاکتی و اتصال فاکتورهای انعقادی به سطح پلاکت‌ها، جلوگیری می‌کند. اگزالات برخلاف EDTA، یون کلسیم را به رسوب غیر محلول تبدیل می‌کند. اگزالات فاکتورهای V و VIII انعقادی را تخریب می‌کند و بنابراین برای آزمایش‌های PT و PTT مناسب نمی‌باشد. در آزمایش‌های ESR، هماتوکریت و شمارش گلبول‌ها می‌توان از این ضدانعقاد استفاده نمود ولی از آنجایی که باعث تغییرات فاحشی در مورفولوژی اریتروسیت‌ها و لکوسیت‌ها می‌شود، جهت ارزیابی های مورفولوژیکی این سلول‌ها مناسب نمی‌باشد.

دوز مصرفی آن ۱-۲ mg/mL می‌باشد. اگزالات ها بصورت ترکیب با سدیم، پتاسیم و آمونیوم بکار گرفته می شوند که در بین آن ها اگزالات پتاسیم و اگزالات آمونیوم از کاربرد بیشتری برخوردار هستند. در بسیاری از موارد هم از ترکیب هر دوی آن‌ها استفاده می‌شود که به ان اگزالات دوبل گفته می‌شود.

هپارین[۳]

موکوپلی ساکارید هپارین، پس از ترکیب با آنتی ترومبینIII (مهارکننده فیزیولوژیک اصلی ترومبین و فاکتور Xa)، آن را غیرفعال کرده و مانع لخته شدن خون می‌شود. در حضور هپارین، سرعت واکنش بین ترومبین و آنتی ترومبینIII حدود ۲۰۰ برابر افزایش می یابد. برای جلوگیری از انعقاد خون، ۲۰-۱۰ واحد، معادل ۰/۲-۰/۱ mg هپارین HMWH [۴] به ازای هر میلی‌لیتر خون استفاده می‌شود.

هپارین تا حدودی قدرت فعالسازی پلاکت‌ها را داشته و بنابراین باعث تجمع پلاکت‌ها و لکوسیت‌ها شده و در نهایت منجر به ایجاد اختلال در شمارش دستی و دستگاهی می‌شود. همچنین هپارین در رنگ آمیزی رتیکولوسیت ایجاد اختلال کرده و باعث کم رنگ شدن آن می‌شود و بنابراین برای شمارش رتیکولوسیت و در کل برای آزمایش CBC نامناسب می‌باشد. در گستره‌هایی که با رنگ‌های رومانوفسکی رنگ‌آمیزی می‌شوند، نباید از این ضدانعقاد استفاده کرد زیرا باعث ایجاد زمینه آبی کم‌رنگ و گرانولار بر روی گستره می‌شود که این حالت در صورت وجود مقادیر بالایی از پروتئین های غیرطبیعی در خون (مانند بیماری مالتیپل میلوما و ماکروگلوبولینمی والدنشتروم) مشهودتر است.

---

[۱] معادل ۱۰۹ mmol/L

[۲] Potassium Oxalate and Ammonium Oxalate

[۳] Heparin

[۴] High Molecular Weight Heparin

هپارین حجم و شکل گلبول های قرمز را تغییر نداده و مانند سیترات محیط نمکی ایجاد نمی‌کند و بنابراین برای کاهش میزان تخریب سلول ها پس از خونگیری مناسب می‌باشد. حفظ شکل گلبول های قرمز و جلوگیری از تخریب آن ها و همچنین عدم تغییر غلظت نمکی محیط، باعث شده تا هپارین ضدانعقاد مناسبی برای آزمایش شکنندگی اسمزی[1] محسوب شود. ضمن اینکه به علت عدم نیاز به مخلوط کردن فیزیکی در مورد هپارین، برای آزمایش های ABG، VBG و NBT استفاده می‌شود.

هپارین با ممانعت از پیوند هورمون های T_3 و T_4 به پروتئین حامل، موجب افزایش فرم آزاد این هورمون ها می‌شود. در آزمایشات مولکولی و PCR نباید از هپارین استفاده کرد زیرا که این ضدانعقاد، بازدارنده آنزیم Taqپلیمراز است. نیمه عمر هپارین ۸-۶ ساعت و کمتر از سایر ضدانعقادها بوده و زودتر خاصیت ضدانعقادی خود را ازدست می دهد، بنابراین برای نگهداری طولانی مدت نمونه ها مناسب نمی‌باشد.

تغییرات سلولی در اثر ماندن خون

هر چه خون بیشتر بماند، شروع به تغییرات مختلف مورفولوژیکی و عملکردی می‌کند و این تغییرات در دمای اتاق به مراتب بیش از تغییرات در دمای یخچال می‌باشد. معمولاً شروع تغییرات از یک ساعت بعد از خونگیری در دمای اتاق آغاز شده و طی ۳ ساعت پس از آن به حالت محسوس و مشخص در می آید و پس از ۱۲ ساعت تغییرات فاحش و حتی تخریب سلولی نمایان می‌شود:

- هسته برخی نوتروفیل‌ها نسبت به سلول‌های تازه بصورت یکنواخت تری رنگ می گیرد. لوب های هسته ممکن است از یکدیگر جدا شده و حاشیه سیتوپلاسم مضرس گردد و یا اینکه واضح و روشن دیده نشود.
- حضور واکوئل در سیتوپلاسم نوتروفیل‌های خون مانده، ممکن است با واکوئل دار بودن سمی[2] نوتروفیل‌ها، که در سپتی سمی ها مشاهده می گردد، اشتباه شود.
- ممکن است در سیتوپلاسم منوسیت‌ها، حفرات کوچکی دیده شود و یا اینکه هسته تحت فشار زیاد، شروع به خرد شدن می‌کند.
- ممکن است ذراتی در سیتوپلاسم لنفوسیت‌ها دیده شود و یا هسته شروع به جوانه زدن کند و در نهایت بصورت دو یا سه لوبه درآید. لوبولاسیون لنفوسیت‌ها در این حالت ممکن است با لنفوم سلول‌های T که در آن هسته بصورت گلبرگ در می آید، اشتباه شود.
- نوتروفیل‌های خون مانده با هسته های فشرده، ممکن است با NRBC اشتباه شوند. بقایای گرانول‌های سیتوپلاسمی نوتروفیل در این حالت باعث تمایز از NRBC می‌شود.
- گلبول‌های قرمز بعد از ۶ ساعت در حرارت ۲۵-۱۸ درجه تحت تأثیر قرار گرفته و گذشت زمان باعث کنگره دار شدن (به شکل اکینوسیت) و کروی گشتن آن ها (به شکل اسفروسیت) می‌شود.
- با گذشت زمان، RBCها متورم شده و میزان MCV بطور کاذب بالا می رود (به ازاء هر ۱۲ ساعت، تا fL ۴-۳ تغییر در MCV).
- تورم گلبول‌های قرمز در اثر ماندن خون، از ایجاد پدیده Rouleax در هنگام آزمایش ESR جلوگیری می‌کند و سرعت رسوب را کاهش می دهد. آزمایش ESR باید تا ۲ ساعت پس از خونگیری انجام شود.
- شکنندگی اسمزی و PT به آرامی افزایش می یابد.
- شمارش WBC و پلاکت، تدریجاً کاهش می یابد و MPV پلاکت افزایش پیدا می‌کند.
- شمارش رتیکولوسیت پس از ۶ ساعت کاهش یافته، ضمن اینکه پس از ۲-۱ روز ماندن خون، NRBCها بالغ گشته و از خون ناپدید می‌شوند.

[1] Osmotic Fragility Test (OFT)
[2] Toxic Vacuolization

- کاهش تعداد سایت های آنتی ژنی بر روی سلول ها و تضعیف واکنش های سرولوژیکی و بانک خون
- کاهش عیار میلوپراکسیداز در لکوسیت‌ها و ایجاد خطا در بررسی ها سیتوشیمی سول ها
- بشرط آلوده نبودن خون، میزان هموگلوبین تا چند روز ثابت و پایدار باقی می ماند.
- نگهداری خون در دمای ۴ درجه سانتیگراد، تغییرات قابل توجهی در MCV و سایر اندکس ها ایجاد نمی‌کند.

بنابراین با توجه به موارد فوق، تهیه هر چه سریعتر گسترش توصیه می‌شود. در گسترش های تهیه شده از خون تازه بدون ضدانعقاد، تجمع پلاکتی مشاهده می‌شود و بنابراین برای کنترل شمارش و یا تخمین تعداد پلاکت‌ها، نمونه مناسبی محسوب نمی‌شود.

اهمیت و تأثیر مخلوط کردن خون قبل از انجام آزمایش و بخصوص زمانی که نمونه از قبل نگهداری شده، باید مورد تأکید قرار بگیرد. آنالیز نمونه سرد، هیستوگرام های ناهنجار ایجاد می‌کند و از این رو بایستی نمونه خون ابتدا به دمای اتاق برسد و سپس آنالیز شود. برای آنالیز نمونه‌هایی که دارای آگلوتینین سرد هستند، نخست باید خون را به دمای ۳۷ درجه رساند و سپس به آنالیزور داد.

۳

دستور کار آزمایشگاه خون‌شناسی

آزمایشات پایه و شمارش دستی سلول‌ها

بطور معمول در یکسری آزمایشات درخواستی توسط پزشک، بندرت ممکن است به آزمایش CBC[۱] برنخوریم. همانگونه که از نامش پیداست، بمعنی شمارش تمام سلول‌ها، تعیین درصد لکوسیت‌ها، اندازه‌گیری هموگلوبین و هماتوکریت و تعیین تمام اندکس های گلبول قرمز می‌باشد. تمامی موارد ذکر شده، امروزه توسط دستگاه‌های سل‌کانتر بطور اتوماتیک شمارش و اندازه‌گیری می‌شوند. با این وجود آگاهی از روش‌های دستی انجام آزمایشات و همچنین آشنایی با محدودیت های این روش‌ها برای هر تکنولوژیست آزمایشگاهی، امری ضروری می‌باشد. ضمن اینکه شمارش سلول‌ها در مایعات بدن به روش اتوماتیک نیاز به دستگاه‌های پیشرفته و گران قیمت دارد و بنابراین در اکثر مراکز تشخیصی، از روش‌های دستی برای شمارش گلبول‌های قرمز و سفید در مایعات بدن استفاده می‌شود.

شمارش دستی سلول‌های خونی

شمارش گلبول‌های سفید به روش دستی، جایگزین مناسبی برای دستگاه‌های سل‌کانتر می‌باشد ولی برای شمارش گلبول‌های قرمز و پلاکت‌ها کاربرد چندانی نداشته و ممکن است با خطای بالا همراه باشد. زیرا که در شرایط معمول در آزمایشگاه برای شمارش دستی، حدود ۴۰۰ گلبول قرمز شمارش شده که موجب عدم دقت بالا در شمارش این سلول‌ها خواهد شد.
روش پیشنهادی برای شمارش دستی سلول‌های خونی، استفاده از لام هموسیتومتر[۲] (نئوبار اصلاح شده[۳]) می‌باشد. علت این امر این است که سلول‌ها بصورت واقعی مشاهده شده و تفکیک آنها از ذرات گرد و غبار و غیرسلولی، امکان پذیر بوده و این ذرات دیگر به عنوان سلول شمارش نمی‌شوند.

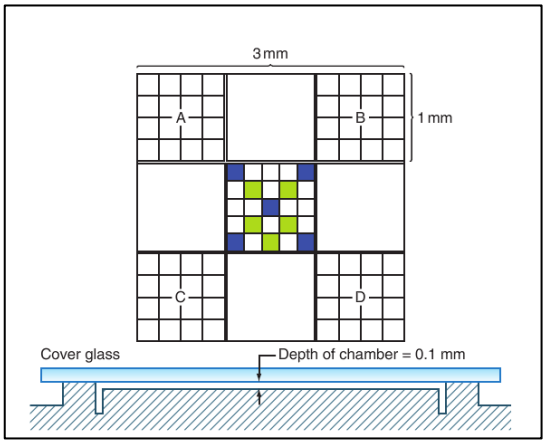
لام نئوبار معروف ترین، دقیق ترین و متداول ترین لام هماسیتومتر می‌باشد. این لام، حالت دو طرفه داشته و در هر سمت آن یک محفظه شمارش سلولی به شکل مکعب مربع و به ابعاد ۰/۱ mm × ۳ × ۳ وجود دارد. این محفظه خود به یک مربع ۳ × ۳ با مجموع ۹ مربع به ابعاد ۱×۱mm و عمق ۰/۱mm تقسیم می‌شود که بعد از گذاشتن لامل سنگی، حجم یک مربع آن به $0/1mm^3$ می رسد. به چهار مربع گوشه، مربع های WBC و به مربع وسط، مربع RBC گفته می‌شود. جهت سهولت در

[۱] Complete Blood Count
[۲] Hemocytometer
[۳] Improved Neubauer counting chamber

شمارش سلول ها، هر کدام از ۹ مربع به ۱۶ مربع مساوی تقسیم می شوند که حجم هر کدام معادل mm^3 ۰/۰۰۶۲۵ می‌باشد (۰/۲۵×۰/۲۵×۰/۱).

در لام نئوبار اصلاح شده، ناحیه مرکزی یا همان مربع RBC، به ۲۵ مربع مساوی تقسیم شده است. یعنی هر ضلع مربع میانی که ۱mm می‌باشد، به ۵ قسمت تقسیم شده و بنابراین طول هرکدام ۰/۲mm و حجم هر یک از آن ها، mm^3 ۰/۰۰۴=۰/۱×۰/۲×۰/۲ خواهد بود. هر کدام از این ۲۵ مربع نیز به ۱۶ مربع دیگر تقسیم می شوند. در نهایت مربع میانی دارای ۴۰۰ مربع کوچک خواهد بود که طول هر کدام، ۰/۰۵mm و حجم هر یک از آن ها، mm^3 ۰/۰۰۰۲۵ خواهد بود.

بدلیل غلظت بالای سلول های خونی (علی الخصوص گلبول های قرمز) مهمترین مرحله در شمارش سلول ها، رقیق کردن دقیق آن ها می‌باشد. ملانژور یا Thoma، ابزار حجمی دقیقی جهت برداشت حجم مشخصی از خون و رقیق کننده و مخلوط کردن آن ها در درون خود، می‌باشد. امروزه در بیشتر آزمایشگاه ها، از سمپلر (میکروپی پیت) استفاده می‌شود که قابلیت برداشت حجم های بسیار کم ۱-۲ µL را داشته و در صورت کالیبر بودن، نتایج قابل قبولی را به ما ارائه می دهد.



شکل ۱-۳: تصویری از خط کشی لام نئوبار اصلاح شده. این طرح روی هر طرف هماسیتومتر حک شده است.

از مربع های بزرگ گوشه ای (A و B و C و D) جهت شمارش گلبول‌های سفید استفاده می‌شود. از پنج مربع آبی در مرکز، جهت شمارش گلبول‌های قرمز یا پلاکت‌ها، و از ۱۰ مربع سبز+آبی جهت شمارش پلاکت‌ها استفاده می‌شود. در واقع هر یک از ۲۵ مربع در یک میلی‌متر مربع مرکزی، در درون خود ۱۶ مربع کوچکتر جهت تسهیل شمارش دارند. شکل پایین، نمای کناری محفظه شمارش همراه با پوشش شیشه ای روی آن را نشان می دهد.

شمارش سلول‌ها بصورت غلظت یا تعداد سلول‌ها در واحد حجم بیان می‌شود. از آنجا که محفظه هموسیتومتر ابعاد خطی دارد، واحد حجم بصورت mm^3 گزارش می‌شود. اگرچه هماهنگی در متون پزشکی در مورد استفاده از واحدهای مرسوم در برابر استفاده از سیستم بین المللی واحدها (SI) وجود ندارد، ولی ICSH توصیه می‌کند واحد حجم بصورت لیتر گزارش شود:

RBCs:	$5\times10^6/mm^3 = 5\times10^6/\mu L = \mathbf{5\times10^{12}/L}$
WBCs:	$7\times10^3/mm^3 = 7\times10^3/\mu L = \mathbf{7\times10^9/L}$
PLTs:	$300\times10^3/mm^3 = 300\times10^3/\mu L = \mathbf{300\times10^9/L}$

هموسیتومتر و لامل سنگی پس از هر بار استفاده باید بلافاصله با آب گرم شسته شده و با پارچه تمیز بدون پرز، پاک و در هوا خشک شود. سطح این لام نباید با گاز یا پارچه زبر تماس داده شود، زیرا باعث خراشیدگی خطوط روی لام می‌شود.

لازم به ذکر است که شمارش دستی با هموسیتومتر دارای خطا می‌باشد که می‌توان با تکرار حداقل ۳ باره آزمایش، میزان خطا را تا حدود بالایی کاهش داد.

شمارش گلبول های قرمز

برای شمارش گلبول های قرمز، از محلول هایی استفاده می‌شود که هم خاصیت ایزوتونیک و هم خاصیت رقیق کنندگی داشته باشند. این محلول ها منجر به لیز سلول های خونی نمی شوند. محلول های مورد استفاده برای شمارش دستی گلبول های قرمز عبارتند از:

محلول Hyme		محلول Gower		محلول Toison	
سولفات سدیم	۵ گرم	سولفات سدیم	۱۲/۵ گرم	سولفات سدیم	۸ گرم
کلرورجیوه(مرکوریک)	۰/۵ گرم	اسیداستیک گلاسیال	۳۳/۳ mL	کلرورجیوه(مرکوریک)	۰/۵ گرم
کلرور سدیم	۱ گرم	آب مقطر	۲۰۰ mL	گلیسرول	۳۰ mL
آب مقطر	۲۰۰ mL			آب مقطر	۱۶۰ mL

در برخی موارد مانند هایپرگاماگلوبولینمی، استفاده از محلول **هایم** باعث رسوب پروتئین، ایجاد رولو و آگلوتیناسیون RBC می‌شود. در این گونه موارد، استفاده از محلول گاور توصیه می‌شود زیرا که اسیداستیک موجود در آن، از ایجاد رولو و همچنین آگلوتیناسیون گلبول های قرمز، جلوگیری می‌کند. بجز محلول های فوق، محلول ابداعی لوئیس–دیسی (LD) نیز وجود دارد که از ۱ mL فرمالین، ۹۹ mL سیترات سدیم ۳٪ و ۹۰۰ mL آب مقطر تشکیل شده است. این محلول بایستی دور از نور آفتاب و در شیشه های قهوه ای رنگ نگهداری شود. به علت وجود فرمالین، نیازی به استریل کردن ندارد. طول عمر مفید این محلول، سه هفته بوده و استفاده بیش از این مدت با نتایج مطلوبی همراه نخواهد بود.

RBCها در محلول LD حالت مقعرالطرفین خود را حفظ کرده و خودبخود آگلوتینه نمی شوند. همچنین این محلول باعث می‌شود تا سلول ها به هم متصل نشده و تا چند ساعت پس از رقیق کردن خون با آن، سوسپانسیون سلولی پایدار بوده و RBCهای آن سالم باقی می مانند.

در صورتی که بیمار مبتلا به اتوآگلوتیناسیون و یا آگلوتیناسیون سرد باشد، بهتر است محلول رقیق کننده بدون فرمالین استفاده کنیم، زیرا که خود فرمالین باعث تثبیت ذرات آگلوتینه شده و حتی با مخلوط کردن سوسپانسیون از هم جدا نمی شوند.

نحوه شمارش

در صورت استفاده از ملانژور قرمز جهت شمارش گلبول های قرمز، خون EDTAدار را تا درجه ۰/۵ ملانژور کشیده، اطراف نوک ملانژور را با پنبه یا گاز تمیز پاک کرده، درون محلول رقیق کننده قرار داده و تا درجه ۱۰۱ آن را پر می کنیم. رقت بدست آمده ۱/۲۰۰ خواهد بود.

لامل سنگی را بر روی لام نئوبار قرار داده و قطره کوچکی از سوسپانسیون تهیه شده را بین لام و لامل قرار می دهیم. سوسپانسیون طبق خاصیت موئینه در بین لام و لامل پخش می‌شود. ۵ دقیقه فرصت می دهیم تا تمامی سلول های سوسپانسیون در یک سطح قرار بگیرند. عمل پر کردن چمبر بایستی یکباره و در یک نوبت صورت بگیرد. از پر کردن بیش از اندازه محفظه شمارش و همچنین ایجاد حباب جلوگیری شود.

برای شمارش از مربع وسط که بهترین انتشار سلولی را دارد، استفاده می کنیم. نحوه شمارش نیز به این صورت است که در مربع وسط، سلول های موجود در چهار مربع کناری و همچنین مربع مرکزی را شمارش کرده که در واقع یک پنجم کل مساحت مربع وسط را شامل می‌شود (۸۰ مربع از ۴۰۰ مربع). بنابراین نتیجه حاصله را در عدد ۵ ضرب کرده و به عنوان شمارش سلول

های یک مربع mm^3 ۱×۱×۰/۱ در نظر می گیریم. با دخالت دادن میزان رقت سوسپانیون (۱/۲۰۰) و همچنین عمق محفظه شمارش (۰/۱ mm)، نتیجه نهایی از طریق زیر محاسبه خواهد شد:

$$\frac{N}{\frac{1}{5}\times\frac{1}{10}\times\frac{1}{200}}$$

به عبارت ساده تر:

فاکتور رقت × فاکتور عمق × ۵ × تعداد سلول های ۵ مربع وسط = تعداد RBC در هر میکرولیتر

معمولاً فاکتور رقت و فاکتور عمق برای همه یکسان بوده و بنابراین می توان فرمول فوق را در نهایت به این شکل ساده نمود:

RBCs/µL = N×10000

لازم به ذکر است که در افراد آنمیک، از رقت ۱/۱۰۰ برای شمارش گلبول های قرمز استفاده می‌شود.

منابع خطا

خطاها ممکن است بخاطر ماهیت نمونه، تکنیک فرد انجام دهنده و تجهیزات غیردقیق باشد. خطاهای مربوط به توزیع سلول‌ها در هموسیتومتر، خطاهای میدان[1] نامیده می‌شوند که با شمارش تعداد سلول‌های بیشتر، می‌توان این نوع خطا را کاهش داد.

- خطاهای ناشی از ماهیت نمونه: وجود لخته های ریز در نمونه، بخاطر تغییراتی که در توزیع سلول‌ها یا کاهش تعداد آنها ایجاد می‌کند، سبب خطا می‌شوند. همچنین مخلوط نکردن کافی خون پیش از تهیه رقت و همچنین پس از تهیه رقت با مارکانو موجب خطا شده که میان آن به درجه رسوب سلول ها بستگی دارد.
- خطاهای ناشی از فرد انجام دهنده: شامل خطا در رقیق کردن، پر کردن محفظه شمارش و زمان شمارش می‌باشند.
- خطاهای مربوط به تجهیزات: استفاده از تجهیزات غیراستاندارد، هموسیتومتر خش دار و غیره
- خطاهای ذاتی یا خطای میدانی: که ناشی از توزیع نامناسب سلول‌ها در مربع های شمارش هموسیتومتر است. همانگونه که قبلاً ذکر شد، با شمارش تعداد بیشتری سلول، می‌توان این خطا را کاهش داد.
- لکوسیتوز شدید

شمارش دستی گلبول های سفید

در این جا برخلاف شمارش دستی گلبول های قرمز که از محلول های رقیق کننده استفاده می شده، به علت تعداد بسیار زیاد گلبول های قرمز در مقایسه با گلبول های سفید، از محلول های لیز کننده استفاده می کنیم. دو محلول عمده مورد استفاده عبارتند از:

محلول تورک	
اسیداستیک گلاسیال	۳ mL
کریستال ویوله ۱٪	۱ mL
آب مقطر	۱۰۰ mL

محلول مارکانو	
اسیداستیک گلاسیال	۱۱ mL
بلودومتیلن	۵۰ mg
آب مقطر	۲۰۰ mL

[1] Field errors

این محلول ها باعث لیز گلبول های قرمز و رسوب لاشه سلولی آن ها در کنار پلاکت‌ها شده و در نتیجه یک سوسپانسیون خالص از گلبول های سفید ایجاد می‌شود. به این محلول ها، رنگ کریستال ویوله و یا بلودومتیلن نیز اضافه می‌شود تا دیدن هسته سلول ها آسان تر شود. کریستال ویوله باعث ایجاد رنگ آبی روشن در محلول شمارش می‌شود.

جهت شمارش گلبول های سفید، خون را تا خط ۰/۵ ملانژور سفید کشیده و محلول رقیق کننده را تا خط ۱۱ ملانژور پر می کنیم. رقت بدست آمده ۱/۲۰ خواهد بود. در صورت لکوپنی از رقت ۱/۱۰ (ملانژور سفید، خون تا خط ۱ و محلول تا خط ۱۱) و در صورت لکوسیتوز از رقت ۱/۱۰۰ (ملانژور قرمز، خون تا خط ۱ و محلول تا خط ۱۰۱) استفاده می کنیم.
پس از پر کردن محفظه شمارش لام نئوبار، عملیات شمارش را در چهار مربع بزرگ کناری آغاز می کنیم. فرمول نهایی محاسبه تعداد گلبول های سفید به صورت زیر خواهد بود:
فاکتور رقت (۲۰) × فاکتور عمق (۱۰) × میانگین سلول های شمارش شده = تعداد گلبول های سفید در هر میکرولیتر

به عبارت ساده تر:
۲۰۰× میانگین شمارش شده = تعداد گلبول های سفید در هر میکرولیتر

و در صورتی که به جای میانگین، از مجموع شمارش سلول ها استفاده شود: $\mathbf{WBCs/\mu L = N \times 50}$

منابع خطا همانند شمارش دستی گلبول های قرمز می‌باشد.
لازم به ذکر است که NRBCها با محلول مارکانو لیز نمی‌شوند و در هموسیتومتر با بزرگنمایی مربوط به شمارش لکوسیت‌ها، از WBCها قابل افتراق نیستند. بنابراین در هنگام شمارش افتراقی گلبول‌های سفید از روی گستره رنگ‌آمیزی شده، میزان شمارش گلبول‌های سفید باید تصحیح شود: $\text{Corrected WBC} = \frac{\text{WBC}\times 100}{100+\text{NRBC}}$

شمارش دستی پلاکت‌ها

برای شمارش دستی پلاکت‌ها از محلول ۱٪ اگزالات آمونیوم[1] استفاده می‌شود (۱/۱ g اگزالات آمونیوم در ۱۰۰ mL آب مقطر). این محلول موجب تخریب گلبول های قرمز و سفید شده و در صورت پایین بردن کندانسور میکروسکوپ، پلاکت‌های رقیق شده با اگزالات آمونیوم به صورت ذرات کوچک درخشان دیده خواهند شد. محلول اگزالات آمونیوم تکه های غشای گلبولی را از بین نمی برد و ممکن است این لاشه های سلولی در زیر میکروسکوپ با پلاکت اشتباه شوند. از آنجایی که پلاکت‌ها ساختاری گرانولار، درخشش ارغوانی و ظاهری گرد تا دندریتیک دارند، بنابراین با کمی مهارت می توان آن ها را از لاشه های سلولی تفکیک داد.
محلول اگزالات آمونیوم به مدت طولانی پایدار نبوده و در صورت نگهداری طولانی مدت، احتمال آلوده شدن آن با ذرات گرد و غبار و باکتری نیز وجود دارد. بنابراین در هر نوبت، بایستی به میزان مصرف چند روزه ساخته شود تا این محلول همواره تازه ساخت باشد. باکتری ها به راحتی قادر به رشد در درون محلول اگزالات آمونیوم بوده و جالب اینکه همانند پلاکت‌ها درخشش دارند. از این رو بعد از تهیه محلول رقیق کننده، آن را با میکروفیلترهای مخصوص ۰/۲۲µ پالایش نموده و در ۴ درجه نگهداری می کنیم. این فیلترها با حذف تمامی باکتری ها و گرد و غبار، حتی باعث استریلیزاسیون میکروبی محلول اگزالات نیز می شوند.

[1] به محلول بریکر-کرانکیت نیز معروف است.

نحوه شمارش

همانند RBC، از ملانژور قرمز برای رقیق سازی و شمارش پلاکت استفاده می کنیم. خون را تا درجه ۱ و محلول اگزالات آمونیوم را تا درجه ۱۰۱ ملانژور پر می کنیم. رقت بدست آمده ۱/۱۰۰ خواهد بود. پس از پر کردن محفظه شمارش، لام نئوبار را به مدت ۲۰–۱۵ دقیقه در مکانی ساکن قرار می دهیم تا پلاکت‌ها در چامبر بالا آمده و با اتصال به سطح تحتانی لامل سنگی، همگی در یک سطح قرار بگیرند. از آنجایی که این فرآیند طولانی بوده و ممکن است سوسپانسیون بین لام و لامل تبخیر شود، لام نئوبار را در یک پتری دیش حاوی پنبه مرطوب قرار می دهند تا شرایط تبخیر به حداقل خود برسد. همانند شمارش گلبول های قرمز، شمارش پلاکت نیز در ۵ مربع از مربع بزرگ میانی لام نئوبار صورت می گیرد (چهار مربع کوچک کناری و مربع مرکزی). سپس:

فاکتور رقت (۱۰۰) × فاکتور عمق (۱۰) × ۵ × مجموع پلاکت شمارش شده = تعداد پلاکت در هر میکرولیتر

و بطور خلاصه: **Platelet/µL = N×5000**

در برخی از کتب مرجع، شمارش پلاکت در دو طرف لام نئوبار و در مجموع در ۱۰ مربع توصیه می‌شود که در این صورت میزان شمارش شده را بایستی در عدد ۲۵۰۰ ضرب نمود. در صورتی که تعداد پلاکت‌ها در کل مربع بزرگ مرکزی شمارش شود، تعداد شمارش شده را در عدد ۱۰۰۰ ضرب خواهیم کرد.

برای حذف خطای میدان، شمارش حداقل ۱۰۰ پلاکت الزامی می‌باشد. چنانچه تعداد شمارش شده کمتر از ۱۰۰ عدد باشد، مربع های بیشتری باید شمارش شوند، برای مثال ۲۵ خانه کوچک در یک طرف یا دو طرف چامبر. چنانچه باز هم تعداد شمارش شده در ۵۰ مربع، کمتر از ۱۰۰ باشد، نمونه ۱/۱۰ یا ۱/۲۰ رقیق می‌شود. مقدار CV برای مجموع خطاهای میدان، پیپتینگ و خطای چامبر، برای شمارش حداقل ۱۰۰ پلاکت، ۱۱٪ می‌باشد.

تخمین شمارش سلول‌ها از روی گستره خون محیطی

برای تخمین شمارش گلبول‌های سفید و پلاکت‌ها از روی لام، به گستره ای با پخش منظم سلول‌ها در خون EDTAدار نیاز است.

برای شمارش تقریبی پلاکت، ۱۰ میدان با عدسی ۱۰۰ (Oil immersion) در مناطقی که پخش یکنواخت گلبول قرمز وجود دارد، انتخاب کرده و پلاکت‌های هر میدان را شمرده و میانگین بدست آمده را در عدد ۲۰۰۰۰ ضرب می‌کنیم. انتخاب میدان ها براساس شمارش گلبول قرمز بیمار صورت می گیرد. بطور مثال اگر شمارش گلبول قرمز بیمار ۶ میلیون در میلی‌متر مکعب باشد، شمارش پلاکتی در میدان های ۳۰۰ تایی و اگر ۵ میلیون باشد، در میدان های ۲۵۰ تایی و اگر ۴ میلیون باشد، در میدان های ۲۰۰ تایی صورت می گیرد تا ضریب ۲۰۰۰۰ تعداد را در میلی‌متر مکعب محاسبه کند.

برای تخمین شمارش گلبول‌های سفید، میانگین شمارش گلبول‌های سفید در ۱۰ میدان با عدسی ۴۰ که در آن پخش یکنواخت گلبول‌های قرمز وجود دارد، را محاسبه کرده و حاصل در عدد ۲۰۰۰–۱۵۰۰ ضرب می‌شود.

شمارش رتیکولوسیت[1]

رتیکولوسیت‌ها، گلبول‌های قرمز بدون هسته و نارسی بوده که دارای اسید ریبونوکلئیک (RNA) می‌باشند. nRBC در مرحله اورتوکرومیک با بیرون راندن هسته به رتیکولوسیت تبدیل می‌شود. این سلول‌ها در شرایط طبیعی، ۳–۲ روز در مغزاستخوان باقی مانده، یک روز هم در جریان خون هستند و پس از آن به گلبول قرمز بالغ تبدیل می‌شوند. بقایای RNA سیتوپلاسمی و ارگانل

[1] Reticulocyte count

هایی مانند ریبوزوم و میتوکندری در رتیکولوسیت دیده می‌شود. حدود ۲۰٪ هموگلوبین در این مرحله سنتز می‌شود. از شمارش رتیکولوسیت‌ها برای تعیین فعالیت سنتز گلبول‌های قرمز در مغز استخوان استفاده می‌شود و بنابراین شمارش آنها تخمینی خواهد بود از سرعت تولید گلبول‌های قرمز و نه تخریب آن ها.

نحوه انجام آزمایش

خون کامل EDTA دار با یکی از رنگ های حیاتی مانند نیومتیلن بلو[1] یا بریلیانت کرزیل بلو[2] مجاور می‌شود. برای تهیه این رنگ ها، یک گرم از آنها را در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفاته (PBS) با pH=7.4 حل کرده و در ظروف تیره و در دمای یخچال نگهداری کنید. رنگ ساخته شده در دمای یخچال به مدت یکماه قابل نگهداری است. دقت شود که قبل از استفاده از رنگ، آن را بوسیله کاغذ واتمن شماره یک، فیلتر کنید.

حجم های مساوی از خون را با یکی از رنگ های حیاتی مخلوط کرده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید. رنگ های حیاتی با عبور از غشاء گلبول‌های قرمز در حالت زنده، روی ریبوزوم ها و رشته‌های RNA موجود در رتیکولوسیت‌ها رسوب کرده و آن ها را به رنگ آبی سیر بصورت رسوبی از گرانول یا فیلامنت، قابل مشاهده می سازد.

دو لام تهیه کرده و پس از خشک شدن، با استفاده از عدسی روغنی، به شمارش رتیکولوسیت‌ها در مناطقی که پخش یکنواختی از سلول‌ها وجود دارد، می پردازیم. گلبول‌های قرمز آبی کمرنگ یا آبی متمایل به سبز و رتیکولوسیت‌ها آبی کمرنگ به همراه موارد رشته ای یا گرانولار به رنگ آبی تیره دیده می‌شوند. حداقل ۱۰۰۰ گلبول (گلبول قرمز و رتیکولوسیت) شمارش می‌شود و سپس درصد رتیکولوسیت‌ها را محاسبه می‌کنیم. برای مثال اگر ۱۵ رتیکولوسیت در بین ۱۰۰۰ گلبول شمارش شوند، شمارش رتیکولوسیت ۱/۵٪ خواهد بود. برای افزایش دقت، فرد دیگری، اسلاید دیگری از همان بیمار را بررسی کند که اختلاف جواب ها در محدوده ۲۰٪ قابل قبول خواهد بود.

با قرار دادن دیسک میلر در قسمت عدسی چشمی، دو مربع در میدان دید ظاهر می‌شوند که یک مربع نه برابر مربع دیگر بوده و از این طریق، برآورد سریعی از تعداد گلبول‌های قرمز امکان پذیر می‌شود. در میدان‌های میکروسکوپی پشت سر هم، رتیکولوسیت‌ها را در مربع بزرگ و گلبول‌های قرمز را در مربع کوچک شمارش می‌کنند:

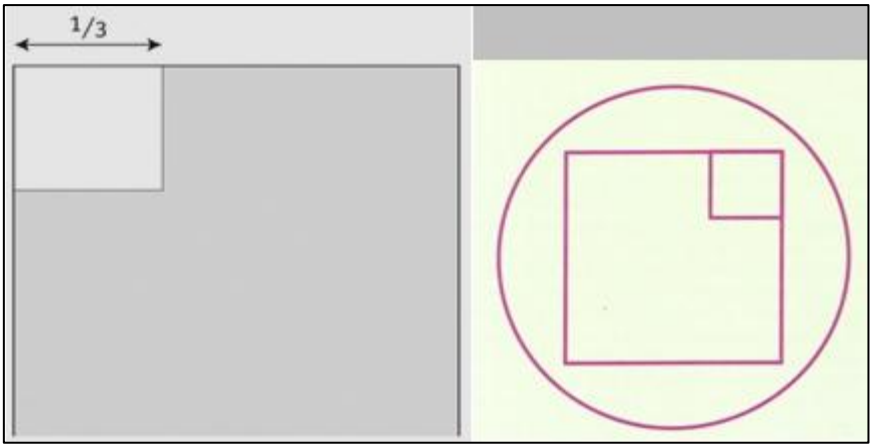
$$\text{٪ رتیکولوسیت} = \frac{\text{تعداد رتیکولوسیتها در مربع بزرگ}}{\text{تعداد گلبولهای قرمز در مربع کوچک} \times 9} \times 100$$

برای مثال، اگر ۱۵۰ عدد RBC در چند میدان با پخش یکنواخت در مربع کوچک شمرده شده باشند و تعداد رتیکولوسیت‌های شمارش شده در مربع بزرگ، ۴۰ عدد باشد:

$$\% \text{ Retic} = \frac{40}{150 \times 9} \times 100 = 3\%$$

برای حصول اطمینان بیشتر، بهتر است حداقل ۳۰۰ گلبول قرمز در مربع کوچک شمارش شود. در اینصورت درصد رتیکولوسیت‌ها در بین حدود ۲۷۰۰ گلبول قرمز محاسبه شده و برآورد مناسب تری را منجر می‌شود.

[1] New methylene blue
[2] Brilliant cresyl blue



شکل ۲-۳: دیسک میلر در عدسی چشمی قرار می گیرد. مربع کوچک برای شمارش گلبول‌های قرمز و تمام مربع بزرگ برای شمارش رتیکولوسیت‌ها استفاده می‌شود.

شمارش مطلق رتیکولوسیت‌ها[1]

تعداد رتیکولوسیت‌ها در یک لیتر خون کامل را شمارش مطلق رتیکولوسیت می گویند.

$$\text{ARC} = \frac{\%\text{Retic count} \times \text{RBC count}}{100}$$

میزان طبیعی رتیکولوسیت در بزرگسالان ۱/۵-۰/۵٪ بوده و بنابراین شمارش مطلق طبیعی در بزرگسالان، $۲۵-۷۵\times۱۰^{۹}/L$ می‌باشد. میزان رتیکولوسیت در نوزادان شیرخوار ۶/۵-۲/۵٪ بوده که تا اواخر هفته دوم زندگی، تا دامنه مرجع بزرگسالان، افت می کند.

اندکس تولید روزانه رتیکولوسیت[2]

رتیکولوسیت‌هایی که بصورت نارس از مغز استخوان به خون محیطی وارد می‌شوند، به عنوان رتیکولوسیت‌های تحت استرس[3] شناخته می‌شوند. رتیکولوسیت‌های تحت استرس، بجای اینکه در مدت ۱ روز در خون محیطی رشته‌های خود را از دست بدهند، این کار را در مدت ۴-۲ روز انجام می‌دهند، زیرا که زودتر از موعد مقرر وارد خون شده اند.

چنانچه در لام خون محیطی بیمار، سلول‌های پلی کرومازی یا گلبول‌های قرمز هسته دار در پاسخ به کم‌خونی شدید یافت شود، بایستی برای ارزیابی فعالیت روزانه مغزاستخوان فرد بیمار نسبت به شخص سالم، از اندکس RPI استفاده شود.

هنگامی که رتیکولوسیت بسیار نارس (آکنده از رشته‌های ریبوزم و ریبونوکلئیک اسید) بر اثر تحریک هورمونی از مغز استخوان وارد خون محیطی می‌شود، نسبت به حالت نرمال به زمان زیادتری برای بالغ شدن نیاز دارد. زمان بلوغ برای فردی با هماتوکریت ۴۵٪ ، یک روز است و هر ۱۰٪ که از میزان هماتوکریت کم شود، نصف روز به زمان بلوغ[4] اضافه می‌شود:

%HCT	40-45	35-39	25-34	15-24	<15
Maturation Time	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0

با توجه به جدول بالا، شاخص تولید رتیکولوسیت از طریق فرمول زیر محاسبه می‌شود:

$$\text{RPI} = \frac{\%\text{Retic (Patient)} \times \text{HCT(Patient)}}{\text{HCT (Normal)} \times \text{MT}}$$

[1] Absolute Reticulocyte Count (ARC)
[2] Reticulocyte Production Index (RPI)
[3] Shift Reticulocyte
[4] Maturation Time (MT)

برای مثال، چنانچه درصد شمارش رتیکولوسیت فردی، ۷/۸٪ و هماتوکریت وی ۳۰٪ باشد:

$$RPI = \frac{7.8 \times 30}{45 \times 2} = 2.6$$

عدد بدست آمده بدین مفهوم است که مغز استخوان این بیمار، ۲/۶ برابر فرد نرمال فعالیت اریتروپوئز دارد.

از آنجایی که تعداد کمی از رتیکولوسیت‌های واقعی شمارش می‌شوند، خطای نمونه برداری در شمارش دستی رتیکولوسیت‌ها تا اندازه ای زیاد است. حدود اطمینان ۹۵٪ برای شمارش، به شکل زیر بیان شود:

$$R \pm 2\sqrt{\frac{R(100-R)}{N}}$$

که در اینجا R، شمارش رتیکولوسیت به درصد و N تعداد گلبول‌های قرمز مورد ارزیابی است.
این بدین معنی است که چنانچه تنها ۱۰۰۰ گلبول قرمز شمارش شوند، حدود اطمینان برای شمارش رتیکولوسیت ۱٪ در محدوده ۱/۶–۰/۴٪، برای رتیکولوسیت ۵٪ در محدوده ۴/۶–۳/۶٪، و برای شمارش رتیکولوسیت ۱۰٪ در محدوده ۱۱/۹–۸/۱٪ می‌باشد.

نکات مهم در رنگ آمیزی و شمارش رتیکولوسیت

- نمونه خون بایستی تازه باشد و حداکثر ۸–۶ ساعت از نمونه گیری آن در دمای اتاق گذشته باشد. زیرا با گذشت زمان رتیکولوسیت‌ها ممکن است به RBC تبدیل شوند. ICSH توصیه می‌کند که تعیین میزان رتیکولوسیت بلافاصله پس از نمونه گیری صورت بگیرد.
- خون بیمار بایستی هموژن بوده و به خوبی مخلوط شود تا رتیکولوسیت ها در نمونه خون بصورت یکنواخت و مناسب پخش شوند. بعد از رنگ آمیزی و انکوباسیون و قبل از تهیه گستره نیز نمونه خون بایستی به خوبی مخلوط شود.
- رنگ آمیزی رتیکولوسیت نیازی به فیکساسیون ندارد.
- خشک شدن سریع گستره رنگ شده برای بهبود وضوح تصویر سلول ها توصیه می‌شود. خشک شدن آهسته و ضعیف گستره و وجود رطوبت در لام، باعث ایجاد آرتیفکت های رفلکس دار و براق (مشابه واکوئل) در سطح سلول ها می‌شود که گاهی به علت شباهت به رتیکولوم های رسوب کرده در سلول، به عنوان رتیکولوسیت شمارش می شوند[1]. در صورت کار کردن با پیچ میکرو در میکروسکوپ، بدلیل براق بودنشان به راحتی از رتیکولوسیت ها قابل تفکیک هستند.
- در نمونه های آنمیک بجای برداشت ۱۰۰µ خون، از حجم ۱۵۰µ و در نمونه های پلی سایتمیک از حجم ۵۰µ استفاده می‌شود.
- انکوباسیون طولانی تر از مقدار استاندارد، باعث رسوب غیراختصاصی رنگ بر روی RBCها شده و به اشتباه رتیکولوسیت شمارش می شوند.
- رنگ آمیزی با نیومتیلن بلو گرانول های آبی پررنگ تر و هموژن تری را در مقایسه با بریلیانت کرزیل بلو و ایجاد می‌کند و بنابراین از اولویت بالاتری برخوردار می‌باشد.
- رتیکولوسیت ها را بایستی از اجسام پاپن هایمر، هاینز بادی، هاول ژولی و گلف بال های آلفاتالاسمی افتراق داد.

[1] به چنین سلول هایی که در اثر رطوبت ایجاد می شوند، Torocyte گفته می‌شود.

آزمایشات پایه در خون‌شناسی

سرعت رسوب گلبول‌های قرمز[1]

زمانی که خون وریدی حاوی ضدانعقاد در حرارت اتاق در وضعیت عمودی قرار بگیرد، گلبول‌های قرمز رسوب کرده و ستونی از پلاسما را برجای می گذارند. طول پایین رفتن گلبول‌های قرمز در فاصله زمانی مشخص و برحسب میلیمتر را ESR می نامند که در گذشته به BSR[2] معروف بوده است. آزمایش ESR از سه مرحله تشکیل شده است:

۱- در ۱۰ دقیقه اول بخاطر تشکیل رولو، رسوب اندکی وجود دارد. این فاز در افراد مبتلا به مالتیپل میلوما، ماکروگلوبولینمی والدنشتروم و افراد مبتلا به بیماری آگلوتینین سرد، که از ابتدا دارای مقادیر قابل توجهی رولو و آگلوتیناسیون در خون خود هستند، با سرعت و شدت بیشتری همراه بوده و باعث افزایش ESR می‌شود. در مقابل، افراد مبتلا به انواع مختلف پوئیکیلوسیتوز (اسفروسیتوز، داسی شکل و ...) که پتانسیل کمتری برای تشکیل رولو دارند، در این فاز از سرعت کمتری برخوردار خواهند بود.

۲- در حدود ۴۰ دقیقه رسوب گلبول‌های قرمز با سرعت بیشتر و ثابتی اتفاق می افتد. قسمت عمده عوامل تأثیرگذار در تست ESR در این مرحله اثر خود را بروز می دهند و باعث کاهش یا افزایش آن می شوند. لازم به ذکر است که هرچه فاز اول سریعتر باشد، فاز دوم نیز سریعتر و بیشتر خواهد بود.

۳- در ۱۰ دقیقه پایانی بخاطر انباشتگی سلول‌ها در ته لوله، رسوب کاهش می یابد. این مرحله در پی‌پت‌هایی که به صورت کج و زاویه دار قرار می گیرند، با تراکم کمتری صورت گرفته و در نتیجه در این فاز نیز سلول ها با سرعت بالایی به رسوب خود ادامه می دهند و باعث افزایش کاذب ESR می شوند. در افراد آنمیک نیز به دلیل تراکم پایین سلول ها در این مرحله، رسوب با سرعت بالایی ادامه پیدا می‌کند (برخلاف افراد پلی سایتمیک).

روش انجام آزمایش

برای ESR تاکنون براساس نوی پی‌پت سدیمان (طول، حجم و قطر داخلی)، نوع خون مصرفی (رقیق شده یا نشده)، مدت زمان تست و ماده ضدانعقاد مصرفی (EDTA یا سیترات)، روش های مختلفی ابداع و منسوخ شده اند. از جمله این روش ها می توان به Fahraeus، Westergren، Cutler، Wintrobe، micro ESR و ZSR[3] اشاره نمود.

روش Wintrobe-Landsberg

در این روش از خـــون کامل EDTAدار بدون رقیق سازی استفاده می‌شود. پی‌پت مورد استفاده در این روش دارای طول mm ۱۰۰ و قطر داخلی mm ۲/۵ می‌باشد. مقدار mL ۱ خون، به آرامی و بدون ایجاد حباب تا عدد صفر پر نموده و تا یکساعت در محیط بدون لرزش و به دور از نور آفتاب قرار می دهند تا گلبول های قرمز رسوب کنند. این روش در ۱۹۳۵ ابداع شده است.

[1] Erythrocyte Sedimentation Rate (ESR)
[2] Blood Sedimentation Rate
[3] Zeta Sedimentation Ratio

روش Westergren

روش Westergren بخاطر آسانی، بطور گسترده مورد استفاده قرار می گیرد. کمیته ICSH در سال ۱۹۹۳این روش را به دلیل طول بلندتر پیپت سدیمان و کمتر بودن عوامل محیطی و تکنیکی موثر بر آن، به عنوان روش مرجعی که از خون کامل رقیق شده استفاده می‌کند، توصیه نموده است. لوله وسترگرن یک پیپت مستقیم به طول ۳۰ سانتی متر و قطر داخلی ۲/۵۵ میلیمتر است و بصورت میلیمتری از صفر تا ۲۰۰ درجه بندی شده است. این لوله گنجایش یک میلی‌لیتر خون را دارد. این روش در سال ۱۹۲۴ ابداع شد و در آن از پایه مخصوص وسترگرین استفاده می‌شود که دارای اهرم هایی برای حفظ حالت عمودی پی‌پت می‌باشد.

۴ حجم خون را با یک حجم از ضدانعقاد سیترات سدیم ۳/۲٪ مخلوط می‌کنیم. پیپت وسترگرن تا علامت صفر از خون پر می‌شود و دقیقاً بصورت عمودی در جالوله ای مخصوص خود در دمای اتاق و در مکانی بدون ارتعاش و تماس مستقیم با نور خورشید، قرار داده می‌شود.

دقیقاً پس از سپری شدن ۶۰ دقیقه، فاصله بین علامت صفر تا رأس ستون گلبول‌های قرمز رسوب کرده، برحسب میلیمتر و به عنوان مقدار ESR یادداشت می‌شود. در صورتی که مرز بین پلاسما و ستون گلبول‌های قرمز مشخص نباشد، نخستین جایی از ستون که دارای تراکم کامل باشد را به عنوان سطح ESR در نظر می گیریم.

روش وسترگرین اصلاح شده

در این روش نتایج مشابهی حاصل می‌شود با این تفاوت که به جای سیترات از EDTA به عنوان ضدانعقاد استفاده می کنند. ضمن اینکه انجام ESR را با همان نمونه خون CBC بیمار میسر می سازد. ۲ mL از خون EDTAدار خوب مخلوط شده را با ۰/۵mL سیترات سدیم ۳/۲ یا نرمال سالین، رقیق کرده و با استفاده از پی‌پت وسترگرین، آزمایش را مشابه روش وسترگرین ادامه می دهیم.

روش دستگاهی

دستگاه سدیمان آنالایزر، بوسیله میکروپروسسور کنترل می‌شود و میزان ESR را بر مبنای سنجش سطح گلبول‌های قرمز در ابتدای آزمایش و سپس در بازه های زمانی معین بوسیله اشعه مادون قرمز، محاسبه می‌کند. این دستگاه بطور همزمان چند نمونه خون را مورد آزمایش قرار می دهد و با توجه به زاویه ۱۸ درجه ای که ایجاد می‌کند، میزان ESR ساعت اول را در مدت ۳۰-۲۰ دقیقه قرائت می‌کند.

لوله های استفاده شده بایستی منطبق با دستگاه آنالایزر باشند. در غیر اینصورت نتایج غیرقابل اعتماد بدست می آید و همچنین ممکن است به دستگاه آسیب وارد شود. هر لوله دارای میزان مشخص سیترات سدیم ۳/۲٪ که خون اضافه شده تا سطح تعیین شده بر روی لوله، با آن مخلوط می‌شود. حداقل ۱۰ بار با سر و ته کردن لوله، خون را با ضدانعقاد بطور مناسب مخلوط کنید.

کنترل کیفی دستگاه سدیمان آنالایزر

برای کنترل کیفی روزانه، می‌توان از خون کنترل های تجاری (ترجیحاً در دو سطح طبیعی و غیرطبیعی) و سپس رسم نمودار کنترل کیفی، استفاده کرد. در صورت عدم دسترسی به خون کنترل، می‌توان از نمونه‌های بیماران استفاده کرد. بدین صورت که ۱۰-۵ نمونه حاوی EDTA را انتخاب کرده، روز اول ۴ حجم از خون را با یک حجم نرمال سالین یا سیترات سدیم مخلوط کرده و ESR آنها را به روش دستگاهی چک می‌کنیم. باقیمانده خون را در یخچال نگهداری کرده و روز بعد مجدداً یک حجم سیترات سدیم یا نرمال سالین را با ۴ حجم از خون روز قبل مخلوط کرده و ESR آن را به روش دستگاهی اندازه‌گیری می‌کنیم. مقادیر خوانده شده در دو روز متوالی را با استفاده از آزمون T-Britin مقایسه می‌کنیم.

فاکتورهای دخیل در نتایج آزمایش

افزایش سطح فیبرینوژن و به میزان کمتری گلوبولین های α_2، β و γ باعث افزایش ESR می‌شوند. این مولکول های پروتئینی نامتقارن در مقایسه با سایر پروتئین ها، پتانسیل زتا را بیشتر کاهش داده و در نتیجه تشکیل رولو افزایش پیدا می‌کند. آلبومین و لسیتین سرعت رسوب را کاهش داده و در مقابل، کلسترول باعث افزایش ESR می‌شود.

کم‌خونی به علت تغییر در نسبت گلبول‌های قرمز به پلاسما، منجر به تشکیل رولو و افزایش ESR می‌شود. این مسئله مستقل از تغییرات در غلظت پلاسمایی پروتئین ها می‌باشد. ESR با هر روشی که اندازه‌گیری شود، در محدوده هماتوکریت ۴۰-۳۰٪، بیشترین حساسیت را نسبت به پروتئین های پلاسمایی دارد. سرعت رسوب با وزن گلبول‌های قرمز نسبت مستقیم و با مساحت سطح آنها نسبت عکس دارد. برای مثال میکروسیت‌ها آهسته تر از ماکروسیت‌ها رسوب می‌کنند، زیرا که ماکروسیت‌ها دارای نسبت سطح به حجم پایین تری هستند. رولو نیز دارای نسبت کاهش یافته سطح به حجم بوده و بنابراین ESR را تسریع می‌بخشد. گلبول‌های قرمز با اشکال غیرطبیعی و نامنظم مانند سلول‌های داسی شکل یا اسفروسیت، تشکیل رولو را به تأخیر انداخته و در نتیجه ESR را کاهش می‌دهند. در کم‌خونی داسی شکل، علیرغم وجود التهاب، ESR بالا نمی رود. آنیزوسیتوز و پویکیلوسیتوز مانع ایجاد رولو می‌شوند.

سرعت رسوب در پلی سایتمی و سندرم های هایپرویسکوزیته (مانند ماکروگلوبولینمی والدنشتروم) و آن دسته از بیماری های کبد که به علت نارسایی قادر به سنتز پروتئین های فاز حاد نباشند، کاهش می یابد. مشاهده رولو در خون محیطی بیمار به همراه ESR کاهش یافته، بیانگر هایپرویسکوزیته پلاسما به علت پروتئین های غیرطبیعی یا مواد سنگین دیگر می‌باشد.

در زنان باردار، به علت رقیق شدن خون، سرعت رسوب افزایش می یابد. در این حالت ESR ممکن است به ۵۰-۴۰ میلی‌متر در ساعت نیز برسد و تا یک ماه بعد از زایمان نیز به این حالت باقی می ماند.

RBCهای کومبس مثبت در کم‌خونی های اتوایمیون با سرعت بیشتری رسوب می‌کنند و این مسئله به علت میل به تجمع زیاد[1] در این سلول‌ها رخ می دهد.

آزمایش ESR باید در عرض ۲ ساعت پس از نمونه‌گیری در حرارت اتاق و یا حداکثر تا ۲۴ ساعت در خون EDTAداری که در یخچال بوده، انجام شود، در غیر اینصورت، کروی شدن گلبول‌ها باعث کاهش ESR می‌شود. قبل از انجام آزمایش، نمونه نگهداری شده در یخچال بایستی به دمای اتاق برسد و کاملاً مخلوط شود.

مقدار ESR در لوله های پلاستیکی حدود ۲-۱ میلی‌متر در ساعت بیشتر از لوله های شیشه ای است. انحراف ۳ درجه ای از حالت عمودی نیز میزان ESR را تا ۳۰٪ افزایش می دهد.

غلظت ماده ضدانعقاد اگر بیشتر از میزان توصیه شده باشد، ممکن است باعث افزایش ESR شود. هپارین با ایجاد چروکیدگی در گلبول‌های قرمز و کاهش پتانسیل زتا، میزان رسوب را بطور کاذب افزایش می دهد.

کاربرد آزمایش

از آزمایش ESR برای پیگیری درمان بیماری های التهابی و عفونی یا حضور بیماری های التهابی، استفاده می‌شود. اگرچه وجود تست های اختصاصی تری چون CRP کاربرد ESR را محدودتر کرده است، لیکن مطالعات جدید کاربردهای بالینی مهمی را برای ESR گزارش کرده اند:

- کم‌خونی داسی شکل: میزان پایین در غیاب بحران های انسدادی (افزایش متوسط یک هفته مانده به بحران)
- استئومیلیت: میزان رسوب افزایش دارد و در پایش درمان سودمند می‌باشد.
- سکته مغزی: میزان بیشتر از ۲۸ میلی‌متر، پیش آگهی بدتری دارد.
- سرطان پروستات: میزان بالاتر از ۳۷ میلی‌متر همراه با پیشرفت بیماری، پیش آگهی بدی دارد.

[1] Agglomerate

- بیماری عروق کرونر[1]: مقادیر بیشتر از ۲۲ میلی‌متر در مردان سفیدپوست، فاکتور خطر محسوب می‌شود.

میزان ESR در حاملگی، از هفته های ۱۰ تا ۱۲ افزایش یافته و یک ماه بعد از زایمان به مقدار طبیعی باز می گردد. نتایج آزمایش اغلب در بیماران مبتلا به نئوپلاسم، بیماری بافت همبند و عفونت ها طبیعی می‌باشد و بنابراین وجود یک نتیجه ESR طبیعی، نمی‌تواند رد کننده این اختلالات باشد. با این وجود، در بیمارانی که سرطان شناخته شده دارند، مقادیر بیش از ۱۰۰ میلی‌متر، معمولاً وجود متاستاز را مطرح می‌کنند.

این آزمایش گاهی در افتراق بیماری هایی که تابلو بالینی یکسانی دارند، کمک کننده است. برای مثال، میزان ESR در استئوآرتریت طبیعی است ولی در آرتریت ناشی از بیماری های روماتیسمی و تب روماتیسمی بالاست. در اوایل بیماری التهابی لگن و پارگی بافت اطراف جنین در حاملگی خارج رحمی، میزان سرعت رسوب بالا می رود، در حالی که در ۲۴ ساعت اول شروع آپاندیسیت، طبیعی است.

ESR آزمایش مفیدی در تشخیص و پیگیری پلی میالژی روماتیکا[2] یا دردهای ماهیچه ای ناشی از التهاب عروقی و التهاب عروق تمپورال[3] می‌باشد، که در این موارد مقدار آن بیش از ۹۰ میلی‌متر در ساعت است. از کاربرد اورژانس ESR می‌توان برای ارزیابی التهاب عروقی تمپورال، آرتریت عفونی و التهاب لگن نام برد.

اندازه‌گیری سریع ESR در Giant cell artritis[4] از نظر بالینی اهمیت زیادی دارد، زیرا که تأخیر چند ساعته در شروع درمان با استروئیدها، ممکن است با اختلال بینایی برگشت ناپذیر همراه باشد.

اندازه‌گیری هموگلوبین

هموگلوبین، ترکیب اصلی گلبول‌های قرمز، یک پروتئین کونژوگه بوده که به عنوان حامل برای اکسیژن و دی اکسید کربن عمل می‌کند. یک مولکول هموگلوبین از دو جفت زنجیره پلی پپتیدی گلوبین و چهار گروه پروستتیک heme که هر کدام حاوی یک اتم آهن فروس (Fe^{2+}) هستند، تشکیل شده است. هر مولکول heme قادر به حمل یک مولکول O_2 می‌باشد. در هنگام اشباع کامل، هر گرم هموگلوبین، ۱/۳۴ میلی‌لیتر اکسیژن را نگه می دارد. توده گلبول‌های قرمز در بزرگسالان تقریباً حاوی ۶۰۰ گرم هموگلوبین بوده و در نتیجه قادر است ۸۰۰ mL اکسیژن را حمل کند. هموگلوبین احیا شده، هموگلوبینی است که آهن آن از اکسیژن جدا شده باشد.

هنگامی که هر گروه heme به یک مولکول اکسیژن متصل شده باشد، به عنوان اکسی هموگلوبین[5] (HbO_2) شناخته می‌شود. هم در هموگلوبین و هم در اکسی هموگلوبین، آهن در وضعیت فروس قرار دارد. هنگامی که آهن در هموگلوبین به حالت فریک (Fe^{3+}) اکسید شود، مت‌هموگلوبین[6] (همی گلوبین، Hi) تشکیل می‌شود و مولکول ظرفیت خود را برای انتقال اکسیژن و دی اکسیدکربن از دست می دهد. متهموگلوبین حداکثر ۱/۵٪ هموگلوبین در فرد طبیعی را تشکیل می دهد. چنانچه افزایش Hi زیاد باشد، موجب تغییر رنگ خون به قهوه ای شکلاتی شده و سیانوز و کم‌خونی عملکردی را در پی خواهد داشت.

سولفوهموگلوبین[7] (SHb) ترکیبی از اشکال اکسید شده و نسبتاً دناتوره شده هموگلوبین است که در طی همولیز اکسیداتیو تشکیل می‌شود. در طی اکسیدشدن هموگلوبین، سولفور از منابع مختلف به داخل حلقه های heme در هموگلوبین وارد شده و ایجاد هموکروم سبز رنگ می نماید. اکسیداسیون مجدد معمولاً موجب دناتوره شدن و رسوب هموگلوبین به شکل اجسام هاینز[8] می‌شود. غلظت طبیعی سولفوهموگلوبین در بدن کمتر از ۱٪ است. افزایش غلظت آن، منجر به سیانوز شده که معمولاً بدون

[1] Coronary Artery Disease (CAD)
[2] Polymyalgia Rheumatica
[3] Temporal Arteritis

[4] بیماری التهابی عروق که رگ های بزرگ تا متوسط ناحیه سر را در بر می گیرد.

[5] Oxy-hemoglobin
[6] Met-hemoglobin or hemiglobin
[7] Sulfo-hemoglobin
[8] Heinz bodies

علامت است. سولفوهموگلوبین نمی‌تواند اکسیژن را انتقال دهد، اما می‌تواند با منوکسید کربن ترکیب شده و کربوکسی سولفوهموگلوبین را ایجاد کند. خون در سولفوهموگلوبینمی، بنفش رنگ می‌شود.
منوکسیدکربن اندوژن که در نتیجه تجزیه heme به بیلی‌روبین تولید می‌شود، با اتصال به هموگلوبین، کربوکسی‌هموگلوبین[1] (HbCO) را ایجاد می‌کند که حدود ۰/۵٪ هموگلوبین را در حالت طبیعی تشکیل می دهد. در کم‌خونی‌های همولیتیک، میزان HbCO افزایش پیدا می‌کند. تمایل هموگلوبین جهت اتصال به منوکسید کربن، ۲۱۰ برابر اکسیژن می‌باشد و بنابراین غلظت بسیار کم منوکسیدکربن در هوا (حدود ۰/۰۴-۰/۰۲٪) به راحتی می‌تواند با هموگلوبین پیوند برقرار کند. در این موارد، HbCO آنقدر ساخته می‌شود تا علائم شاخص مسمومیت، آشکار شود. HbCO به نور حساس بوده و معمولاً رنگ آلبالویی درخشان دارد.

در سال ۱۹۶۶کمیته ICSH، اندازه‌گیری هموگلوبین به روش سیانومت‌هموگلوبین[2] (هموگلوبین سیانید یا سیانور هموگلوبین) را به عنوان روش مرجع معرفی کرده است که این روش دارای سه مزیت می‌باشد:

- تمام انواع هموگلوبین‌های ذکر شده، به جز SHb که به مقدار جزئی در خون وجود دارد، به سیانومت‌هموگلوبین تبدیل می‌شوند. البته سرعت تبدیل HbCO در مقایسه با بقیه کمتر است.
- استانداردهای پایدار سیانومت‌هموگلوبین با مقادیر مشخص هموگلوبین به صورت تجاری موجود است.
- حداکثر جذب نوری سیانومت‌هموگلوبین در ۵۴۰ نانومتر، بصورت یک باند نسبتاً پهن و صاف است و از این رو به اندازه‌گیری Hb با اسپکتروفوتومتر می‌توان اعتماد کرد.

خون در محلول درابکین[3] رقیق می‌شود. این محلول با ماده شوینده اصلاح شده است. مواد لازم برای ساخت درابکین عبارتند از:

فری سیانور پتاسیم (K_3FeCN_6)	با وزن مولکولی ۳۲۹/۲٤g	۰/۲ گرم
سیانور پتاسیم (KCN)	با وزن مولکولی ۶۵/۱۱g	۰/۰۵ گرم
دی هیدروژن پتاسیم فسفات بدون آب (KH_2PO_4)	با وزن مولکولی ۱۶۳/۱۳g	۰/۱٤ گرم
شوینده غیر یونی مانند استروکس SE یا تریتون X-100		۰/۵-۱ mL
آب مقطر نوع I		تا ۱۰۰۰ mL

لازم به ذکر است که محلول درابکین از بدو پیدایش تا کنون، دو بار اصلاح شده است. در محلول درابکین معمولی (اصلی)، pH محلول ۸/۶ بود که باعث کدورت محلول نهایی سیانومت‌هموگلوبین می شد. لذا در اصلاح اول، pH آن را به ۹/۶ افزایش دادند تا کدورت ناشی از مواد پروتئینی و لاشه‌های سلولی کمتر شود، ولی افزایش pH منجر به کاهش سرعت تست و تأخیر در انجام آزمایش شد. در نهایت محلول درابکین اصلاح شده امروزی که به محلول VKZ[4] معروف است، با دومین اصلاح ساخته شد که با افزودن مایع شوینده و بافر فسفات به فرمول اولیه و رساندن pH آن به ۷/۲، مشکلات قبلی آن حل شده است. این محلول امروزه مورد تأیید ICSH می‌باشد.

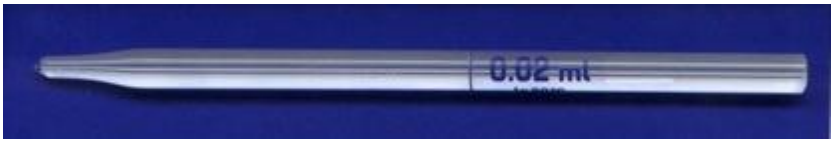
محلول بالا در دمای ۲۵-۴ درجه در شیشه قهوه ای بوروسیلیکات برای چندین ماه، پایدار است. محلول بایستی شفاف و زرد روشن باشد و دارای pH بین ۷ تا ۷/۴ باشد. جذب نوری این محلول در ۵۴۰ نانومتر در مقابل آب مقطر، بایستی صفر باشد. در محلول اصلاح شده درابکین، از KH_2PO_4 به جای بیکربنات سدیم استفاده شده، که زمان لازم جهت تبدیل کامل Hb به

[1] Carboxy-hemoglobin
[2] Cyanmet-hemoglobin (Hemoglobin cyanide)
[3] Drabkin
[4] Von Kampen-Zilistra

HiCN را از ۱۰ دقیقه به ۳ دقیقه کاهش داده است. ماده شوینده موجود نیز، تخریب گلبول‌های قرمز را سرعت بخشیده و کدورت ناشی از رسوب پروتئین ها را کاهش می دهد.
باید در تهیه محلول درابکین دقت شد، زیرا که املاح یا محلول های سیانید سمی می‌باشند. محلول رقیق کننده دارای ۵۰ mg از KCN در لیتر است که کمتر از مقدار کشنده برای یک فرد ۷۰ کیلویی است. با این وجود باید مراقب بود و از تماس اسید با آن اجتناب کرد، زیرا سیانید هیدروژن با اسیدی کردن آزاد می‌شود. بهتر است نمونه‌ها و مواد تشکیل دهنده، در آب جاری دستشویی دور ریخته شوند.

روش انجام آزمایش

نمونه خون EDTAدار را به خوبی مخلوط کرده و سپس ۲۰ میکرولیتر از آن را برداشته و به ۵ میلی‌لیتر محلول درابکین اضافه می‌کنیم تا رقت ۱/۲۵۱ ایجاد شود. بهتر است برای برداشت نمونه از پیپت سالی[1] کلاس A استفاده شود. خوب مخلوط کرده و اجازه می‌دهیم در دمای اتاق حداقل به مدت ۳ دقیقه بماند (جهت تبدیل کامل انواع هموگلوبین به سیانومت‌هموگلوبین).



شکل ۳-۳: پیپت سالی

جذب نوری فوتومتر را با محلول درابکین در طول موج ۵۴۰ نانومتر صفر کرده و سپس جذب نوری محلول تست و استاندارد را قرائت می‌کنیم:

$$\frac{\text{غلظت استاندارد} \times \text{جذب نوری تست}}{\text{جذب نوری استاندارد}}$$

برای بدست آوردن غلظت استاندارد بر حسب g/dL، میزان mg/dL را که روی ویال استاندارد درج شده است، در عدد ۰/۲۵۱ ضرب کنید. چنانچه غلظت استاندارد برحسب g/dL باشد، نیازی به محاسبه ندارد. برای مثال چنانچه غلظت استاندارد mg/dL ۶۰ باشد، با توجه به ضریب رقت تست، این مقدار معادل ۱۵ g/dL هموگلوبین در نظر گرفته می‌شود:

۶۰×۰/۲۵۱=۱۵

در این رابطه، ۲۵۱ ضریب رقت و عدد ۱۰۰۰ در مخرج کسر برای تبدیل میلی گرم به گرم است.

استانداردهای تجاری هموگلوبین (گاهی سیانومت‌هموگلوبین نیز نامیده می‌شوند)، اغلب دارای غلظت‌های ۷۹/۷ mg/dL، ۵۱/۸ mg/dL و ۲۳/۹ mg/dL بوده که در ویال‌های تیره درون کیت هموگلوبین وجود دارند. با تهیه رقت‌های مختلف از آن‌ها، می‌توان غلظت‌های مختلف از سیانومت‌هموگلوبین را تهیه کرده و بر اساس آن منحنی استاندارد را رسم نمود. بنابراین در دفعات بعدی فقط کافیست OD نمونه مجهول را بر روی منحنی استاندارد برده و مقدار هموگلوبین را بطور مستقیم بدست آورد.
برای ترسیم منحنی استاندارد، حداقل به سه غلظت متفاوت از استاندارد سیانومت‌هموگلوبین نیاز است. با ضرب غلظت‌های فوق در ۰/۲۵۱، معادل هموگلوبینی آن‌ها به ترتیب g/dL ۲۰، ۱۳ و ۶ خواهد بود. گاهی نیز برای رسم منحنی استاندارد، به غلظت‌های بیشتری احتیاج است که جهت تهیه آن‌ها به روش زیر عمل می‌کنیم:

[1] Sahli pipette

شماره لوله	استاندارد مورد استفاده (mg/dL)	حجم استاندارد (mL)	حجم درابکین رقیق کننده (mL)	غلظت استاندارد حاصل شده (mg/dL)	معادل هموگلوبینی آن (g/dL)
۱	79.7	5	0	79.7	**20**
۲	79.7	4	1	63.7	**16**
۳	51.8	5	0	51.8	**13**
۴	23.9	5	0	23.9	**6**
۵	23.9	3	2	14.35	**3.6**

می‌توان به جای روش فوق، فقط از یک استاندارد استفاده کرد و سپس با تهیه رقت‌های سریالی از آن، نمودار استاندارد را رسم کرد. در هر حال، OD هر کدام از رقت‌ها را در محور Y و غلظت هر کدام را در محور X مختصات قرار داده و منحنی را رسم می‌کنیم. در شرایط ایده‌آل، یک منحنی خطی بدست می‌آید. برای نمونه‌های مجهول کافیست OD نمونه را بر روی منحنی استاندارد برده و از روی محور X غلظت آن را بدست آورد.

عوامل مداخله گر و منابع خطا در اندازه‌گیری هموگلوبین

۱- **کدورت محلول درابکین:** باعث خوانش جذب نوری بیشتر شده، میزان هموگلوبین بطور کاذب بالا محاسبه می‌شود. عمده ترین مواردی که باعث کدورت درابکین می‌شوند به همراه اقدامات اصلاحی، عبارتند از:

- *لکوسیتوز:* نمونه را سانتریفیوژ کرده و از محلول رویی برای اندازه‌گیری هموگلوبین استفاده کنید.
- *هایپرپروتئینمی:* یک قطره آمونیوم ۲۵٪ به نمونه خون اضافه کنید. آمونیوم باعث شفاف شدن ترکیب درابکین با خون می‌شود.
- *هیپرلیپیدمی:* از لوله شاهد استفاده کنید یا اینکه نمونه خون را سانتریفیوژ کرده و هم حجم پلاسمای شیری رنگ، نرمال سالین اضافه کرده، هموگلوبین را اندازه‌گیری کنید. دقت شود که نمونه‌هایپرلیپیدمی باعث مات شدن گلبول‌های قرمز در رنگ‌آمیزی می‌شود. تعداد سلول‌های مات[1]، ارتباط مستقیمی با افزایش چربی ها در نمونه خون دارد.
- *گلبول‌های قرمز لیز نشده:* مانند تارگت سل در اختلالات کبدی و یا هموگلوبینوپاتی ها. مقدار ۵ میلی‌لیتر آب مقطر به ترکیب خون و درابکین اضافه کرده (محلول هایپوتونیک می‌شود) و سپس میزان هموگلوبین محاسبه شده را در عدد ۲ ضرب کنید.

۲- تکنیک نامناسب خون گیری وریدی که با تغلیظ نمونه سبب افزایش کاذب مقدار هموگلوبین و شمارش سلولی می‌شود.

۳- استفاده از تجهیزاتی که سوابق کنترل کیفی و کالیبراسیون ندارند.

۴- آگاهی ناکافی کارکنان از منابع خطا و نحوه صحیح انجام آزمایش

۵- مخلوط نمودن ناکافی نمونه پیش از انجام آزمایش

۶- وجود لخته در نمونه

۷- نگهداری درابکین در مقابل نور یا یخ زدن آن

۸- استفاده از استاندارد خراب یا تاریخ مصرف گذشته

[1] Blurred cell

اندازه‌گیری هماتوکریت

آزمایش هماتوکریت یا حجم سلول‌های فشرده، در واقع اندازه‌گیری نسبت حجم گلبول‌های قرمز متراکم شده به حجم خون کامل است. اندازه‌گیری هماتوکریت بصورت مستقیم توسط سانتریفیوژ کردن نمونه در دستگاه میکروهماتوکریت (روش میکرو) انجام می‌شود، که توسط کمیته ICSH به عنوان روش مرجع اندازه‌گیری هماتوکریت تعیین شده و از آن برای کالیبراسیون دستگاه‌های سل‌کانتر نیز استفاده می‌شود. در روش غیرمستقیم که توسط سل‌کانتر انجام می‌شود، میزان هماتوکریت از حاصلضرب MCV در RBC بدست می آید.

روش انجام آزمایش

دو سوم تا سه چهارم لوله موئینه (لوله میکروهماتوکریت) را از خون کامل EDTAدار پر می‌کنیم. انتهای لوله را با خمیر هماتوکریت مسدود می‌کنیم بطوری که ارتفاع خمیر درون لوله کمتر از ۴ mm نباشد. از هر نمونه بایستی دو لوله تهیه شود و در دستگاه هماتوکریت طوری مقابل یکدیگر قرار بگیرند که انتهای خمیر زده به سمت خارج باشد. با تنظیم زمان سنج دستگاه، سانتریفیوژ نمونه‌ها انجام شده و نتیجه آزمایش حداکثر ۱۰ دقیقه پس از توقف دستگاه توسط خط کش مخصوص خوانده شود. با گذشت زمان و باقی ماندن لوله ها درون دستگاه بصورت افقی، حدفاصل پلاسما و سلول به تدریج شیب دار و خواندن نتایج با مشکل مواجه خواهد شد.

لوله را طوری روی خط کش هماتوکریت قرار دهید که مرز بین خمیر هماتوکریت و گلبول‌های قرمز فشرده، بر روی خط ثابت پایینی خط کش (مرز صفر) و انتهای پلاسما بر روی خط بالای خط کش (مرز ۱۰۰) قرار بگیرد. سپس خط متحرک را جابجا کنید تا در حدفاصل بین پلاسما و گلبول‌های فشرده قرار بگیرد. عددی را که در امتداد خط متحرک قرار دارد، به عنوان مقدار هماتوکریت در نظر بگیرید.

نکات مهم

- انجام آزمایش با استفاده از خون وریدی، مویرگی و شریانی امکان پذیر است.
- در جمع آوری نمونه مویرگی، از لوله های هپارینه که حاوی حداقل ۷ واحد هپارین هستند، استفاده شود.
- می‌توان نمونه را پس از جمع آوری در دمای اتاق نگهداری و حداکثر در مدت ۶ ساعت پس از نمونه‌گیری آزمایش نمود.
- نمونه‌ها باید به روش دوتایی آزمایش شوند. مقدار هماتوکریت دو نمونه نباید بیشتر از ۰/۵٪ با یکدیگر اختلاف داشته باشند.
- بمنظور کالیبراسیون هماتوکریت در سل‌کانتر، از نمونه خون حاوی K_2EDTA استفاده شود. K_3EDTA باعث چروکیدگی گلبول‌های قرمز شده و میزان هماتوکریت را تا ۳٪ کاهش می دهد.
- توصیه می‌شود جهت انجام کالیبراسیون سل‌کانتر، از لوله های موئینه با حلقه آبی (بدون ضدانعقاد) استفاده شود.
- هنگام خواندن نتیجه با خط کش مخصوص، مقدار بافی کوت در نظر گرفته نشود.
- خطای قابل قبول اندازه‌گیری حجم سلول‌های متراکم شده به روش میکروهماتوکریت، ۱٪± است.

عوامل مداخله کننده و منابع خطا

- ✓ افزایش غیرمتناسب هر نوع نمک EDTA نسبت به حجم خون، باعث چروکیدگی گلبول‌ها و کاهش هماتوکریت می‌گردد.

- ✓ در تغییرات مورفولوژیکی گلبول‌های قرمز که موجب کاهش خاصیت انعطاف پذیری[1] آنها می‌شود، مانند کم خونی داسی شکل و اسفروسیتوز، در هنگام سانتریفیوژ نمونه، مقدار زیادی از پلاسما در لابه‌لای گلبول‌های قرمز به دام می‌افتد[2] و مقدار هماتوکریت را بطور کاذب افزایش می دهد. در کم‌خونی داسی شکل شدید، میزان پلاسمای به دام افتاده ممکن است تا ۲۰٪ هم برسد. در حالت طبیعی ۳-۱٪ پلاسما در لا به‌لای گلبول‌های قرمز به دام می افتد که در هنگام کالیبراسیون دستگاه، این میزان ۲٪ در نظر گرفته شده و میزان هماتوکریت را تصحیح می‌کنیم. برای مثال اگر هماتوکریت با روش میکرو برای بیماری ۴۵٪ باشد، میزان واقعی هماتوکریت برابر خواهد بود با:

حجم پلاسمای به دام افتاده ٪۴۵ × ٪۲=۰/۹

میزان واقعی هماتوکریت ٪۴۵ – ۰/۹=٪۴۴/۱

- ✓ توقف جریان خون[3] به علت بستن طولانی مدت تورنیکه، باعث افزایش غلظت خون و افزایش کاذب هماتوکریت می‌شود.
- ✓ سانتریفیوژ ناکافی نمونه‌ها، باعث افزایش کاذب میزان هماتوکریت می‌شود.
- ✓ در خون گیری های سخت و طولانی، به علت وارد شدن آب میان بافتی و رقیق شدن خون، باعث کاهش کاذب در مقدار هماتوکریت می‌شود.
- ✓ ماندن خون به مدت زیاد در حرارت آزمایشگاه، موجب ورم کردن گلبول‌های قرمز و کاهش انعطاف پذیری و افزایش هماتوکریت می‌شود. توصیه شده که حداکثر تا ۶ ساعت بعد از زمان نمونه‌گیری، آزمایش هماتوکریت انجام شود.
- ✓ همولیز در اثر استفاده از سرسوزن نازک
- ✓ مخلوط نشدن نمونه با ضدانعقاد
- ✓ پر یا مسدود کردن نادرست انتهای لوله هماتوکریت
- ✓ خطای دید هنگام خواندن نتیجه آزمایش
- ✓ محاسبه بافی کوت به عنوان جزئی از ستون گلبول‌های قرمز

دستگاه میکروهماتوکریت

ویژگی ها:

۱- شعاع چرخش بیشتر از ۸ سانتی متر

۲- توانایی رسیدن به حداکثر سرعت در عرض ۳۰ ثانیه

۳- توانایی ایجاد RCF[4] حدود 10^3 g ۱۵×۱۰-۱۰ به مدت حداقل ۵ دقیقه بدون افزایش دما از ۴۵ درجه سانتیگراد

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

(RPM: Round Per Minute)

۴- داشتن زمان سنج خودکار با قابلیت تنظیم حداقل ۳۰ ثانیه

کنترل کیفی:

موارد مورد ارزیابی در دستگاه میکروسانتریفیوژ عبارتند از:

- سرعت سانتریفیوژ – زمان سانتریفیوژ – حداکثر توان در تجمع سلولی

سرعت (برحسب دور در دقیقه) توسط تاکومتر و زمان سنج دستگاه بوسیله کورنومتر، بررسی می‌شوند.

---

[1] Flexibility
[2] Plasma trapping
[3] Stasis
[4] Relative Centrifugal Field

برای بررسی حداکثر توان در تجمع سلولی، به ترتیب زیر عمل می‌شود:
دو نمونه خون تازه حاوی K_2EDTA با هماتوکریت متفاوت، که بخوبی مخلوط شده اند را بصورت دوتایی ۲ دقیقه سانتریفیوژ کرده، مقادیر هماتوکریت را یادداشت می‌کنیم. سپس در هر مرحله بعد، ۳۰ ثانیه زمان سانتریفیوژ را افزایش داده و مجدداً مقادیر هماتوکریت را ثبت می‌کنیم. به همین ترتیب، ۳۰ ثانیه در هر مرحله به زمان سانتریفیوژ اضافه کرده تا زمانی که میزان دو هماتوکریت اندازه‌گیری شده، پی در پی بدون تغییر باقی بماند. این زمان به عنوان حداقل زمان لازم جهت متراکم نمودن گلبول‌های قرمز و همچنین به عنوان حداکثر توان در تجمع سلولی، در نظر گرفته می‌شود. بهتر است یکی از نمونه‌ها، هماتوکریت بالای ۵۰٪ داشته باشد. برای مثال:

زمان (برحسب دقیقه)	حجم سلول‌های متراکم شده (PCV)	
	نمونه ۱	نمونه ۲
۲/۰	٪۴۰	٪۵۹
۲/۵	٪۳۹	٪۵۸
۳/۰	٪۳۸	٪۵۷
۳/۵	٪۳۸ حداقل زمان تراکم	٪۵۶
۴/۰	-	٪۵۵
۴/۵	-	٪۵۵ حداقل زمان تراکم

همانگونه که مشاهده می‌شود، در مثال بالا، زمان لازم جهت متراکم نمودن گلبول‌های قرمز برای دستگاه میکروهماتوکریت مورد ارزیابی، در نمونه ای با هماتوکریت کمتر از ۵۰٪، ۳/۵ دقیقه و برای نمونه ای با مقدار هماتوکریت بالای ۵۰٪، ۴/۵ دقیقه می‌باشد.
کنترل و ارزیابی دستگاه میکروهماتوکریت، پس از خرید و قبل از شروع بکار دستگاه و همچنین هر ۶ ماه یکبار بایستی صورت بگیرد.

نکات مهم ایمنی:

- به منظور پیشگیری از بروز نوسانات جریان الکتریکی، دستگاه باید به سیستم تثبیت کننده ولتاژ برق[1] تجهیز شود.
- دستگاه باید در جای محکم قرار گیرد که ضربات وارده به پایه دستگاه در حال چرخش باعث خرابی دستگاه و همچنین کاهش دقت آن نشود.
- در هنگام باز کردن درب سانتریفیوژ و برداشتن لوله باید مواظب بود، زیرا لوله های شکسته به قطعات ریز تبدیل می‌شوند که با چشم دیده نمی‌شوند.
- بهتر است برای جلوگیری از ایجاد آئروسل، درب سانتریفیوژ ۱۰ دقیقه پس از اتمام کار دستگاه، باز شود.

[1] Voltage Regulator

۴

دستور کار آزمایشگاه خون‌شناسی

آنالیـــزورهای خون‌شناسی

آنالیزورهای آزمایشگاه خون‌شناسی از سه بخش تشکیل شده اند:

۱- Hydraulic: مسئول برداشت محلول ها، برداشت مقدار مشخصی از نمونه، رقیق کردن نمونه و افزودن محلول های لیز کننده به خون

۲- Pneumatic: مسئول ایجاد خلاء برای تولید فشار منفی برای باز و بسته کردن دریچه های دستگاه

۳- Electronic: بخش پردازش و تحلیل اطلاعات

از دیدگاه تکاملی، سل‌کانترها را می‌توان به سه دسته تقسیم کرد:

- ✓ **نیمه اتوماتیک (Semi-automated):** در این دستگاه‌ها که آنالیزور CBC_5 یک نمونه از آنهاست، مرحله رقیق سازی در خارج از دستگاه انجام می گیرد.
- ✓ **اتوماتیک (Automated):** این دستگاه‌ها ۸ تا ۱۸ پارامتر هماتولوژی را اندازه‌گیری و یا محاسبه می‌کنند و نیز قادرند شمارش افتراقی سه قسمتی لکوسیت‌ها (Lymph, Mix, Poly) را فراهم سازند. بیشترین سل‌کانترهای کشور را این گروه تشکیل می‌دهند و از جمله آنها می‌توان به Sysmex K series، Helena، H-cell و غیره اشاره کرد.
- ✓ **تمام اتوماتیک (Fully-automated):** این دستگاه‌ها قادرند تا ۳۲ پارامتر هماتولوژی را اندازه‌گیری و محاسبه کرده و شمارش افتراقی ۵ و ۷ قسمتی لکوسیت‌ها را فراهم می‌کنند. از جمله این آنالیزورها می‌توان به تکنیکون H1 و H2 و H3، Advia 120 و همچنین سیسمکس های سری XS و XT و XN اشاره کرد.

اساس کار سل‌کانترها معمولاً بر پایه یکی از اصول زیر است:

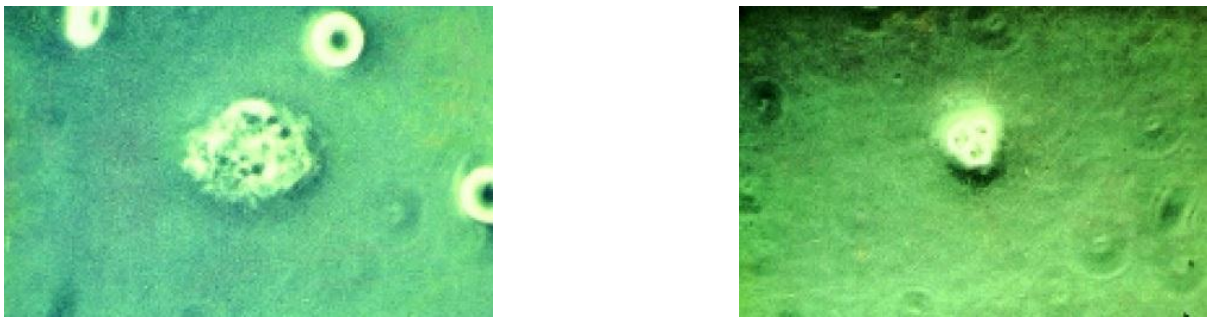
- اصل مقاومت الکتریکی (Electrical Impedance)
- بکارگیر مجموعه ای از قوانین فیزیک نور
- فلوسایتومتری
- استفاده از آنزیم های سیتوشیمیایی یا واکنش سیتوشیمی به منظور شناسایی سلول‌ها

روش مقاومت الکتریکی

امپدانس الکتریکی یا امپدانس روزنه ای[1] از روش‌های بسیار رایج در سل‌کانترها می‌باشد. سلول‌های خونی در برابر امواج مستقیم الکتریسیته به عنوان عایق بیولوژیک عمل می‌کنند. برای شمارش سلول‌های خونی، آنالیزور در ابتدا خون را در چامبر شمارش با محلول ایزوتون که هادی جریان الکتریسیته است، رقیق می‌کند. در داخل چامبر شمارش، لوله ای استوانه ای قرار دارد که از طریق یک روزنه با چامبر شمارش در ارتباط است. بین الکترود خارجی در چامبر و الکترود داخلی در لوله استوانه ای، یک جریان الکتریکی پیوسته با فرکانس پایین از طریق روزنه برقرار است. با نیروی مکش (خلاء) حجم خاصی از سوسپانسیون سلولی از چامبر شمارش به داخل لوله استوانه ای از طریق روزنه کشیده می‌شود. هر سلول در هنگام عبور از منطقه حساس شمارش (روزنه)، ایجاد مقاومت الکتریکی متناسب با حجم و اندازه خود می‌کند که اصطلاحاً پالس یا نبض نامیده می‌شود. ارتفاع پالس متناسب با حجم سلول و تعداد آن نشاندهنده تعداد سلول‌هاست.

آنالیزور برای شمارش گلبول‌های سفید، ابتدا نمونه خون را رقیق کرده و به آن معرف Lysing اضافه می‌کند. لیزینگ گلبول‌های قرمز را لیز کرده، از محیط شمارش خارج می‌کند و همچنین هموگلوبین را به سیانومت‌هموگلوبین تبدیل می‌کند که با روش اسپکتروفتومتری توسط آنالیزور اندازه‌گیری می‌شود. شمارش گلبول‌های قرمز و پلاکت‌ها در محفظه جداگانه ای صورت می گیرد. نمونه خون با ایزوتون رقیق شده و وارد چامبر می‌شود. در این مورد، رقیق سازی بسیار بیشتر از رقیق سازی گلبول‌های سفید می‌باشد.

پالس های ایجاد شده برمبنای ارتفاع و دامنه پالس دسته بندی شده و به صورت نمودار یا هیستوگرام ترسیم می‌شوند. در چامبر RBC/PLT، پالس های زیر ۲ فمتولیتر[2] (<2fL)، بعنوان آشغال، پالس های ۲۰ fL–۲ بعنوان پلاکت و پالس های ۳۶۰fL–۳۶ بعنوان گلبول قرمز در نظر گرفته می‌شوند. در چامبر WBC/Hb، پالس های ۹۰fL–۳۵ بعنوان لنفوسیت، پالس های ۱۶۰fL–۹۰ بعنوان سلول‌های مخلوط[3] (Mixed cell) و پالس های ۴۵۰fL–۱۶۰ بعنوان سلول‌های بزرگ یا نوتروفیل قلمداد می‌شوند. لازم به ذکر است که گلبول‌های سفید در حجم واقعی خود مورد آنالیز و شمارش قرار نمی گیرند، بلکه محلول لیز کننده ضمن حذف گلبول‌های قرمز، منفذهایی را نیز بر روی غشاء گلبول‌های سفید ایجاد کرده و موجب مچاله شدن غشاء بر روی هسته و کاهش اندازه سلول شود.



شکل ۱–۴: تأثیر معرف لیز بر روی سلول‌ها. شکل سمت چپ، یک عدد گلبول سفید و سه عدد گلبول قرمز، قبل از تأثیر معرف لیزکننده را نشان می دهد. در شکل سمت راست، معرف لیزکننده اضافه شده و گلبول سفید چروکیده شده و گلبول‌های قرمز بطور کامل محو شده اند.

[1] Aperture Impedance
[2] Femtoliter (fL)
[3] سلول‌های منوسیت، بازوفیل، تعدادی از ائوزینوفیل‌ها و لنفوسیت‌های آتیپیک و همچنین سلول‌های بلاست، از نظر الکتریکی هم پالس بوده و بعنوان سلول‌های مخلوط طبقه‌بندی می‌شوند.

جدول ۱-۴: مقایسه اندازه واقعی لکوسیت‌های خون و اندازه آنها در کانال لکوسیتی آنالیزورهای امپدانسی بدنبال لیز نسبی

نوع سلول	اندازه واقعی در خون	اندازه در سیستم امپدانسی
لنفوسیت	کوچکترین: ۱۴۰-۱۹۵fL	کوچکترین: ۳۵-۹۰fL
منوسیت	بزرگترین: ۳۰۰-۳۵۰fL	متوسط: ۹۰-۱۵۰fL
نوتروفیل	متوسط: ۲۴۵-۲۹۰fL	بزرگترین: ۱۵۰-۴۵۰fL
ائوزینوفیل	متوسط: ۲۴۰-۲۹۰fL	متوسط: ۹۰-۱۵۰fL
بازوفیل	متوسط: ۲۴۰-۲۹۰fL	متوسط: ۹۰-۱۵۰fL
سلول‌های غیرطبیعی	متغیر	متغیر

در سل‌کانترها، هماتوکریت بطور غیرمستقیم و از حاصلضرب MCV در میزان RBC بدست می آید.

$$MCV = \frac{HCT}{RBC} \times 10 \qquad fL\ (1\ fL = 10^{-15}\ L)$$

$$MCH = \frac{Hb}{RBC} \times 10 \qquad pg\ (1\ pg = 10^{-12}\ g)$$

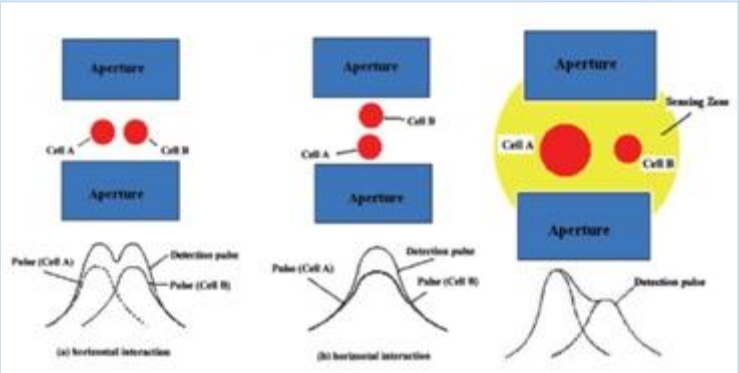
$$MCHC = \frac{Hb}{HCT} \times 100$$

با توجه به روابط فوق، چنانچه در اندازه‌گیری هموگلوبین و گلبول‌های قرمز، خطایی رخ دهد، بر روی سایر پارامترها نیز اثر می گذارد. برای مثال افزایش کاذب Hb موجب افزایش کاذب MCHC می‌شود و یا کاهش کاذب شمارش گلبول‌های قرمز موجب کاهش کاذب هماتوکریت خواهد شد.

عوامل مداخله گر در آنالیزورهای امپدانسی

پدیده عبور همزمان (Coincidence error)

عبور همزمان چند سلول از روزنه، ایجاد یک پالس الکتریکی پهن می‌کند که به عنوان یک سلول بزرگ شمارش می‌شود. در آگلوتیناسیون سرد، لکوسیتوز و پلی سیتمی این پدیده رخ می دهد که نتیجه آن کاهش کاذب شمارش سلولی می‌باشد. می‌توان با کاهش غلظت سلول‌ها و یا کوچک کردن اندازه روزنه، میزان خطای عبور همزمان را کاهش داد. با این وجود، کاهش غلظت سلول‌ها، خطای ناشی از رقیق کردن نمونه و خطای مربوط به شمارش را افزایش می دهد و نیز در صورت آلوده بودن محلول رقیق کننده با ذرات خارجی، شمارش کاذب را باعث می‌شود. با کوچک کردن روزنه، مشکل مسدود شدن نسبی یا کامل روزنه با مواد خرده ریز مانند لاشه سلولی، مسئله ساز خواهد شد.



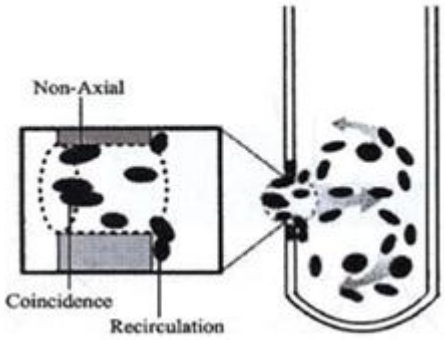
شکل ۲-۴: عبور همزمان سلول‌ها از روزنه شمارش، موجب تولید موج M شکل یا موج ناهنجار بزرگ و پهن می گردد.

عبور غیرمرکزی ذرات یا جریان غیرمحوری ذرات (Nonaxial Particle Flow)

در سیستم امپدانس چنانچه سلولی دقیقاً از مرکز روزنه عبور کند، تولید ولتاژی متناسب با حجم خود خواهد کرد. عبور سلول‌ها از اطراف روزنه، تولید ولتاژ بیش از حد[1] می‌کند که در نتیجه موجب گزارش اشتباه در شناسایی سلول‌ها می‌شود. برای رفع این پدیده، برخی از آنالیزورها با سیستم ویرایشگر، پالس های با ارتفاع بسیار بلند را که در اثر عبور ذرات از کناره های روزنه بوده، حذف کرده و در برخی دیگر با استفاده از محلول Sheath سلول‌های خونی را به طرف مرکز روزنه هدایت می‌کنند.

پدیده گردابی یا بازگردشی (Pulse recirculation)

گاهی اوقات سلول‌هایی که از روزنه خارج شده اند دچار حرکت گردابی یا بازگردشی شده و دوباره به روزنه نزدیک می‌شوند و پالس های کوتاهی شبیه پالس های پلاکتی ایجاد می‌کنند که در نهایت منجر به افزایش کاذب در شمارش پلاکت‌ها خواهند شد. سلول‌های دارای حرکت گردابی حتی ممکن است وارد روزنه شده و از نو شمارش شوند و بدین ترتیب شمارش کاذب اریتروسیت‌ها را نیز افزایش می‌دهند. در برخی از آنالیزورها یک جریان جاروب گر[2] در پشت ناحیه حساس روزنه قرار دارد که سلول‌های شمرده شده را از ناحیه روزنه دور کرده و از ایجاد پدیده گردابی جلوگیری می‌کند.



شکل ۳-۴: پدیده گردابی یا بازگردشی

** برای کاهش دادن پدیده عبور همزمان و پدیده بازگردشی، از تکنولوژی تمرکز هیدرودینامیک[3] یا از مایع غلاف[4] استفاده می‌شود. مایع غلاف دارای دانسیته بالا بوده و مانند غلافی مسیر عبور سوسپانسیون را از روزنه احاطه می‌کند و از این رو موجب می‌شود که سلول‌ها در یک حرکت خطی از مرکز روزنه عبور کنند.

فاکتور شکل (Shape factor)

شکلی که سلول به هنگام عبور از روزنه به خود می گیرد، می‌تواند حجم ظاهری اندازه‌گیری شده توسط دستگاه را تحت تأثیر قرار دهد. عبور گلبول‌های قرمز از روزنه بصورت سیگار شکل است، بنابراین چنانچه گلبول قرمز فوق العاده هیپوکروم باشد، مانند مورفولوژی Anulocyte و یا Leptocyte که تنها غشای گلبول قرمز بصورت حلقه ای باقی است، در هنگام عبور از روزنه، سیگاری بسیار کشیده شده و در نهایت MCV کمتر از میزان واقعی گزارش می‌شود. متعاقب این حالت، میزان هماتوکریت نیز کاهش یافته و پارامتر MCHC بطور کاذب افزایش می یابد. گلبول‌های قرمز با مورفولوژی اسفروسیت قابلیت سیگاری شدن نداشته و میزان MCV آنها تا ۱/۵ برابر مقدار واقعی گزارش می‌شود.

---

[1] Aberrant pulse
[2] Sweep flow
[3] Hydrodynamic Focusing method. جهت آشنایی با این روش، به کتاب اصول کار و منابع خطا در آنالیزورهای هماتولوژی، تألیف علی ملکی، مراجعه بفرمایید.
[4] Sheath fluid

** چند نکته:

- قبل از شروع بکار با سل‌کانتر، آخرین جواب های محلول ایزوتون شستشو یا همان Background count باید حداقل به شرح زیر باشد:

RBC: < 300000/mm^3
WBC: < 400/mm^3
Hb: < 0.2 g%
PLT: < 5000/mm^3

- جرم گرفتگی روزنه آنالیزورها با پروتئین ها و لاشه های سلولی، موجب اختلال در عملکرد ناحیه حسگر شمارش شده که نتیجه آن کاهش کاذب شمارش سلولی و گزارش کاذب افزایش حجم سلولی به علت افزایش مقاومت سلول در روزنه تنگ شده خواهد بود.

روش‌های نوری (Optical methods)

روش‌های نوری مختلفی در آنالیزورهای هماتولوژی جهت شمارش سلولی بکار گرفته شده است. عمده ترین روش مورد استفاده در سیستم های نوری، بر پایه خاصیت پراکنش نور توسط سلول عمل می‌کند. این روش در غالب اوقات با رنگ‌آمیزی سیتوشیمیایی سلول همراه است.

بطور کلی اساس روش‌های پراکنش نور[1] بدین صورت است که سلول‌های خونی رقیق شده (سوسپانسیون سلولی) از یک لوله باریک کوارتز عبور داده می‌شوند. عبور سلول‌ها از لوله مذکور موجب آرایش سلول‌ها در یک ردیف پشت سر هم می‌شود که آن را Flow cell می نامند. در کانال فلوسل، سلول‌ها در محل خاصی از مقابل منبع نوری عبور کرده و مورد اصابت پرتوهای نوری (لیزری و یا غیر لیزری) قرار می گیرند. بسته به نور موجود و وضعیت سلول، نور اصابت کرده ممکن است جذب سلول شود، برگشت پیدا کند (بازتابش)، در جهت های گوناگون پراکنده شود و ... که در سیستم های مختلف برای هر مورد آشکارسازهای مناسبی تعبیه شده است.

پارامترهای سلولی از قبیل اندازه، لوبولاسیون هسته و گرانول‌های سیتوپلاسمی روی میزان پراکنش نور در زوایای مختلف اثرگذار هستند. برای مثال سنجش پراکنش نور در زاویه روبرو[2] با نور تابشی، متناسب با حجم سلول و پراکنش نور در زاویه ۹۰ درجه[3] در ارتباط با ساختار سلولی مانند هسته و گرانول‌ها می‌باشد.

علاوه بر پراکندگی، بخشی از نور تابشی به سلول، می‌تواند در طول موج های خاصی جذب شود. سیستم های اپتیکال به این جزء از نور نیز حساس بوده و می‌توانند آن را مورد ارزیابی و سنجش قرار دهند. در واقع جهت تقویت و افزایش این میزان جذب، در مدل های مختلف آنالیزورهای اپتیک، سلول‌ها به روش‌های مختلفی رنگ‌آمیزی می‌شوند.

منابع خطا در شمارش سلول‌ها و اندازه‌گیری پارامترها

لکوسیتوز کاذب

- **لیز نشدن گلبول‌های قرمز:** مقاومت گلبول‌های قرمز در برابر لیز با محلول لیزینگ سل‌کانتر موجب افزایش کاذب گلبول‌های سفید می‌شود. در اینصورت گلبول قرمز به عنوان لنفوسیت شمارش شده و درصد لنفوسیت بطور

[1] Electro-optical technology
[2] Forward scatter
[3] Side scatter (Orthogonal)

کاذب افزایش پیدا می‌کند. لیز نشدن گلبول‌های قرمز در موارد متعددی رخ می دهد، از جمله: حضور NRBC، تجمع پلاکتی، وجود پلاکت‌های غول آسا، گلبول‌های F دوران جنینی نوزادی، تارگت سل در بیماری های کبدی، گلبول‌های قرمز در هموگلوبینوپاتی ها[1]، کرایوگلوبولین و پاراپروتئین ها، هیپرلیپیدمی و حضور شیلومیکرون، وجود انگل مالاریا

- **خطای انتقالی (Carry over):** در این حالت چنانچه نمونه یک بیمار مبتلا به لکوسیتوز به آنالیزور داده شود و سپس بدون شستشو (Auto rinse) نمونه بعدی به دستگاه داده شود، آلودگی محفظه شمارش با گلبول‌های سفید نمونه قبلی موجب انتقال آنها به نمونه جدید شده و باعث افزایش کاذب لکوسیت‌ها می‌شود. این مسأله ممکن است منجر به لکوسیتوز در بیمار طبیعی یا نرمال شدن تعداد گلبول‌ها سفید در بیمار مبتلا به لکوپنی گردد. در صورتی که نمونه دارای لکوسیتوز شدید است، دستگاه را باید چند مرتبه شستشو داده و سپس نمونه بعدی را مورد آزمایش قرار داد.
- وجود هموگلوبین‌های غیرطبیعی مانند AS، SS، AC، AE، AD و AO-Arab
- سندروم‌های میلودیسپلاستیک
- آنمی مگالوبلاستیک
- بعد از برداشتن طحال
- وجود رشته‌های فیبرین
- اورمی
- آلوده شدن نمونه به چربی زیرجلدی
- وجود هموگلوبین‌های ناپایدار

لکوپنی کاذب

- **خطای خطی بودن (Linearity error):** گاهی شمارش زیاد گلبول‌های سفید، خارج از محدوده خطی بودن آنالیزور است که منجر به شمارش پایین گلبول‌های سفید می‌شود. در این حالت بایستی نمونه را ۱:۲ یا ۱:۳ با سرم فیزیولوژی رقیق کرد و به دستگاه داد.
- **لکوآگلوتینین (Leukoagglutinine):** تجمع گلبول‌های سفید یا گلبول‌های سفید و پلاکت‌ها به دنبال وجود آنتی بادی یا تغییر در غشاء سلولی یا وجود سلول‌های نئوبلاستیک با ویژگی های غیرطبیعی نظیر تجمع نوتروفیلی با واسطه آنتی بادی، تجمع سلول‌های لنفومی و یا سلول‌های نئوپلاستیک پلاسماسلی
- وجود سلول‌های smudge و ائوزینوفیل‌های ترد و شکسته شده که به عنوان سلول شمرده نمی‌شوند.
- لیز سلول‌ها و از هم پاشیدگی آنها بدلیل ماندن خون بیش از ۳ روز
- نگهداری نمونه در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت
- اورمی که ممکن است موجب کاهش یا افزایش کاذب گلبول‌های سفید شود.
- وجود آگلوتینین های سرد قوی
- لخته شدن خون

[1] اکثر مواردی که با لکوسیتوز کاذب همراه هستند، منجر به افزایش کاذب هموگلوبین و کدورت محلول درابکین می‌شوند. با این خطای آزمایشگاهی، گاهی می‌توان یک هموگلوبینوپاتی ناشناخته را تشخیص داد!

اریتروسیتوز کاذب

- وجود پلاکت‌های غول آسا
- لکوسیتوز شدید (بیش از ۵۰۰۰۰) که باعث افزایش کاذب Hb و MCV نیز می‌شود. دقت کنید که گلبول‌های سفید در هنگام شمارش گلبول‌های قرمز، لیز نمی‌شوند زیرا که خون تنها با ایزوتون رقیق شده و آسیبی به گلبول‌های سفید وارد نمی‌شود.
- وجود کرایوگلوبولین و کرایوفیبرینوژن و همچنین هیپرلیپیدمی که بصورت ذرات سلولی شمارش می‌شوند.

اریتروپنی کاذب

- میکروسیتوز شدید موجب کاهش شمارش گلبول‌های قرمز و در مقابل شمارش آنها به عنوان پلاکت می‌شود.
- پان آگلوتیناسیون ناشی از ایجاد آگلوتینین های سرد وابسته به EDTA
- همولیز (در محیط آزمایشگاه)
- لخته شدن

ترومبوسیتوز کاذب

- **بیماری هموگلوبین H:** زمانی که شمارش پلاکتی سل‌کانتر در حدود میلیون بوده و مورفولوژی گلبول‌های قرمز میکروسیت هیپوکروم باشد ولی گستره محیطی شمارش نرمال پلاکت را نشان دهد، رنگ‌آمیزی حیاتی را انجام داده و اقدام به تشخیص Hb-H می‌کنیم. نکته جالب اینکه یک خطای آزمایشگاهی در شمارش پلاکت منجر به تشخیص یک هموگلوبینوپاتی مهم می‌شود.
- **گلبول‌های سفید خرد شده:** حضور قطعات سیتوپلاسمی گلبول‌های سفید، بویژه در شیمی درمانی موجب افزایش کاذب پلاکت می گردد.
- در کم خونی های الیپتوسیتوز همولیتیک و پیروپویکیلوسیتوز ارثی و سوختگی، حجم متوسط گلبول‌های قرمز در آستانه ۳۰–۵۰fL قرار گرفته و تعداد زیادی از آنها به عنوان پلاکت شمارش می‌شوند.
- افزایش نامتناسب ضدانعقاد به نمونه خون وجب تورم پلاکتی می گردد. پلاکت متورم شده با ترکیدن و تولید پاره های پلاکتی موجب می‌شود که هر تکه به عنوان یک پلاکت شمارش شود.
- میکروسیتوز شدید و حضور گلبول‌های شکسته، که به عنوان پلاکت شمارش می‌شوند.
- همولیز در محیط آزماشگاه و در بدن
- وجود کرایوگلوبولین و کرایو فیبرینوژن
- وجود انکلوژن ها درون گلبول‌های قرمز
- هیپرلیپیدمی
- وجود میکروارگانیسم ها در نمونه خون

** وجود گلبول‌های شکسته به همراه کاهش پلاکت، از یافته های آزمایشگاهی چند بیماری مهم و تهدید کننده حیات از جمله DIC[1]، TTP[2] و HUS[3] می‌باشند. در صورت مشاهده گلبول‌های قرمز شکسته در گستره خون محیطی، شمارش پلاکتی

[1] Disseminated Intravascular Coagulation
[2] Thrombolytic Thrombocytopenic Purpura
[3] Hemolytic Uremic Syndrome

سل‌کانتر باید تصحیح شود، در غیر اینصورت، با توجه به افزایش کاذب شمارش پلاکت توسط سل‌کانتر، بیماری های ذکر شده تشخیص داده نخواهند شد.

ترومبوسیتوپنی کاذب

- **پدیده اقماری پلاکت‌ها[1]:** پلاکت‌ها به دور یک نوتروفیل یا منوسیت یا لنفوسیت به واسطه آنتی بادی، حلقه زده و توسط سل‌کانتر شمارش نمی‌شوند. این حالت ناشی از فعال شدن اتوآنتی بادی های پلاکتی در حضور ضدانعقاد EDTA می‌باشد.
- **توده ای شدن پلاکت‌ها[2]:** پلاکت‌ها در پدیده تجمعی بصورت دستجات چندتایی در سراسر گستره محیطی مشاهده می‌شوند. هر تجمع توسط سل‌کانتر به عنوان یک گلبول سفید شمارش می‌شود و در نتیجه منجر به افزایش کاذب WBC و کاهش کاذب پلاکت می‌شود. همانند اقماری شدن، پدیده تجمعی نیز ناشی از فعال شدن اتوآنتی بادی های پلاکتی است.
- **وجود پلاکت‌های درشت و غول آسا[3]:** این پلاکت‌ها ممکن است در آستانه شمارش گلبول قرمز قرار گرفته و به عنوان پلاکت شمارش نشوند. این حالت بیشتر در ترومبوسیتوپنی ایمونولوژیک (سندرم برنارد)، آنومالی مای هگلین و اختلالات میلوپرولیفراتیو دیده شود.
- هپارین
- لخته شدن خون

افزایش کاذب هموگلوبین

- حضور کربوکسی هموگلوبین
- وجود کرایوگلوبولین و کرایوفیبرینوژن
- لکوسیتوز (بالای ۵۰۰۰۰ در میکرولیتر)
- هیپرلیپیدمی
- هیپربیلیروبینمی
- هیپر پروتئینمی
- عدم لیز RBCها

** تشخیص افزایش کاذب میزان هموگلوبین ممکن است مشکل باشد زیرا که در چنین حالتی هیستوگرام ها و اندکس های گلبول قرمز طبیعی بنظر می رسند. شایعترین حالات افزایش کاذب هموگلوبین، از تغییر در کدورت محلول درابکین ناشی می‌شوند که عبارتند از: لکوسیتوز، هیپرلیپیدمی، هیپرپروتئینمی و عدم لیز اریتروسیت‌ها. زمانی که لکوسیتوز عامل کدورت درابکین باشد، می‌توان با سانتریفیوژ کردن لوله و استفاده از محلول رویی جهت خوانش، این مشکل را برطرف کرد. البته در برخی آنالیزورهای جدید هماتولوژی، کانال هموگلوبین از کانال شمارش WBC جدا شده و با استفاده از یک محلول لیز کننده قوی که گلبول‌های سفید را نیز لیز میکند، بطور کامل مشکل را برطرف کرده اند.

[1] Platelet Satellitism
[2] Platelet Aggregation
[3] Giant Platelet

** کدورت به هر علتی که باشد، با افزایش کاذب غلظت هموگلوبین، MCH و MCHC را نیز بطور باور نکردنی بالا می برد. از آنجا که پارامتر MCHC تنها در اسفروسیتوز ارثی و یا اسفروسیتوز ناشی از کم‌خونی اتوایمیون بالا می رود، افزایش آن را می‌توان بعنوان هشداری بر وقوع خطا در اندازه‌گیری هموگلوبین در نظر گرفت، مگر اینکه اسفروسیتوز در بیمار اثبات شود.

کاهش کاذب هموگلوبین

- افزایش سولفوهموگلوبین که به سیانومت‌هموگلوبین تبدیل نشده و باعث کاهش میزان هموگلوبین بطور کاذب می‌شود.
- لخته شدن

افزایش کاذب MCV

- لکوسیتوز شدید (بالای ۵۰۰۰۰)
- **ماندن خون** در دمای اتاق باعث تورم گلبول‌های قرمز و افزایش حجم به میزان ۶fL در ۲۴ ساعت و ۹fL در ۴۸ ساعت می‌شود.
- وجود **آگلوتینین های سرد** باعث چسبیدن گلبول‌های قرمز به یکدیگر، کاهش کاذب RBC و هماتوکریت و در نهایت افزایش MCV، MCH و MCHC می‌شوند. در این حالت MCV بیش از ۱۳۰fL و میزان MCHC به بالای ۴۰g/dL می رسد. میزان هموگلوبین تحت تأثیر آگلوتینین های سرد قرار نمی گیرد و بنابراین نسبت به تعداد گلبول قرمز دارای تناقض آشکار می‌باشد. با گرم کردن نمونه خون و یا محلول ایزوتون، این مشکل برطرف می‌شود.
- **کاهش قابلیت ارتجاعی گلبول‌های قرمز:** همانگونه که قبلاً ذکر شد، گلبول قرمز جهت عبور از روزنه، بصورت سیگاری شکل در می آید. در گلبول‌های قرمز اسفروسیت بدلیل مقاومت سلول، تغییر شکل صورت نمی گیرد و بطور کاذب MCV بالا گزارش می‌شود.
- میکروسیتوز شدید با قرار دادن گلبول‌های قرمز در آستانه شمارش پلاکت، هم باعث افزایش میزان پلاکت بطور کاذب شده و هم با حذف گلبول‌های میکروسیت از جمعیت گلبول‌های قرمز، باعث افزایش کاذب MCV می‌شود.
- **پدیده تورم حاد**[1] با افزایش کاذب MCV و کاهش کاذب MCHC همراه است. این حالت در موارد هیپراسمولاریتی مانند هیپرگلیسمی شدید، هیپرناترمی و هیپراورمی دیده می‌شود. در این حالت گلبول قرمز که از اسمولاریته بیشتری نسبت به محلول ایزوتون برخوردار است، با قرار گرفتن در مجاورت آن، آب را جذب کرده و متورم شده و باعث افزایش کاذب MCV می‌شود.
- رسوب تدریجی پروتئین در اطراف روزنه دستگاه موجب تنگ شدن دریچه و کاهش سرعت جریان سلولی به داخل آن می‌شود که این امر منجر به افزایش کاذب MCV می‌شود. شستشوی روزانه دستگاه با محلول Cell Clean به رفع این مشکل کمک می‌کند.

[1] Acute swelling

کاهش کاذب MCV

- در هیپواسمولاریتی پلاسما عکس پدیده تورم رخ می دهد و میزان MCV و هماتوکریت بطور کاذب پایین و میزان MCHC بطور کاذب افزایش می یابد. این حالت در الکلیسم مزمن، هیپوناترمی و ترشح نامناسب ADH دیده می‌شود.
- در هیپوکروم شدید مانند گلبول‌های آنولوسیت و لپتوسیت، گلبول‌های قرمز در هنگام عبور از روزنه، سیگاری بسیار کشیده شده و میزان MCV آنها بطور کاذب پایین و میزان MCHC بطور کاذب بالا گزارش می‌شود.
- افزایش نسبت ضد انعقاد EDTA به خون باعث چروکیدگی گلبول‌های قرمز و در نتیجه کاهش MCV می‌شود.
- حضور کرایوگلوبولین و کرایوفیبرینوژن
- وجود پلاکت‌های غول آسا
- همولیز در محیط آزمایشگاه

منابع خطا در اندازه‌گیری هماتوکریت

اکثر آنالیزورهای هماتولوژی هماتوکریت را از حاصلضرب MCV در میزان RBC محاسبه می‌کنند و بنابراین عوامل خطا در MCV و RBC می‌توانند باعث ایجاد خطا در میزان هماتوکریت شوند.

منابع خطا در پارامترهای MCH و MCHC

این پارامترها نیز محاسباتی بوده و از طریق Hb و HCT و RBC بدست می آیند و بنابراین افزایش یا کاهش کاذب آنها معمولاً ثانویه و در نتیجه خطا در محاسبه سایر پارامترهاست. دقت شود که افزایش MCHC بسیار نادر بوده و تنها در موارد اسفروسیتوز دیده می‌شود و بنابراین هرگونه افزایش غیرطبیعی در MCHC را بایستی معیار مناسبی جهت پیگیری خطای احتمالی تلقی کرد. افزایش کاذب MCH در موارد افزایش کاذب هموگلوبین یا کاهش کاذب گلبول قرمز رخ می دهد و در حالت عکس، کاهش کاذب MCHC را بدنبال دارد.

کنترل کیفی و کالیبراسیون دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی (سل‌کانترها)

سل‌کانترها دستگاه‌هایی قابل تنظیم بوده و باید با روش‌های مرجع کالیبره شوند. البته این دستگاه‌های نسبتاً پایدار نیازی به کالیبراسیون پیوسته ندارند. راه اندازی اولیه دستگاه، تعویض قطعاتی که در اندازه‌گیری پارامترها نقش دارند، استفاده از معرف های با سری ساخت متفاوت، وقوع خطاهای سیستمیک در نمودار کنترل کیفی و سفارش شرکت سازنده، مواردی هستند که نیاز به کالیبراسیون دستگاه را مطرح می سازند. در واقع کالیبراسیون به منظور تصحیح هرگونه عدم صحت ناشی از عملکرد سیستم های نوماتیک، هیدرولیک و الکتریک سل‌کانتر انجام می گیرد.

کالیبراتور ماده ای است که برای کالیبراسیون روش آزمایشگاهی مورد استفاده قرار می گیرد و مقدار مشخصی دارد، درحالیکه مواد کنترلی که برای کنترل کیفیت روش آزمایشگاهی استفاده می‌شوند، دارای محدوده غلظتی می‌باشند. بنابراین هیچگاه مواد کنترلی به عنوان جایگزین کالیبراتور مورد استفاده قرار نمی گیرند.

کالیبراسیون

قبل از اقدام به کالیبراسیون سل‌کانتر، باید از صحت عملکرد قسمت های مختلف دستگاه اطمینان حاصل کرد. برخی از اقداماتی که انجام آنها پیش از آغاز کالیبراسیون ضرورت دارد، به شرح زیر می‌باشند:

- **ارزیابی کلی دستگاه و معرف ها:** بایستی از عملکرد طبیعی دستگاه، کافی بودن معرف ها و دسترسی به تمام مواد مورد نیاز اطمینان حاصل شود.
- **ارزیابی شمارش زمینه ای دستگاه:** لازم است که Background count سل‌کانتر در محدوده های قابل قبول باشد.
- **ارزیابی میزان دقت (تکرار پذیری) دستگاه:** تا زمانی که سل‌کانتر قابلیت تکرار پذیری نتایج را نداشته باشد، نمی‌توان آن را به شکل مناسبی کالیبر کرد.

برای کالیبراسیون دستگاه، کالیبراتورهای تجاری وجود دارد که مقادیر مورد نظر در آنها با روش‌های مرجع[1] اندازه‌گیری شده است. در صورتیکه این سوسپانسیون ها دارای تاریخ انقضای معتبر و تأییدیه های لازم باشند و به شرطی که دستورالعمل های شرکت سازنده رعایت شوند، جهت کالیبراسیون مناسب هستند. در صورت عدم دسترسی به کالیبراتور تجاری و یا شک به اعتبار آنها، می‌توان از خون کامل و تازه جهت انجام کالیبراسیون استفاده کرد.
لازم به ذکر است که سل‌کانترها از نظر پارامترهای قابل کالیبراسیون توسط کاربر، متفاوت هستند. در برخی از این دستگاه‌ها پارامترهای متعددی نظیر MCV، Hb، RBC، PLT، WBC و حتی MPV توسط کاربر قابل کالیبراسیون هستند و در برخی دیگر، نظیر مدل های K دستگاه‌های سیسمکس، تنها دو پارامتر Hb و HCT توسط کاربر کالیبر می‌شوند و کالیبراسیون سایر پارامترها از طریق کارخانه سازنده و شرکت پشتیبان صورت می گیرد.

جهت انجام کالیبراسیون به روش دستی، نیاز به محاسبه فاکتور یا ضریب کالیبراسیون[2] (فاکتور تصحیح[3]) داریم. CF عددی است که بصورت درصد محاسبه شده و در حقیقت ضریبی است که به مقادیر اندازه‌گیری شده داده می‌شود تا آنها را به مقادیر واقعی نزدیک نماید. این فاکتور در روش اتوماتیک کالیبراسیون، توسط خود دستگاه محاسبه شده و در کالیبراسیون اعمال می گردد.
برای محاسبه CF پارامترهای حداقل سه نمونه خون کامل طبیعی (Hb>۱۰g/dL و ۵۵٪ <HCT< ۳۵/۵٪)، حداقل دوبار با روش دستی و دوبار با روش دستگاهی اندازه‌گیری شده و پس از محاسبه میانگین نتایج هر پارامتر با روش دستی و دستگاهی، ضریب کالیبراسیون جدید با استفاده از فرمول زیر تعیین می‌شود. بدیهی است با افزایش تعداد نمونه‌ها، دقت کالیبراسیون بیشتر می‌شود.[4]

$$\text{ضریب کالیبراسیون} = \frac{\text{میانگین روش دستگاهی} - \text{میانگین روش دستی}}{\text{میانگین روش دستگاهی}} \times 100$$

[1] روشهای مرجع برای اندازه‌گیری هموگلوبین، هماتوکریت و شمارش گلبول‌های سفید به ترتیب سیانومت‌هموگلوبین، میکروهماتوکریت و استفاده از لام نئوبار اصلاح شده می‌باشند. البته در کتب مرجع، روش مرجع جهت شمارش سلول‌های خونی، آنالیزورهای تک کاناله عنوان شده است که در ایران بعلت عدم دسترسی به این تجهیزات، کماکان از لام نئوبار (هماسیتومتر) استفاده می‌شود.

[2] Calibration Factor (CF)
[3] Correction Factor (CF)

[4] بر اساس توصیه Britin و Gilmer، ۱۰ و ترجیحاً ۲۰ نمونه خون تازه EDTAدار جهت محاسبه CF بایستی جمع آوری شوند.

مثال:

برای کالیبراسیون هماتوکریت، ۵ نمونه خون تازه را هر کدام سه بار با روش دستی مرجع و روش دستگاهی به شرح زیر اندازه‌گیری کرده‌ایم:

	روش دستی مرجع				روش دستگاهی			
	بار اول	بار دوم	بار سوم	میانگین	بار اول	بار دوم	بار سوم	میانگین
نمونه اول	۴۵	۴۶	۴۵	۴۵/۳	۴۳	۴۳	۴۴	۴۳/۳
نمونه دوم	۴۰	۳۹	۴۱	۴۰	۳۸	۳۹	۳۸	۳۸/۳
نمونه سوم	۴۷	۴۷	۴۸	۴۷/۳	۴۵	۴۶	۴۵	۴۵/۳
نمونه چهارم	۳۸	۳۶	۳۶	۳۶/۷	۳۴	۳۵	۳۴	۳۴/۳
نمونه پنجم	۵۲	۵۳	۵۴	۵۳	۵۰	۵۱	۴۹	۵۰

$$CF_1 = \frac{45.3 - 43.3}{43.3} \times 100 \rightarrow \%4.6$$

$$CF_2 = \frac{40 - 38.3}{38.3} \times 100 \rightarrow \%4.4$$

$$CF_3 = \frac{47.3 - 45.3}{45.3} \times 100 \rightarrow \%4.4$$

$$CF_4 = \frac{36.7 - 34.3}{34.3} \times 100 \rightarrow \%7.0$$

$$CF_5 = \frac{53 - 50}{50} \times 100 \rightarrow \%6.0$$

$$\Rightarrow \overline{x}CF = \frac{4.6+4.4+4.4+7+6}{5} = \frac{26.4}{5} = \%5.3$$

میانگین فاکتور تصحیح در مثال فوق برای هماتوکریت ۵/۳٪ می‌باشد و چون علامت آن مثبت است، نشان می دهد که سل‌کانتر میزان هماتوکریت را ۵/۳٪ کمتر از روش مرجع دستی گزارش می‌کند و بنابراین فاکتور هماتوکریت در دستگاه باید به میزان ۵/۳ افزایش پیدا کند. در بعضی از انواع سل‌کانترها، ضریب کالیبراسیون جدید با استفاده از فرمول کالیبراسیون زیر محاسبه می‌شود:

$$\text{ضریب کالیبراسیون} = \text{ضریب کالیبراسیون قبلی} \times \frac{\text{میانگین روش دستی}}{\text{میانگین روش دستگاهی}}$$

کنترل کیفی

روش‌های کنترل کیفی به دو دسته کنترل کیفی داخلی[1] و کنترل کیفی خارجی[2] طبقه بندی می‌شوند. IQC بطور اولیه دقت و تکرارپذیری آزمایش‌های روزانه را کنترل می‌کند و دارای روش‌های گوناگونی می‌باشد. EQC از طریق سازمان های منطقه ای مانند آزمایشگاه مرجع کل یا آزمایشگاه رفرانس هر استان انجام گرفته و هدف آن نظارت بر کنترل کیفی داخلی آزمایشگاه است. در این روش، نمونه‌های مشخص به تمام آزمایشگاه ها ارسال شده و از آزمایشگاه درخواست می‌شود که نمونه را همراه با نمونه‌های بیماران آزمایش کرده و جواب ها را برای سازمان ارسال کنند.

[1] Internal Quality Control (IQC)
[2] External Quality Control (EQC)

خطاهای مشاهده شده در حین کار به دو دسته سیستمیک و تصادفی تقسیم می‌شوند. خطای سیستمیک[1] قاعده‌مند بوده و تا زمانی که علت ردیابی نشود نتایج تمام آزمایش‌ها را با الگوی یکسان تحت تأثیر قرار می دهد. از این رو در چارت کنترل کیفی از نظم برخوردار بوده و معمولاً بصورت شیب[2] کاهنده یا افزاینده و یا الگوی جابجایی[3] نمایان می‌شود و بر خلاف خطای تصادفی[4] با تکرار آزمایش برطرف نمی‌شود. برای کشف خطای سیستمیک نیاز به داده های خون کنترل در چندین روز است. خطای تصادفی یکسری از نتایج را تحت تأثیر قرار داده و اثرات قابل توجهی بر روی میزان انحراف معیار می گذارد. تکرار آزمایش غالباً پاسخ درست می دهد.

خون کنترل

طبق توصیه های منابع معتبر بین المللی خون‌شناسی، برای کنترل کیفی سل‌کانترها، باید در هر سری کاری حداقل از دو نمونه خون کنترل در دامنه طبیعی و غیرطبیعی استفاده کرد. به این ترتیب که در ابتدای هر سری کاری، نمونه کنترل طبیعی و غیرطبیعی و در پایان، نمونه طبیعی به دستگاه داده شود و نتایج حاصله ثبت و تفسیر شود. خون کنترل حداقل ۲۰ نوبت کاری به دستگاه داده می‌شود و سپس مقادیر $\bar{x}$ و SD محاسبه می گردد. استفاده از میانگین و دامنه بروشور برای رسم نمودار توصیه نمی‌شود. ضمن اینکه انطباق نتایج خون کنترل با دامنه ذکر شده به معنای کنترل کیفی مناسب نمی‌باشد.

هر آزمایشگاه بر اساس اهداف کیفیتی که برای نتایج آزمایش‌های خود در نظر دارد می‌تواند نمودار کنترل کیفی را بر اساس قوانین Levy-Jening و Westgard یا WHO تفسیر کند. با استفاده از نمودار کنترل کیفی می‌توان خطاهای تصادفی و سیستماتیک را در صورت بروز مشخص کرد.

تفسیر نمودار کنترل کیفی بر اساس قوانین سازمان بهداشت جهانی (WHO)	
One control value outside the mean $\pm 2_{SD}$	Warning
One control value outside the mean $\pm 3_{SD}$	Reject: SE or RE
Two consecutive controls exceed mean $\pm 2_{SD}$	Reject: SE
Four consecutive controls exceed mean $+1_{SD}$ or mean -1_{SD}	Reject: SE
Six consecutive controls on one side of the mean	Warning: SE

تفسیر نمودار کنترل کیفی براساس قوانین وستگارد

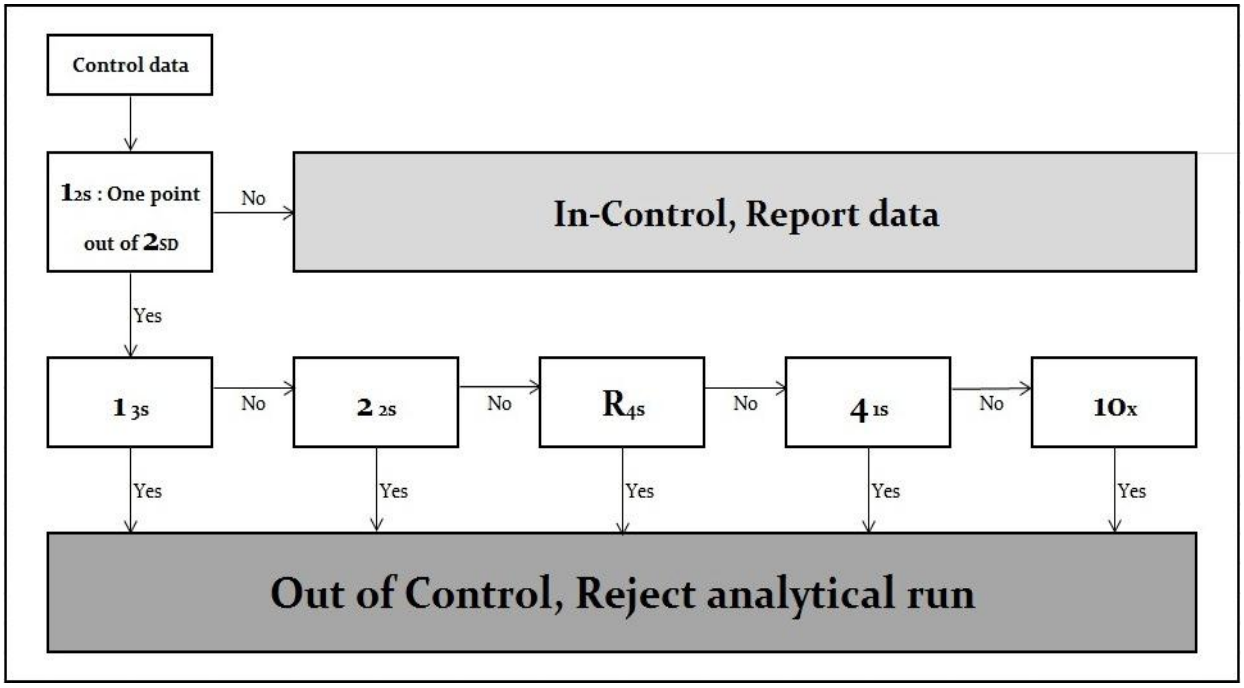
نتیجه	توضیح	تفسیر
1_{2S}	یک کنترل خارج از محدوده $\pm 2_{SD}$	هشدار، لزوم بررسی سایر قوانین
1_{3S}	یک کنترل خارج از محدوده $\pm 3_{SD}$	رد نتایج، نشان دهنده SE یا RE
2_{2S}	دو خوانده متوالی و همسو خارج از محدوده $\pm 2_{SD}$	رد نتایج، نشان دهنده خطای سیستماتیک
R_{4S}	یک خوانده خارج از محدوده $+2_{SD}$ و دیگری خارج از محدوده -2_{SD}	رد نتایج، نشان دهنده خطای تصادفی
4_{1S}	چهار خوانده متوالی و همسو خارج از محدوده $+1_{SD}$ یا -1_{SD}	رد نتایج، نشان دهنده خطای سیستماتیک
10_{x}	ده خوانده متوالی در یک طرف میانگین، بالا یا پایین میانگین و بدون توجه به انحراف معیار	رد نتایج، نشان دهنده خطای سیستماتیک

نتایج کنترل کیفی ابتدا بر اساس قانون 1_{2S} وستگارد (قانون هشدار دهنده[5]) بررسی می‌شوند و به همین ترتیب تمامی قوانین وستگارد در رابطه با پاسخ بدست آمده، مورد ارزیابی قرار می گیرند. چنانچه بجز قانون اول (قانون هشدار)، قانون دیگری هم

[1] Systemic error (SE)
[2] Trend
[3] Shift
[4] Random error (RE)
[5] Warning rule

نقض شود، عملکرد سل‌کانتر خارج از کنترل بوده و پاسخ ها غیرقابل قبول می‌باشند. قوانین چندگانه وستگارد بین دو سطح کنترلی و بیشتر نیز قابل استفاده می‌باشند.

در صورت مشاهده هرگونه خطا با استفاده از نمودار، ابتدا باید از آلوده یا خراب نبودن خون کنترل اطمینان حاصل کرد. با مطمئن شدن از این امر، پیش از برنامه ریزی برای کالیبراسیون دستگاه بایستی اقدامات دیگری از جمله شستشوی دستگاه، آزمایش مجدد نمونه کنترل، آزمایش بر روی نمونه کنترل دیگر با همان سری ساخت، بررسی وضعیت محلول های دستگاه و ... را مدنظر قرار داد.



شکل ۴-۴: الگوریتم بررسی قوانین وستگارد با استفاده از دو سطح کنترلی

کاربرد دیگر نمونه خون کنترل، شرکت در برنامه های کنترل کیفی خارجی (EQC) می‌باشد. در این روش نتایج آزمایشگاه با نتایج آزمایشگاه های دیگری که از همان کنترل استفاده می‌کنند، مقایسه می‌شود. نمونه‌های مجهول از مرکز مجری برنامه به آزمایشگاه های شرکت کننده ارسال می‌شود و آزمایشگاه ها پس از انجام آزمایش‌های لازم، نتایج را جهت پردازش به مرکز مجری عودت می‌دهند. پردازش نتایج به چند روش مختلف صورت می گیرد که متداول‌ترین آنها، روش تطبیق جواب ها[1] می‌باشد. در این روش نمونه‌های کنترلی یکسان جهت اندازه‌گیری یک پارامتر (بطورمثال هموگلوبین) به تمامی آزمایشگاه ها فرستاده شده و جواب ها دریافت می‌شود. میانگین و انحراف معیار (SD) پاسخ های دریافتی تعیین می‌شود. آن دسته از نتایج که

[1] Consensus method

در خارج از محدوده ±2SD قرار دارند، حذف می‌شوند و از مابقی نتایج، میانگین سنجیده یا وزن دار[1] و انحراف معیار وزن دار[2] بدست آمده و شاخص انحراف[3] از رابطه زیر محاسبه می‌شود:

$$DI = \frac{actual\ result - weighted\ mean}{weighted\ SD}$$

Actual result: جواب آزمایشگاه

<۰/۵	**عالی**
۰/۵-۱	**رضایت بخش**
۱-۲	**قابل قبول**
۲-۳	**غیرقابل قبول: کالیبراسیون آنالیزور**
>۳	**وجود نقص جدی**

در صورت عدم دسترسی به نمونه کنترل و یا شک به اعتبار آن و همچنین به منظور کنترل دقیق تر و بیشتر و ارزیابی کالیبراسیون در بخش هماتولوژی، می‌توان از روش‌های کنترلی دیگری نظیر پایداری کالیبراسیون، آزمون مضاعف، آزمون بازبینی، تست تکرارپذیری، آزمون دلتا و غیره استفاده کرد. در این روش‌ها از خون کامل تازه استفاده می‌شود.

آزمون پایداری کالیبراسیون[4]

بر اساس مشاهدات Britin هفت پارامتر مهم در آزمایش CBC، یعنی RBC، WBC، PLT، Hb، HCT، MCV، MCH و MCHC در خون حاوی EDTA به مدت ۲۴ ساعت در دمای یخچال پایدار هستند. این آزمایش که به آزمایش T-Student نیز معروف است بصورت زیر انجام می‌شود:

تعداد ۵ و یا ترجیحاً ۱۰ نمونه خون بیمار با مقادیر طبیعی را به دستگاه داده و آنها را در یخچال نگهداری می‌کنیم. روز بعد نمونه‌ها را از یخچال بیرون آورده و پس از آنکه به دمای اتاق رسیدند، مجدداً به دستگاه می‌دهیم. با اطمینان از اینکه درجه حرارت یخچال در مدت ۲۴ ساعت گذشته در محدوده ۴ درجه بوده، جواب های دو روز متوالی بایستی با یکدیگر همخوانی داشته باشند. برای اثبات همخوانی بین جواب های هر یک از پارامترها، از رابطه زیر استفاده می‌شود:

$$t_n = \frac{\overline{d}}{SD}\sqrt{n} \qquad SD = \sqrt{\frac{\sum d^2 - \frac{(\sum d)^2}{n}}{n-1}}$$

n: تعداد جفت های مورد بررسی d: اختلاف بین دو خوانده $\overline{d}$: میانگین اختلافات

در صورتیکه t_n بدست آمده برای ۵ نمونه از ۲/۷۸ و برای ۱۰ نمونه از ۲/۲۶ بیشتر باشد، با اطمینان ۹۵٪ می‌توان گفت که بین نتایج بدست آمده در دو روز متوالی، اختلاف معنی داری وجود دارد. وجود این اختلاف برای یک پارامتر، بیانگر اشکال احتمالی بوده که در صورت تداوم، برای رفع آن بایستی اقدام مناسب صورت بگیرد.

[1] Weighted mean
[2] Weighted SD
[3] Deviation Index (DI)
[4] T-Britin or T-Test

آزمایش دوتایی[1]

آزمایش دوتایی یا تست مضاعف، ساده ترین روش کنترل کیفی می‌باشد. ۱۰-۵ نمونه را هر کدام دو بار پشت سرهم به سل‌کانتر داده و با محاسبه اختلاف جواب های دوتایی، مقدار انحراف معیار از روی رابطه زیر بدست می آید:

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

پس از محاسبه SD، مقدار d یا همان اختلاف خوانده ها نباید بیش از ±2SD باشد. این روش تکرارپذیری آزایش ها را کنترل کرده و احتمال وجود خطای تصادفی را مطرح می‌کند. استفاده از تست دوتایی مشروط به کالیبراسیون دستگاه می‌باشد.

مثال: شمارش گلبول قرمز ۵ نمونه در دوبار آزمایش به ترتیب زیر است:

	1st count	***2st count***	***d***	***d^2***
1	4.67	4.87	0.2	0.04
2	5.01	4.75	0.26	0.0676
3	3.33	3.62	0.29	0.0841
4	4.00	4.45	0.45	0.2025
5	3.88	4.12	0.24	0.0576

$$SD = \sqrt{\frac{0.04 + 0.0676 + 0.0841 + 0.2025 + 0.0576}{10}} = \sqrt{\frac{0.4518}{10}} \Rightarrow SD = 0.21 \qquad \boldsymbol{2SD = 0.42}$$

تفاوت بیشتر از 2SD بین دو نتیجه آزمایش در نمونه چهارم (d=0.45) نشاندهنده بروز خطای تصادفی و لزوم تکرار آزمایش روی همان نمونه است.

آزمایش بازبینی[2]

برای انجام این روش، در ابتدای سری کاری صبح، ۱۰-۵ نمونه بیمار را پس از انجام آزمایش با سل‌کانتر با درب بسته در یخچال نگهداری کرده و در انتهای سری کاری یا بعد از ظهر و یا روز بعد، مجدداً آنها را آزمایش کنید. دقت شود پیش از انجام آزمایش، نمونه‌ها حتماً به دمای اتاق رسیده و سپس خوب مخلوط شوند. نتایج این دو آزمایش را می‌توان با همان فرمول آزمون دوتایی مقایسه نمود که بر مبنای آن و در صورت نگهداری نمونه‌ها در شرایط مناسب، اختلاف نتایج در محدوده $\pm 2_{SD}$ قابل قبول می‌باشد. این روش را می‌توان جهت شناسایی خرابی معرف ها و یا اشکال در عملکرد سل‌کانتر در فاصله زمانی انجام دو آزمایش بکار برد. لازم به ذکر است که اطمینان از شرایط مطلوب نگهداری نمونه‌ها ضروری بوده زیرا که در غیر اینصورت تغییرات رخ دهد غیرقابل تفسیر خواهند بود.

در صورتی که فاصله زمانی بین دو آزمایش بیش از ۶ ساعت در دمای آزمایشگاه باشد، این روش جهت هموگلوبین مناسب، جهت پارامترهای WBC و RBC نسبتاً مناسب و برای هماتوکریت و MCV نامناسب خواهد بود.

***** بهتر است نمونه‌هایی که برای آزمون دوتایی و بازبینی استفاده می‌شوند، یکسان باشند.***

[1] Duplicate test
[2] Check test

آزمایش دلتا یا چک دلتا[1]

در این روش نتایج کنونی بیمار با نتایج قبلی وی (حدود ۳-۲ هفته قبل) مقایسه می‌شوند. بنابراین در وهله اول، ثبت کامپیوتری نتایج بیماران الزامی است. در صورت ثابت بودن شرایط بیمار، نتایج وی نیز باید ثابت باشد اختلاف بین آزمایش‌های متوالی بیمار را در حالت ثابت، دلتا می گویند. این اختلاف بایستی اندک بوده و از حد خاصی تجاوز نکند.

اختلاف بین نتایج (دلتا) به دو روش محاسبه می‌شود:

الف) اختلاف درصدی (درصد دلتا) :

$$\text{درصد دلتا} = \frac{\text{پاسخ دوم} - \text{پاسخ اول}}{\text{پاسخ دوم}} \times 100$$

ب) اختلاف عددی (اختلاف دلتا):

مقادیر قبلی – مقادیر کنونی = اختلاف دلتا

برای بررسی دلتا، حداقل نیاز به دو سری آزمایش از یک بیمار است. در این روش داشتن محدوده تغییرات یا محدوده دلتا ضروری می‌باشد. بنابراین تعیین این محدوده از اهمیت ویژه ای برخوردار است. چنانچه این محدوده کوچک انتخاب شود، نتایج مثبت کاذب و چنانچه بزرگ انتخاب شود، نتایج منفی کاذب بدست خواهد آمد. محدوده دلتا از تغییرات فیزیولوژیک و ضریب تغییرات (CV) محاسبه می‌شود. جدول زیر مقادیر مجاز دلتا را برای پارمترهای CBC نشان می دهد:

پارامتر	مقدار دلتا
Hb	کمتر از ۱۰٪
HCT	کمتر از ۵٪
MCV	کمتر از ٦ فمتولیتر
MCH	کمتر از ٥ پیکوگرم
PLT	تغییرات بیش از ۵۰٪ خارج از محدوده دلتاست
RBC	کمتر از ۱۰٪
WBC	تغییرات از طبیعی به غیرطبیعی و یا از غیرطبیعی به غیرطبیعی فاحش، خارج از محدوده دلتاست. در کل تغییرات بیش از ۲۵-۲۰٪ خارج از محدود دلتا می‌باشد.

روش دلتا که رایج ترین روش کنترل کیفی با استفاده از نتایج بیماران است، به خطاهای نمونه‌گیری بسیار حساس است. گاهی در شرایط بالینی بیمار تغییرات زیادی ایجاد می‌شود که در چنین حالتی نمی‌توان از روش دلتا چک استفاده کرد. مثلاً در هماتولوژی تغییرات هموگلوبین و هماتوکریت و شمارش گلبول‌های قرمز و سفید و پلاکت بویژه در خونریزی ها و تزریق خون، بسیار زیاد است و یا در بیوشیمی به هنگام دیابت کنترل نشده، به علت تغییرات زیاد نمی‌توان آن را با دلتا چک تطبیق داد.

در صورتیکه نتیجه آزمایش دوم بیمار با نتیجه اول وی اختلاف خارج از محدوده دلتا داشته باشد، نباید بدون آزمایش مجدد پاسخ بیمار گزارش گردد. در این حالت آزمایش بایستی تکرار شود و یا از بیمار نمونه‌گیری مجدد صورت بگیرد.

در موارد زیر استفاده از روش دلتا جهت کنترل کیفی امکان پذیر نیست:

- بیمارانی که فقط یکبار به آزمایشگاه مراجعه می‌کنند و یا فواصل زمانی مراجعه آنها بسیار طولانی است.
- بیمارانی که تحت درمان فعال بوده و به آن پاسخ می‌دهند.
- بیمارانی که سیر بیماری در آنها فعال بوده و باعث تغییر در پاسخ های آنها می‌شود.

[1] Delta test or Delta check

آزمایش تکرارپذیری[1]

از این روش برای بررسی عدم دقت سل‌کانتر (CV) استفاده می‌شود. نتیجه مطلوب نشاندهنده پایداری و عدم نوسان دستگاه آنالیزور می‌باشد. برای انجام تست، ۲-۱ نمونه را ماهانه ۱۲ مرتبه پشت سرهم با سل‌کانتر مورد آزمایش قرار می‌دهیم و میانگین و انحراف معیار (SD) را برای هر پارامتر محاسبه کرده و در نهایت CV را بدست می آوریم:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n-1}} \quad \Rightarrow \qquad CV = \frac{SD}{x} \times 100$$

در فرمول فوق، n تعداد دفعاتی است که نمونه به سل‌کانتر داده می‌شود. میزان CV مجاز برای هر پارامتر بایستی توسط شرکت سازنده سل‌کانتر، در اختیار آزمایشگاه قرار بگیرد. برای مثال، میزان عدم دقت پارامتر پلاکت توسط شرکت Sysmex حدود ۶ عنوان شده است. نمونه را ۱۲ مرتبه به دستگاه داده و اعداد زیر بدست آمده است:

Count (×10³)	$x - \bar{x}$	$(x - \bar{x})^2$
157	-11.25	126.5625
166	-2.25	5.0625
159	-9.25	85.5625
177	8.75	76.5625
170	1.75	3.0625
158	-10.25	105.0625
163	-5.25	27.5625
175	6.75	45.5625
183	14.75	217.5625
173	4.75	22.5625
168	-0.25	0.0625
170	1.75	3.0625

$$\sum x = 2019 \;\Rightarrow\; \bar{x} = 168.25$$

$$\sum(x-\bar{x})^2 = 718.25$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n-1}} \Rightarrow SD = \sqrt{\frac{718.25}{11}} = 8.0806$$

$$CV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 \;\Rightarrow\; CV = \frac{8.0806}{168.25} \times 100$$

$$\Rightarrow \boldsymbol{CV = 4.8}$$

میزان CV بدست آمده در محدوده مجاز تعیین شده توسط شرکت سازنده بوده و بنابراین سل‌کانتر برای پارامتر پلاکت از دقت و تکرارپذیری مطلوبی برخوردار است.

توصیه می‌شود که عدم دقت دستگاه بویژه در هنگام نصب و راه اندازی، با استفاده از نمونه‌هایی با دامنه های طبیعی و غیرطبیعی بررسی شود. برای تهیه نمونه غیرطبیعی پایین، می‌توان از نمونه رقیق شده استفاده کرد، به این ترتیب که پلاسمای نمونه را جدا کرده و سپس حجمی از نمونه را با پلاسمای جدا شده مخلوط کرد. نمونه خون با دامنه غیرطبیعی بالا را نیز می‌توان با غلیظ کردن نمونه تهیه کرد. برای این کار باید ظرف نمونه را به مدت ۲ ساعت با زاویه ۴۵ درجه نگهداری کرد و سپس با برداشتن نیمی از پلاسمای ایجاد شده و مخلوط کردن باقیمانده پلاسمای در ظرف با خون، از آن به عنوان نمونه غیرطبیعی بالا استفاده نمود.

در صورت مطابقت نداشتن عدم دقت هر پارامتر با ادعای شرکت سازنده، ضروری است با شرکت پشتیبان تماس گرفته شود.

[1] Repeatability test

دستور کار آزمایشگاه خون‌شناسی

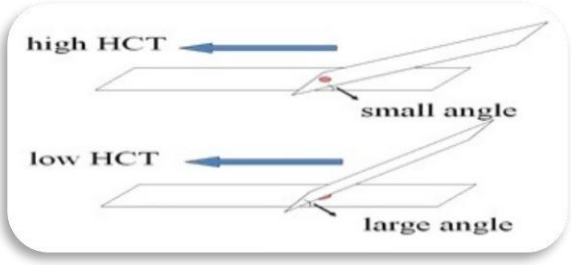
تهیه و رنگ‌آمیزی گستره خون محیطی

ارزیابی گستره خون محیطی، بخش مهمی از ارزیابی های هماتولوژیک می‌باشد. اعتبار اطلاعات بدست آمده، به تهیه مناسب و رنگ‌آمیزی خوب گستره بستگی دارد. تهیه گستره بایستی در عرض ۳-۲ ساعت پس از نمونه‌گیری صورت بگیرد.

تهیه گستره خون محیطی

روش گوه ای یا روش دو اسلایدی[1]، متداولترین روش تهیه گستره خون محیطی می‌باشد. در این روش، اسلاید دوم به عنوان پخش کننده[2] مورد استفاده قرار می گیرد. اسلاید پخش کننده باید دارای لبه های صاف و عرض کمتر از اسلاید گستره باشد، بطوری که حاشیه گستره محیطی قابل مطالعه باشد.

برای تهیه گستره با این روش، یک قطره ۳-۲ میلی‌متری از نمونه خون را که به خوبی مخلوط شده باشد، در انتهای یک سانتی متری از اسلاید تمیز و بدون گرد و خاک قرار داده، سپس اسلاید پخش کننده را با زاویه ۴۵-۳۰ درجه در جلوی قطره خون قرار دهید و به آرامی به عقب بکشید تا با قطره خون تماس پیدا کند. اجازه دهید تا خون در فاصله بین دو اسلاید پخش شود. پس از آن با سرعت متوسط و ثابت اسلاید پخش کننده را به سمت انتهای دیگر اسلاید گستره حرکت دهید تا خون بخوبی پخش شود. در افراد مبتلا به پلی سایتمی می‌توان زاویه ۲۵ درجه را برای تهیه گستره انتخاب کرد و در افراد مبتلا به کم‌خونی، زاویه را افزایش داد. دقت کنید که گستره بسیار نازک، موجب پخش نامنظم گلبول‌های سفید می‌شود.



شکل ۱-۵

[1] Wedge smear
[2] Spreader

بوسیله تکان دادن یا با استفاده از یک پنکه برقی، اسلاید سریعاً خشک می‌شود. هر چه گستره سریع تر در هوا خشک شود، سلول‌های جدا، بهتر روی اسلاید پخش می‌شوند. خشک شدن آهسته گسترش (به عنوان مثال در آب و هوای مرطوب)، موجب آرتیفکت هایی بصورت مچاله شدن سلول‌ها می‌شود.

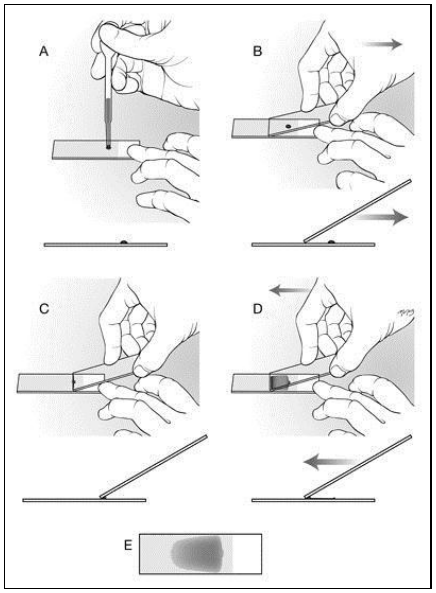
ویژگی های یک گستره محیطی خوب عبارتند از:

- گستره خونی باید ۲/۳ تا ۳/۴ طول اسلاید را بپوشاند.
- حاشیه ها قابل مطالعه باشند.
- گستره باید نازک، یکنواخت، بدون برآمدگی، بدون حفره هوا و بدون خش[1] باشد.
- وقتی اسلاید در مقابل نور گرفته می‌شود، قسمت نازک آن باید حالت رنگین کمان[2] داشته باشد.
- از تمام قطره ۳-۲ میلی‌متری باید استفاده شده باشد.
- گستره بتدریج از قسمت ضخیم به نازک برسد.

گستره شعله شمعی حاشیه های اسلاید را برای مطالعه میکروسکوپی قابل مطالعه می سازد. با توجه به اینکه سلول‌های بزرگ و غیرطبیعی اغلب در حاشیه های اسلاید قرار می گیرند، تهیه این نوع گستره توصیه می‌شود. برای تهیه گستره ای با حاشیه های قابل مطالعه، کافیست که لبه spreader را با قلم الماس، قطع کنید.

ممکن است سلول‌های لوسمیک یا غیرطبیعی از نمونه خون یک بیمار به اسلاید بیمار دیگری از طریق اسلاید پخش کننده، که خوب تمیز نشده باشد، منتقل شوند. بنابراین تعویض اسلاید پخش کننده بعد از تهیه گستره از نمونه غیرطبیعی یا تمیز کردن آن با گاز مرطوب و خشک کردن کامل آن، برای هر بار استفاده توصیه می‌شود.

در بیماران مبتلا به غلظت خون، تهیه و ارزیابی گستره خون محیطی دشوار است. در اینگونه موارد، یک قطره خون را با یک قطره آلبومین ۵٪ یا پلاسمای گروه AB مخلوط کرده و سپس اقدام به تهیه اسلاید می‌کنیم. برای جلوگیری از smudge شدن سلول‌ها نیز می‌توان ۲-۱ قطره از آلبومین ۵٪ را به نمونه خون اضافه و سپس گستره را تهیه کرد.



شکل ۲-۵: تهیه گستره خون محیطی

[1] Streak
[2] Rain bow

گستره محیطی باید یکنواخت باشد و هیچگونه اجسام ذره ای[1] در سطح آن وجود نداشته باشد. وجود اجسام ذره ای در سطح گستره، ممکن است ناشی از موارد زیر باشد:

- کریستال های نامحلول ضدانعقاد
- آگلوتیناسیون سرد با ایجاد تجمعات گلبول‌های قرمز
- رسوب کرایوگلوبولین
- توده های بهم چسبیده گلبول‌های سفید برای مثال در لوسمی ها
- رشته‌های فیبرین
- توده های کروماتین آزاد هسته که با خاصیت چسبندگی، سلول‌ها را به یکدیگر می چسبانند
- نشستن ذرات گرد و خاک بر روی اسلاید
- سلول‌های بهم چسبیده تومور از بافت خونی یا بافت های دیگر
- تجمع سلول‌های پوششی جدار عروق یا آلوده شدن خون به سلول‌های پوششی پوست در هنگام تهیه نمونه
- تجمعات پلاکتی به علت ذرات ریز لخته یا پدیده تجمع پلاکتی در حضور املاح EDTA

شکل ۳-۵: گستره محیطی همراه با پارتیکل

رنگ‌آمیزی گستره خون محیطی

بیش از صد سال است که از رنگ های Romanowsky جهت طبقه بندی مورفولوژیک سلول‌های خونی استفاده می‌شود. رنگ تیازین، بخش قلیایی رنگ های رومانوفسکی بوده که مخلوطی از متیلن بلو (تترا متیل تیونین) و نسبت های مختلفی از مشتقات دمتیله شده اکسیداتیو آن است که بنام رنگ های آزور خوانده می‌شود. تری متیل تیونین (آزور B)، دی متیل تیونین (آزور A) و منو متیل تیونین (آزور C). ائوزین بخش اسیدی رنگ بوده که مشتقی از اسکلت Xanthene می‌باشد.

ترکیبات مؤثر رنگ های رومانوفسکی، آزور B و ائوزین Y (تترابرومو فلوروسین) بوده که خاصیت رنگ پذیری سلول‌ها، بستگی به واکنش آنها با این دو جزء اصلی می‌باشد. اجزاء سلولی اسیدی (دارای بار منفی)، مانند اسیدهای نوکلئیک، پروتئین های هسته سلول و سیتوپلاسم، با جزء قلیایی رنگ، یعنی آزور B، به صورت ارغوانی رنگ گرفته و خاصیت بازوفیلیک دارند، در حالیکه اجزاء قلیایی سلول (دارای بار مثبت)، مانند هموگلوبین و پروتئین های بازی موجود در گرانول‌ها، با جزء اسیدی رنگ، یعنی ائوزین Y، متمایل به قرمز رنگ می‌شوند و خاصیت اسیدوفیلیک یا ائوزینوفیلیک دارند. ساختارهایی که ترکیبی از دو رنگ را به خود اختصاص می‌دهند، نوتروفیلیک نامیده می‌شوند. برخی از رنگ های گروه رومانوفسکی عبارتند از: رایت[2]، گیمسا[3]، رایت-گیمسا، لیشمن[4]، مِی گرانوالد[5] و جِنِر[6].

[1] Particle
[2] Wright
[3] Giemsa
[4] Leishman
[5] May-Grunwald
[6] Jenner

نحوه رنگ‌آمیزی

رنگ‌آمیزی رایت

ترکیبی از ائوزین،۷۰-۵۰٪ متیلن بلو، ۲۰-۱۰٪ آزور B و سایر مشتقات می‌باشد. رنگ‌آمیزی به روش رایت، روش مورد تأیید کمیسیون رنگ‌آمیزی بیولوژیک[1] می‌باشد. این رنگ بصورت پودر در دسترس می‌باشد. ۱۰ گرم پودر رایت را در ۴ لیتر متانول خالص مخلوط کرده و مدتی به حال خود رها می‌شود تا رنگ شکل بگیرد. برای بهتر شدن رنگ، می‌توان آن را در ۳۷ درجه قرار داد. قبل از استفاده بایستی رنگ از صافی عبود داده شود.

برای تهیه بافر رنگ نیز، ۶/۶۳ گرم فسفات پتاسیم (KH_2PO_4) منوبازیک بدون آب را با ۲/۵۶ گرم فسفات سدیم (Na_2HPO_4) دی بازیک بدون آب، مخلوط کرده و با آب مقطر به حجم یک لیتر می رسانیم. در این حالت، pH بافر ۶/۴ می‌باشد. جهت تهیه بافری با pH قلیایی تر، حدود ۶/۷، ۵/۱۳ گرم فسفات پتاسیم را با ۴/۱۲ گرم فسفات سدیم مخلوط کرده و با آب مقطر به حجم یک لیتر می رسانیم.

روش کار: متانول موجود در رنگ رایت به عنوان فیکساتیو عمل می‌کند. اسمیر تهیه شده باید طی چند ساعت پس از تهیه، رنگ‌آمیزی شود. در صورتی که بخواهیم اسمیر تهیه شده را نگهداری کنیم، باید آن را با متانول فیکس کنیم. برای رنگ‌آمیزی، ابتدا اسلاید را به مدت ۳-۲ دقیقه با رنگ رایت پوشانده و سپس بدون خالی کردن رنگ، قطره قطره به آن بافر اضافه کرده و با فوت کردن، رنگ و بافر را با هم مخلوط می‌کنیم تا جلای فلزی در سطح گستره، ظاهر شود. سپس مخلوط رنگ و بافر را به مدت ۳ دقیقه بر روی اسلاید نگه داشته و پس از آن اسلاید را با آب شستشو داده و پس از خشک شدن مطالعه می‌کنیم.

گستره ای که بخوبی توسط رنگ رایت رنگ‌آمیزی شده باشد، با چشم غیرمسلح به رنگ صورتی یا متمایل به بنفش خواهد بود. گلبول‌های قرمز رنگ صورتی داشته و به رنگ لیمویی یا قرمز دیده نمی‌شوند. رسوب رنگ کمترین مقدار را داشته و رنگ گستره یکنواخت باشد و سلول‌ها فاقد هر گونه آرتیفکت هستند. هسته گلبول‌های سفید ارغوانی بوده و کروماتین و پاراکروماتین آن، به وضوح از هم جدا هستند.

گرانول‌های سیتوپلاسمی نوتروفیل دارای رنگ خرمایی، گرانول‌های ائوزینوفیل دارای رنگ قرمز مایل به نارنجی و بازوفیل دارای گرانول‌های ارغوانی تیره می‌باشند. پلاکت‌ها گرانول‌های بنفش تیره داشته و باکتری ها در صورت وجود، آبی رنگ می‌گیرند. سیتوپلاسم لنفوسیت‌ها معمولاً رنگ آبی روشن دارد ولی سیتوپلاسم منوسیت‌ها دارای ته رنگی از آبی مایل به خاکستری کم‌رنگ است.

رنگ‌آمیزی گیمسا

بیشتر از آنکه جهت شمارش سلول‌های خونی و بررسی های هماتولوژیک مورد استفاده قرار بگیرد، یک روش رنگ‌آمیزی برای جستجوی تک یاخته های خونی می‌باشد. هیچ مرجعی، رنگ‌آمیزی گیمسا را برای گستره های هماتولوژیک توصیه نمی‌کند.

۳/۸ گرم پودر گیمسا را در ۲۰۰ میلی‌لیتر گلیسیرین مخلوط کرده و ۲ ساعت در ۶۰ درجه سانتیگراد قرار می‌دهیم. سپس ۳۱۲ میلی‌لیتر الکل متانول خالص به آن اضافه میکنیم. رنگ تهیه شده پس از صاف شدن، آماده مصرف می‌باشد.

روش کار: گستره تهیه شده را پس از اینکه کامل خشک شد، با متانول فیکس کرده و سپس رنگ رقیق شده (۱ به ۱۰ با آب مقطر) را به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه بر روی گستره قرار می‌دهیم بطوری که کل سطح آن را بپوشاند. بعد از طی مدت زمان رنگ‌آمیزی، گستره را با آب شستشو داده و پس از خشک شدن به بررسی آن می پردازیم.

[1] Biological Stain Commission (BSC)

رنگ‌آمیزی رایت-گیمسا

به جرأت می‌توان گفت که متداولترین رنگی است که در خون شناس مورد استفاده قرار می گیرد. در واقع این رنگ مخلوطی از رنگ های رایت و گیمسا بوده که هر دو حاوی رنگ های متیلن بلو و ائوزین می‌باشند. از الکل متانول بکار رفته در تهیه رنگ، هم به عنوان حلال رنگ و هم به عنوان فیکساتور استفاده می‌شود. به علت فیکس شدن اسمیر، برای مطالعه گسترش های ضخیم مالاریا، رنگ‌آمیزی مناسبی نیست.

۹ گرم پودر رایت، یک گرم پودر گیمسا، ۹۰ میلی‌لیتر گلیسرین و ۲۹۱۰ میلی‌لیتر متانول بدون آب را با هم مخلوط می‌کنیم. رنگ ساخته شده را یکماه در شیشه های قهوه ای نگهداری می‌کنیم تا رنگ برسد. سپس رنگ تهیه شده را از صافی عبور داده و در شیشه های تیره نگهداری می‌کنیم.

روش کار: اسلاید بایستی خشک باشد. سطح اسلاید را به مدت ۱ دقیقه با رنگ می پوشانیم. سپس محلول بافر فسفات ۰/۱۵ میلی مولار با pH = ۶/۴ را به صورت قطره قطره بر روی رنگ ریخته و با فوت کردن، آن را مخلوط می‌کنیم. ۶-۴ دقیقه بعد لام را با آب شسته و پس از خشک شدن به مطالعه آن می پردازیم.

مشخصات اسلاید رنگ‌آمیزی شده با رایت-گیمسا

زمینه اسلاید، رنگ صورتی به خود می گیرد. گلبول‌های قرمز به رنگ نارنجی، صورتی و یا گلی رنگ می گیرند. گرانول نوتروفیل‌ها ارغوانی تا بنفش، ائوزینوفیل‌ها صورتی و گرانول بازوفیل‌ها آبی تا بنفش می‌باشد. سیتوپلاسم نوتروفیل‌ها صورتی کم‌رنگ، لنفوسیت‌ها آبی روشن و سیتوپلاسم منوسیت‌ها خاکستری تا آبی کم‌رنگ است. هسته نوتروفیل و لنفوسیت آبی تیره تا بنفش و هسته منوسیت ارغوانی مایل به روشن خواهد بود. سیتوپلاسم پلاکت به صورت آبی روشن با مرکز قرمز-ارغوانی دیده می‌شود.

نکته های مهم در رنگ‌آمیزی گستره خون محیطی

- اسلایدهایی که بیش از یک هفته مانده اند، آبی رنگ می گیرند.
- قرار گرفتن اسلاید در برابر تابش نور خورشید، موجب پژمردگی رنگ می‌شود.
- رنگ‌آمیزی گلبول‌های قرمز به رنگ آبی تا سبز، نشانه طولانی بودن زمان رنگ‌آمیزی یا قلیایی بودن بافر است. در این حالت، گرانول‌های نوتروفیل برجسته و تیره و به گرانول‌های توکسیک شبیه می‌شوند و گرانول‌های ائوزینوفیل آبی یا خاکستری می گردند.
- کوتاه بودن زمان رنگ‌آمیزی یا اسیدی بودن محیط رنگ‌آمیزی و یا بافر اسیدی و یا اسید شدن رنگ به علت تبدیل متانلو به اسید فورمیک، موجب کاهش کبفت رنگ‌آمیزی می‌شود. گلبول‌های قرمز در این حالت به رنگ قرمز روشن یا نارنجی دیده می‌شوند و هسته گرانولوسیت‌ها آبی کم‌رنگ و گرانول‌های ائوزینوفیل قرمز درخشان رنگ می گیرند.
- چنانچه اسلاید قبل از خشک شدن با لامل پوشانده شود، آرتیفکت صورتی در رنگ‌آمیزی ایجاد می‌کند.
- رنگ‌آمیزی فوری اسلاید، موجب جدا شدن قسمت ضخیم گستره از اسلاید می‌شود.
- برای نگهداری گستره محیطی رنگ نشده، بایستی آن را با متانول فیکس نمود. در غیر اینصورت، پروتئین های خشک شده در اسلاید کهنه، زمینه آبی رنگ ایجاد کرده و بررسی گستره را دشوار می‌کنند.
- برای پاک کردن رسوب رنگ از روی گستره، می‌توان برای چند ثانیه آن را در متانول قرار داد و سپس آبکشی کرد. چنانچه رسوب مانع از ارزیابی گستره شود، باید گستره جدید تهیه کرد یا با متانول رنگ آن را کاملاً پاک و دوباره رنگ‌آمیزی کرد.
- اسلایدهای رنگ‌آمیزی شده با رنگ رایت را می‌توان رنگ زدایی کرد و در موارد ضروری برای یک رنگ‌آمیزی دیگر، مانند رنگ‌آمیزی آهن، استفاده کرد.

- برای جلوگیری از رخ دادن آرتیفکت آب، باید از رنگ‌آمیزی در هوای مرطوب و نمناک آزمایشگاه خودداری کرد. آلوده شدن الکل فیکساتیو یا رنگ با آب، موجب ظاهر شدن واکوئل در گلبول‌های قرمز می‌شود و چنانچه واکوئل ها در هاله مرکزی قرار بگیرند، موجب گزارش کاذب هیپوکروم می‌شوند. این مورفولوژی کاذب را که ناشی از آرتیفکت آب است، Torocyte می نامند.
- رنگ‌آمیزی در هوای مرطوب ممکن است همراه با ایجاد گلبول‌های قرمزی باشد که کناره های آنها خورده شده (شبیه خوردگی موریانه) و یا مورفولوژی اکینوسیت داشته باشند.

عوامل مداخله گر و مشکلات ایجاد شده در رنگ‌آمیزی

آبی شدن بیش از اندازه

گسترش های ضخیم، افزایش زمان رنگ‌آمیزی، شستشوی ناکافی، قلیایی بودن زیاد رنگ یا محلول رقیق کننده، باعث ایجاد بازوفیلی بیش از اندازه می‌شود. در این حالت، گلبول‌های قرمز به رنگ آبی یا سبز در می آیند، کروماتین هسته رنگ آبی تیره یا سیاه می گیرد و گرانول‌های نوتروفیل‌ها به شدت رنگ می گیرند و بزرگ و برجسته بنظر می رسند و ممکن است با گرانول‌های توکسیک اشتباه شوند. گرانول‌های ائوزینوفیل به رنگ آبی یا خاکستری دیده می‌شوند. کم کردن زمان رنگ‌آمیزی یا استفاده از رنگ کمتر و رقیق کننده بیشتر، ممکن است این مشکل را برطرف کند. در صورتی که این روش‌ها بی تأثیر باشند، احتمال دارد که بافر بیش از اندازه قلیایی باشد و باید بافری با pH کمتر تهیه کرد.

صورتی شدن بیش از اندازه

رنگ‌آمیزی ناقص، طولانی بودن زمان شستشو، چسباندن لام ها پیش از خشک شدن آن ها یا زیاد بودن قدرت اسیدی رنگ یا بافر، ممکن است منجر به اسیدوفیلی بیش از اندازه شود. در اینگونه گستره ها، گلبول‌های قرمز رنگ قرمز درخشان یا نارنجی به خود می گیرند. کروماتین هسته آبی کمرنگ می‌شود و گرانول‌های ائوزینوفیل به رنگ قرمز درخشان در می آیند. رنگ‌آمیزی در مجاورت بخار اسید و آلوده شدن وسایل رنگ‌آمیزی به اسید، علت این امر می‌باشد. در ضمن، متانول در اثر ماندن به اسید فورمیک تبدیل می‌شود و می‌تواند در صورتی شدن گستره خون محیطی دخیل باشد.

ایجاد زمینه آبی رنگ

پروتئین های فاز حاد در بیماری های التهابی و پاراپروتئین ها (پروتئین های منوکلونال)، به علت تمایل به رنگ های متیلن بلو و آزور، ایجاد زمینه آبی رنگ می‌کنند. این مسئله در موارد زیر دیده می‌شود:

- کم‌خونی بیماری های مزمن به علن افزایش پروتئین های فاز حاد
- سیروز کبدی ناشی از افزایش گاماگلوبولین
- بیماری های اتوایمیون ناشی از افزایش پلی کلونال گاماگلوبولین
- مالتیپل میلوما ناشی از تولید زیاد ایمونوگلوبولین ها
- حضور کرایوگلوبولین ناشی از بیماری های التهابی یا هپاتیت یا اختلالات پلاسماسل

ضدانعقاد هپارین نیز زمینه آبی رنگ ایجاد می‌کند.

رنگ‌آمیزی کم‌رنگ گستره

کم‌رنگ بودن گلبول‌های قرمز، هسته ها یا گرانول‌های ائوزینوفیلیک احتمالاً بخاطر کم بودن مدت زمان رنگ‌آمیزی یا شستشوی بیش از حد است. طولانی شدن مدت زمان رنگ‌آمیزی یا کم کردن شستشو، ممکن است این مشکل را برطرف کند.

رسوب روی گستره

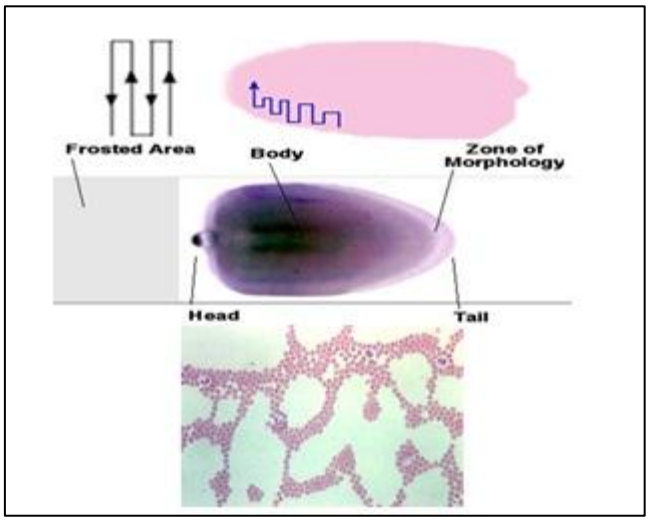
ممکن است بخاطر لام های کثیف، خشک شدن در طول دوره رنگ‌آمیزی، شستشوی ناکافی اسلاید در پایان زمان رنگ‌آمیزی، فیلتر نکردن رنگ، نگهداری رنگ در ظروف سر باز و یا نشستن غبار روی اسلاید یا گستره باشد.

ارزیابی و مطالعه استاندارد گستره خون محیطی

در هنگام مطالعه گستره خون محیطی، نخست باید اطلاعات برگه CBC را با اطلاعات برچسب شده بر روی اسلاید بیمار، مطابقت داد و سن و جنس بیمار را در تفسیر پارامترها، مدنظر داشت. برای مثال نباید برای نوزاد مورفولوژی ماکروسیت گزارش کرد، چون مقدار طبیعی MCV نوزاد ۱۲۰-۱۰۴ fL می‌باشد. همچنین به علت کم کاری فیزیولوژیک طحال، مشاهده هاول ژولی و تعدادی تارگت سل و آکانتوسیت در خون محیطی نوزاد، طبیعی است.

گستره خون محیطی ابتدا باید بصورت ماکروسکوپی بررسی شود تا از شیوه پخش شدن خون بر روی گستره، تکنیک صحیح رنگ‌آمیزی و از نظر وجود هرگونه ذرات غیرطبیعی که ممکن است نشانه ذرات لخته و یا تجمع پلاکت‌ها و یا رسوب کرایوگلوبولین یا تجمع سلول‌های توموری باشد، بررسی شود.

گستره خون محیطی دارای بخش های مختلف سر[۱]، دُم[۲]، بدنه[۳]، ناحیه شیاری یا پـَر مانند[۴] و ناحیه مورفولوژی[۵] می‌باشد.



شکل ۴-۵: شمارش افتراقی و بررسی مورفولوژی را باید در ناحیه مورفولوژی انجام داد

گلبول‌های قرمز در قسمت شیاری، هاله مرکزی ندارند و ممکن است به اشتباه گزارش مورفولوژی اسفروسیت داده شود. لنفوسیت‌ها نیز در این ناحیه بزرگتر از طبیعی بوده و ممکن است به عنوان لنفوسیت‌های آتیپیک گزارش شوند.

---

[1] Head
[2] Tail
[3] Body
[4] Featherian
[5] Zone of morphology

شمارش افتراقی را می‌توان با حرکت زیگزاگی یا با حرکت جدید کنگره ای[1] در ناحیه مورفولوژی انجام داد. در این حرکت، دو میدان در حاشیه و سپس چهار میدان به طرف پایین و بعد دو میدان موازی حاشیه و سپس چهار میدان به طرف بالا و تکرار این حرکت تا پایان شمارش افتراقی انجام می‌شود. ممکن ایت که این شیوه از حرکت، نیازمند مطالعه دو طرف اسلاید و در نتیجه کل اسلاید را داشته باشد.

ناحیه موروفولوژی که پشت قسمت شیاری است، ناحیه ای تک لایه از گلبول‌های قرمز در کنار هم، شبیه سنگ فرش موزائیک، بدون هم پوشی و بدون فاصله های نامتناسب است. در این ناحیه، شمارش افتراقی و تخمین گلبول‌های سفید و پلاکت و مورفولوژی گلبول‌های قرمز، آنالیز می‌شود.

تراکم سلولی بیش از ۴ برابر در کناره ها یا قسمت های شیاری اسلاید در مقایسه با قسمت های تک لایه و سنگفرشی، دال بر اسلاید غیرقابل قبول با پخش نامتناسب است و اسلاید باید دوباره تهیه شود.

برای مشاهده میکروسکوپی، ابتدا باید با درشت‌نمایی کم (۱۰×) وضعیت کلی اسلاید و پخش سلولی در کناره ها و قسمت شیاری بررسی شود. در این درشت‌نمایی، اسلاید از لحاظ موارد زیر بررسی می‌شود:

- ✓ وجود رشته‌های فیبرین
- ✓ وجود آگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز، رولکس، تجمع پلاکتی
- ✓ توزیع گلبول‌های سفید

شمارش افتراقی و بررسی مورفولوژی سلول‌ها و تخمین شمارش گلبول‌های سفید، با درشت‌نمایی ۴۰× صورت می گیرد. از درشت‌نمایی ۱۰۰× برای شناسایی مواردی از قبیل گرانول‌های توکسیک، اجسام هاول ژولی، پاپن هایمر و سایر انکلوژن های داخل سلولی، استفاده می‌شود. همچنین برای تأیید نهایی سلول‌های غیرطبیعی، باید از این درشت‌نمایی استفاده کرد.

روغن ایمرسیون فقط در هنگام استفاده از عدسی ۱۰۰× کاربرد دارد. ضریب شکست نور، نسبت سرعت عبو نور در هوا به سرعت عبور نور در ماده است. روغن خواصی شبیه به شیشه دارد و باعث می‌شود که عدسی شیئی، نور بیشتری را دریافت کند. حباب هوا در روغن مانند منشور عمل می‌کند. برای برداشتن حباب، کافیست عدسی شیئی را در روغن جابجا کنید تا حباب محو شود.

نکته:

چنانچه اسلاید با درشت‌نمایی ۱۰ و ۴۰ تنظیم شود ولی با درشت‌نمایی ۱۰۰ تنظیم نشود، احتمال دارد که اسلاید برعکس زیر میکروسکوپ گذاشته شده باشد.

برای شمارش افتراقی، اسلاید باید به شیوه سیستمیک مطالعه و ناحیه صحیح را انتخاب کرد. همانگونه که قبلاً هم گفته شد، لنفوسیت‌ها در ناحیه شیاری بزرگتر از حد طبیعی بوده و ممکن است به عنوان لنفوسیت‌های آتیپیک گزارش شوند.

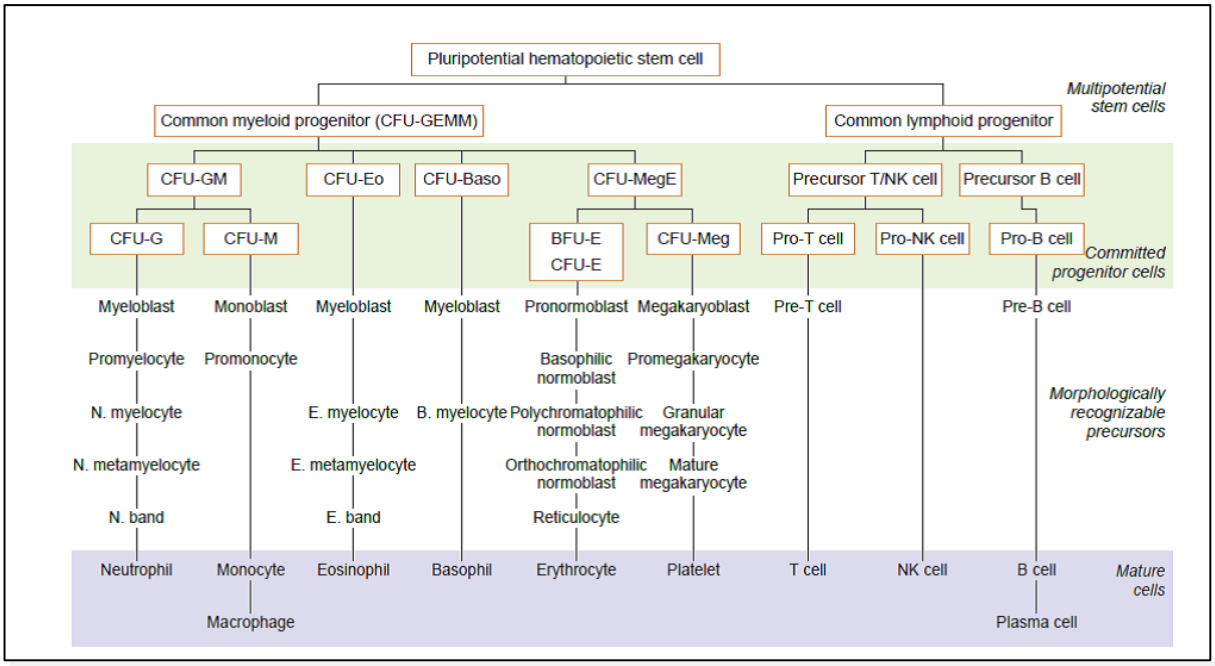
توصیه می‌شود وقتی شمارش گلبول‌های سفید بیشتر از ۴۰×۱۰^{۳} /mm^3 است، برای افزایش دقت، حداقل ۲۰۰ سلول شمارش افتراقی شوند و سپس درصد هرکدام محاسبه شود. در مواردی که شمارش افتراقی ۱۰۰ سلول در یک بیمار مبتلا به لکوپنی مشکل است، بهتر است که ۲ تا ۳ اسلاید تهیه کرده و مجموع شمارش اسلایدها را به عدد ۱۰۰ برسانید. هیچ گاه نتیجه شمارش افتراقی ۲۰ یا ۵۰ سلول شمارش شده بر روی یک اسلاید را در عدد ۵ یا ۲ ضرب نکنید. شمارش افتراقی بر روی بافی کوت بدلیل پخش نامناسب سلول‌ها، مشکل می‌باشد.

[1] New Battlement

۶

دستور کار آزمایشگاه خون‌شناسی

مورفولوژی سلول‌های خونی



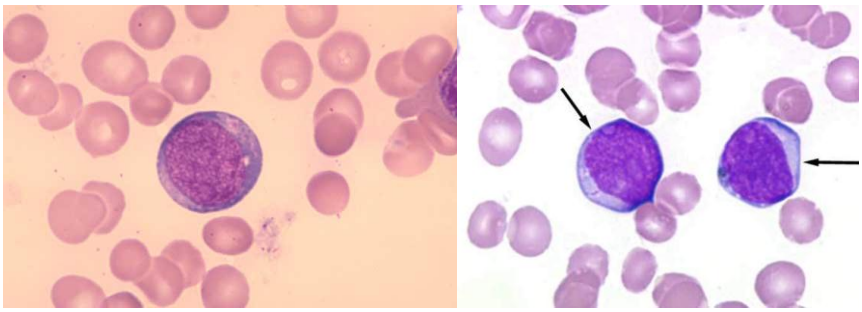
شکل ۱-۶: مدل شماتیک خونسازی در مغزاستخوان. B (بازوفیل)، BFU-E (واحد انفجاری تشکیل دهنده اریتروسیت)، CFU-Baso (واحد تشکیل دهنده کلنی بازوفیلی)، CFU-E (واحد تشکیل دهنده کلنی اریتروسیتی)، CFU-Eo (واحد تشکیل دهنده کلنی ائوزینوفیلی)، CFU-G (واحد تشکیل دهنده کلنی گرانولوسیتی)، CFU-GEMM (واحد تشکیل دهنده کلنی گرانولوسیتی/اریتروسیتی/ماکروفاژ/مگاکاریوسیتی)، CFU-GM (واحد تشکیل دهنده کلنی گرانولوسیتی/ماکروفاژ)، CFU-M (واحد تشکیل دهنده کلنی ماکروفاژ)، CFU-Meg (واحد تشکیل دهنده کلنی مگاکاریوسیت)، CFU-Meg/E (واحد تشکیل دهنده کلنی مگاکاریوسیتی/اریتروسیتی)، E (ائوزینوفیل)، N (نوتروفیل)

مورفولوژی گلبول‌های سفید و پیشساز های آنها

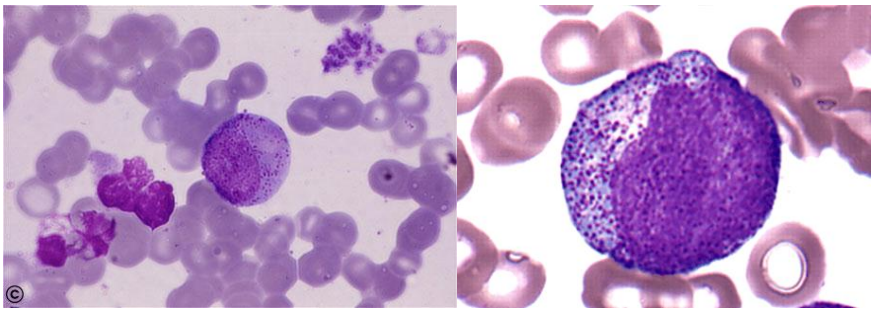
نوتروفیل

سلول پیشساز مشترک نوتروفیل‌ها و منوسیت‌ها (CFU-GM) تقسیم شده و سلول‌های پیشساز گرانولوسیت‌ها و منوسیت‌ها را به وجود می آورد که با اثر فاکتورهای محرک کلونی مربوطه، به ترتیب میلوبلاست ها و منوبلاست ها را ایجاد می‌کنند.

میلوبلاست اولین پیشساز قابل شناسایی در طی مراحل بلوغ نوتروفیل می‌باشد. سلولی است با قطر ۲۵-۱۵ میکرون، به شکل بیضی و گاهی گرد بوده که نسبت هسته به سیتوپلاسم (N/C) بسیار بالاست. هسته معمولاً بیضی شکل بوده و گاهی چهارگوش یا نامنظم دیده می‌شود و دارای کروماتینی بسیار ظریف و یکنواخت می‌باشد. دارای ۵-۱ هستک بوده که روشن تر از کروماتین هستند و به وضوح دیده می‌شوند. سیتوپلاسم میلوبلاست کم‌رنگ، آبی روشن و بدون گرانول و یا حاوی تعداد کمی گرانول‌های آزروفیلیک (اولیه) می‌باشد. ممکن است در اطراف هسته یک هاله مشخص، به علت حضور دستگاه گلژی، دیده شود.

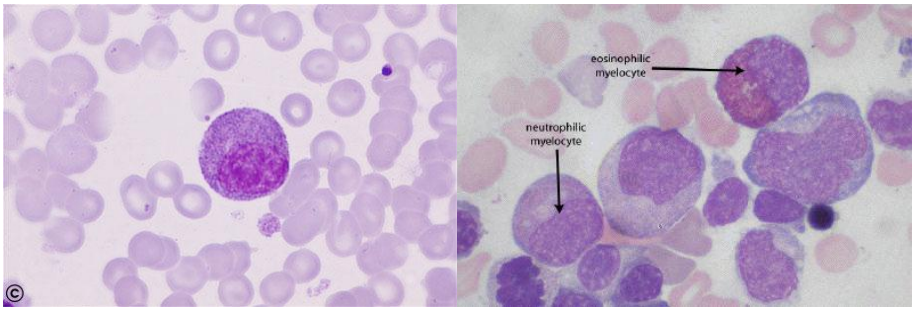


پرومیلوسیت از میلوبلاست کمی بزرگتر است (تا ۳۰ میکرون) و همانند میلوبلاست، بیضی و گاهی گرد می‌باشد. کروماتین هسته شروع به فشرده شدن می‌کند و خشن تر از میلوبلاست می‌باشد و هستک ها کمتر مشخص هستند (به تعداد ۲-۱ عدد). سیتوپلاسم بازوفیلیک و دارای تعداد بسیار زیادی گرانول‌های آزروفیلیک است. نسبت هسته به سیتوپلاسم متوسط و پایین تر از میلوبلاست می‌باشد.

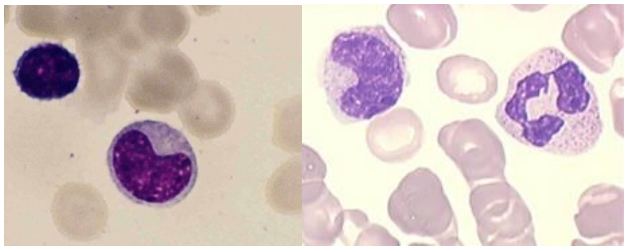


میلوسیت نوتروفیل سلولی بیضی یا گرد به اندازه ۲۵-۱۵ میکرون بوده که گرانول‌های اختصاصی (ثانویه) را تولید می‌کند. این گرانول‌ها در ابتدا فقط در ناحیه گلژی وجود داشته و در ادامه در سراسر سیتوپلاسم پخش می‌شوند. میلوسیت نوتروفیلی زودرس[1]، الگوی کروماتینی نسبتاً ظریف داشته و سیتوپلاسم آن حاوی تعداد زیادی گرانول‌های آزروفیل و تعداد کمی گرانول‌های اختصاصی است. در میلوسیت نوتروفیلی دیررس[2]، الگوی کروماتینی کمی فشرده تر و سیتوپلاسم پر از گرانول‌های اختصاصی بوده و تعداد گرانول‌های آزروفیل کمتر است. میلوسیت آخرین مرحله ای است که سلول در آن توانایی تقسیم دارد.

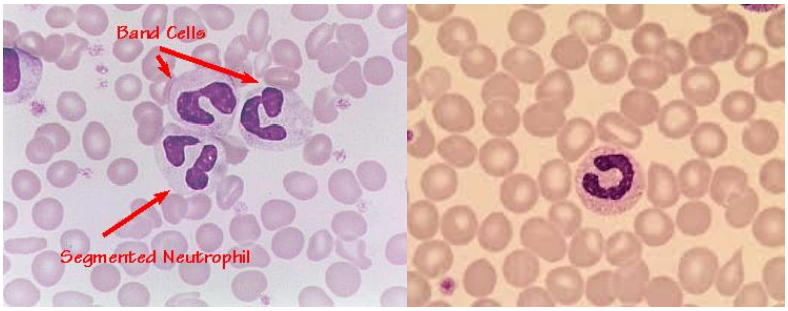
[1] Early
[2] Late



متامیلوسیت نوتروفیل سلولی است به قطر ۲۰-۱۴ میکرون و بیضی یا گرد که سیتوپلاسم آن به رنگ صورتی دیده می‌شود. گرانول‌های آزروفیلیک در آن بسیار کم و تعداد گرانول‌های اختصاصی آن متغیر است. هسته به شکل کشیده و کلیوی با کروماتین فشرده تر دیده می‌شود. نسبت هسته به سیتوپلاسم پایین و در برخی موارد بسیار کم بوده و هستک مشخصی ندارد.

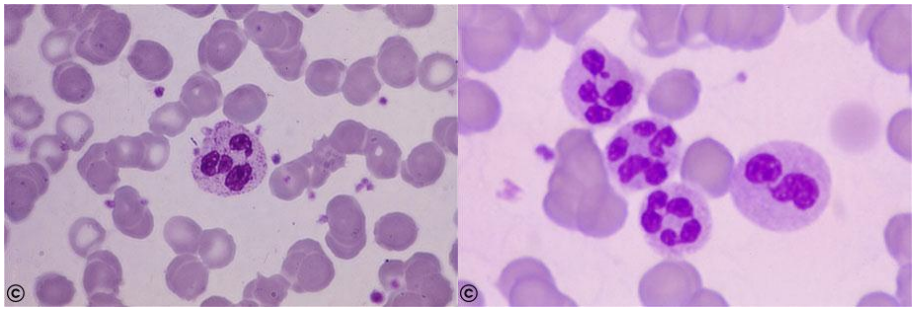


نوتروفیل باند[1] سلولی با اندازه ۲۰-۱۴ میکرون بوده که دارای شکلی گرد یا بیضی بوده و سیتوپلاسم آن صورتی رنگ می‌باشد. نسبت هسته به سیتوپلاسم کاهش یافته است. کروماتین هسته فشرده می‌باشد. هسته به اشکال مختلف S و U شکل و بطور کلی، به شکل نعل اسبی، دیده می‌شود. معمولاً قطر هسته در سرتاسر آن یکسان می‌باشد. انقباض نسبی هسته در مرحله باند رخ می دهد، تا زمانی که یک رشته ظریف طولی بین دو لوب هسته شکل می گیرد و در این مرحله سلول به عنوان نوتروفیل سگمانته، شناخته می‌شود. سلول باند بطور معمول، ۵-۱٪ گلبول‌های سفید را به خود اختصاص می دهد.



نوتروفیل حدود ۷۰-۵۰٪ گلبول‌های سفید را در بزرگسالان تشکیل می دهد و شمارش مطلق آن، ۷۷۰۰-۲۰۰۰ در میلی‌متر مکعب است. یک سلول گرد یا بیضی شکل است که دارای هسته ۵-۲ لوبه می‌باشد. ۹۰-۸۰٪ نوتروفیل‌ها، هسته ای ۴-۳ لوبه دارند. لوب های هسته توسط رشته‌های کروماتین ظریفی، بهم متصل شده اند. کروماتین هسته متراکم بوده و نسبت هسته به سیتوپلاسم پایین است. اندازه سلول ۲۴-۱۴ میکرون بوده و دارای سیتوپلاسمی بی رنگ و یا صورتی کمرنگ می‌باشد. گرانول‌های خرمایی رنگ نوتروفیل، ممکن است در سرتاسر سیتوپلاسم دیده شوند. تعداد گرانول‌های اختصاصی در نوتروفیل بالغ، دو برابر گرانول‌های آزروفیلیک می‌باشد. بندرت ممکن است نوتروفیل بدون گرانول در خون محیطی دیده شود.

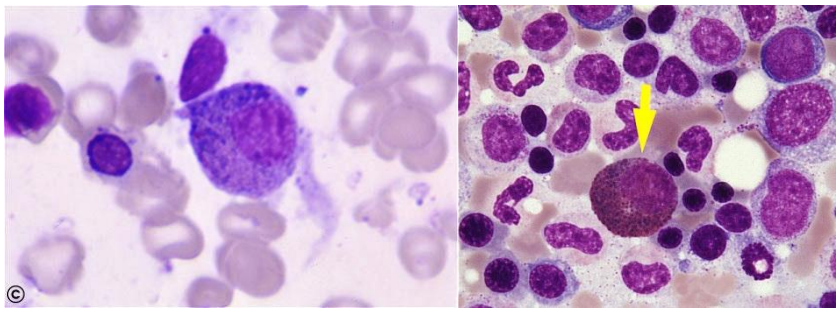
[1] Stab form



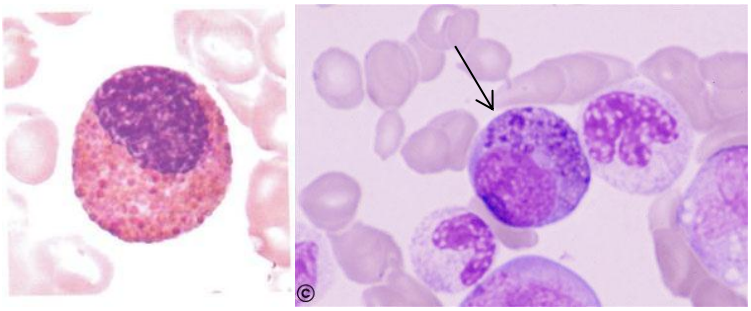
ائوزینوفیل

ائوزینوفیل در مغز استخوان و از یک پیشساز جداگانه بنام CFU-EO تولید می‌شود.

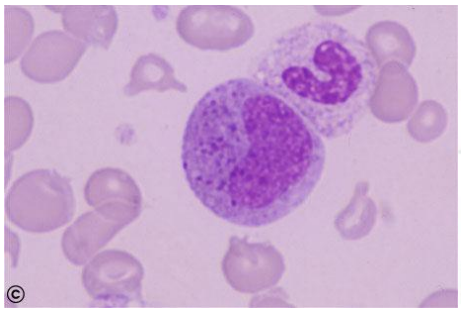
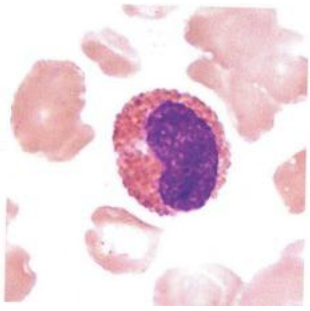
پرومیلوسیت ائوزینوفیل، سلولی است بیضی یا گرد به قطر ۳۰-۱۵ میکرون که رنگ سیتوپلاسم آن آبی روشن بوده و مملو از گرانول‌های ائوزینوفیلیک می‌باشد. شکل هسته بیضی و کروماتین در حال فشرده شدن می‌باشد. ۲-۱ هستک واضح با اندازه متوسط تا بزرگ و روشن تر از کروماتین، دیده می‌شوند. البته گاهی ممکن است قابل مشاهده نباشند. نسبت هسته به سیتوپلاسم، پایین است.



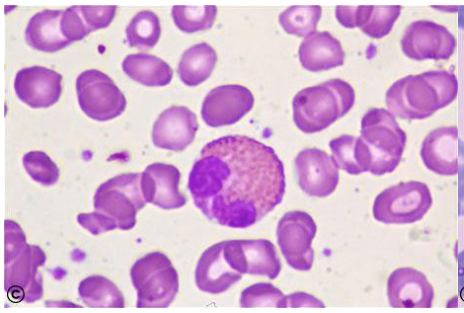
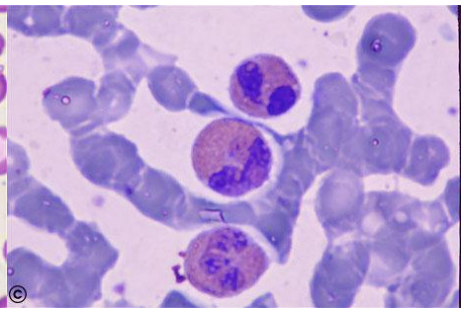
میلوسیت ائوزینوفیل دارای اندازه ۲۵-۱۵ میکرون بوده و سیتوپلاسم آن آبی روشن بوده و بوسیله گرانول‌های ائوزینوفیلیک پوشیده شده است. در میلوسیت ائوزینوفیلی زودرس، گرانول‌ها بزرگ بوده و رنگ بازوفیلی به خود می گیرند. با بلوغ سلول، گرانول‌ها به رنگ سبز زیتونی و در نهایت به رنگ شاخص گرانول‌های ائوزینوفیلی، یعنی نارنجی، در می آیند. هسته نیز بیضی شکل بوده که کروماتین آن متراکم و هستک ها نامشخص می‌باشند. همانگونه که ملاحظه می‌شود، پرومیلوسیت ائوزینوفیلی از میلوسیت آن با روش‌های معمول، قابل افتراق نمی‌باشد و بر همین اساس بسیار از کتاب ها از ذکر مرحله پرومیلوسیتی خودداری کرده و معتقدند که اولین سلول رده ائوزینوفیلی قابل تشخیص، میلوسیت می‌باشد.



متامیلوسیت ائوزینوفیل همانند میلوسیت بوده با این تفاوت که هسته آن شبیه به متامیلوسیت نوتروفیلی، به شکل لوبیا یا کلیه درآمده است.

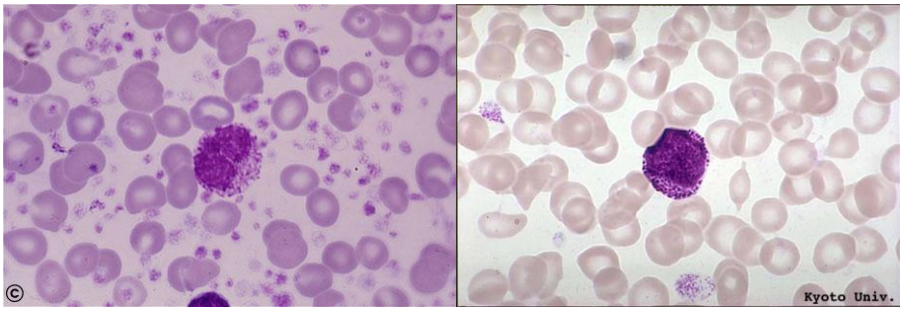
ائوزینوفیل بالغ حدود ۵-۱٪ گلبول‌های سفید در خون محیطی را تشکیل می دهد که این مقدار در شمارش مطلق سلول‌ها، برابر با ۵۵۰-۴۰ در میلی‌متر مکعب می‌باشد. ائوزینوفیل کمی از نوتروفیل بزرگتر بوده و قطر آن حدود ۲۵-۱۵ میکرون می‌باشد. سیتوپلاسم آن رنگ پریده بوده که با گرانول‌های ائوزینوفیلیک درشت قرمز-نارنجی پوشیده شده است. هسته تقریباً گرد و لوبوله بوده و کروماتین فشرده ای دارد. ائوزینوفیل در ۸۰٪ موارد دو لوبه است و در ۲۰٪ موارد ممکن است ۴-۳ لوبه باشد. نسبت هسته به سیتوپلاسم پایین بوده و هستک ها مشخص نیستند.

بازوفیل

بازوفیل‌ها از سلولی شبیه به میلوبلاست تکامل می یابند. اولین مرحله قابل تشخیص، مرحله میلوسیت بازوفیل همراه با ظهور گرانول‌های اختصاصی بازوفیل می‌باشد. این گرانول‌ها معمولاً بزرگتر بوده و شکل نامنظمی دارند و به علت افزایش محتوای موکوپلی ساکاریدی، بصورت قرمز-ارغوانی تیره مشاهده می‌شوند. این گرانول‌ها، سرتاسر سیتوپلاسم را می پوشانند. تفکیک مراحل سلولی به سادگی رده های نوتروفیلی نیست.

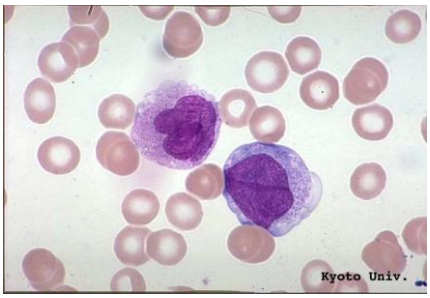
بازوفیل سلولی است به قطر ۱۸-۱۲ میکرون با سیتوپلاسم صورتی روشن، که بیشتر آن توسط گرانول‌های تیره پوشیده شده است. در مراحل اولیه هسته تک لوبه و به شکل بیضی می‌باشد و با بلوغ سلول، سگمانتسیون ناقص در هسته (به علت کاهش RNA سیتوپلاسمی) رخ می دهد و هسته بصورت نسبی لوبوله می‌شود. با توجه به تعداد بالای گرانول‌ها در سیتوپلاسم که حتی بر روی هسته را نیز می پوشانند و همچنین رنگ بازوفیلیک تیره آنها، لوبولاسیون نسبی هسته، قابل تشخیص نمی‌باشد. کروماتین هسته فشرده، هستک ها نامشخص و نسبت هسته به سیتوپلاسم نیز پایین است. گرانول‌های بازوفیل در آب محلول هستند و بنابراین در صورت رنگ‌آمیزی گستره با رنگ گیمسا، ممکن است تشخیص گرانول‌ها به سختی صورت بگیرد.



شکل: سمت راست میلوسیت بازوفیل و سمت چپ بازوفیل بالغ

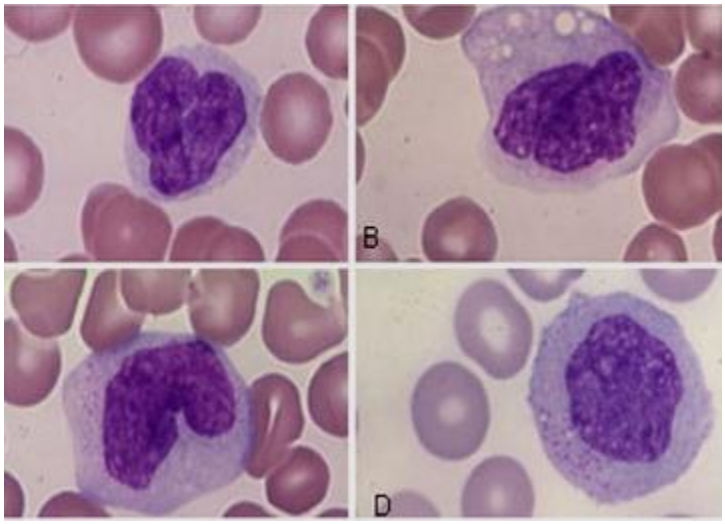
منوسیت

در مغزاستخوان، تشخیص افتراقی منوبلاست از میلوبلاست با توجه به شکل ظاهری، میسر نیست و فقط با استفاده از رنگ های سیتوشیمیایی خاص امکان پذیر می‌باشد. اولین سلول قابل تشخیص رده منوسیتی، **پرومنوسیت** می‌باشد. قطر سلول ۲۵-۱۵ میکرون، بیضی و گاهی گرد که تا حدودی از میلوبلاست بزرگتر می‌باشد. سیتوپلاسم آبی-خاکستری روشن با ظاهری شبیه شیشه مات، بدون گرانول و یا بسیار کم گرانول است. هسته بیضی یا دندانه دار و دارای فرورفتگی های عمیق بوده و کروماتین آن ظریف و یکنواخت و در بعضی مواقع رگه دار و توده ای می‌باشد. در برخی منابع، اصطلاح هسته پیچ خورده را برای توصیف شکل هسته در رده های منوسیتی بکار می برند. هستک ها به تعداد ۳-۱ عدد و روشن تر از کروماتین و با اندازه متوسط تا بزرگ بوده که به سختی مشاهده می‌شوند. نسبت هسته به سیتوپلاسم نیز متوسط است.



شکل: پرومنوسیت در خون محیطی

منوسیت کمی از پرومنوسیت کوچکتر است و قطری حدود ۲۰-۱۵ میکرون دارد. البته منوسیت چون تمایل به چسبیدن و پهن شدن بر روی شیشه و پلاستیک را دارد، بزرگتر از نوتروفیل دیده می‌شود. سیتوپلاسم آن آبی- خاکستری بوده و محتوی گرانول‌های آزروفیلیک ظریف به تعداد زیاد است و ظاهری شبیه شیشه مات دارد. هسته شکل نامنظم و گاهی قطعه قطعه یا دندانه دار داشته و الگوی کروماتینی آن ظریف و کمی فشرده است. هستک نیز ممکن است در منوسیت یافت شود، زیرا که منوسیت سلول نابالغی است که در بافت ها به بلوغ می رسد. نسبت هسته به سیتوپلاسم نیز متوسط یا پایین است.



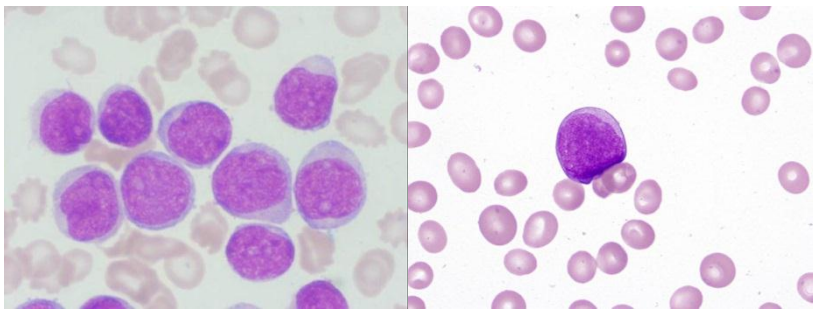
شکل: اشکال مختلف منوسیت در خون محیطی

هسته منوسیت گاهی دندانه عمیق و شبیه نعل اسب دارد که ممکن است با سلول باند اشتباه شود. منوسیت با هسته نعل اسبی، دارای هسته پهن و فضای پاراکروماتینی است، در حالی که هسته سلول باند مانند نوار باریک بوده و سیتوپلاسم آن حاوی گرانولی های خرمایی رنگ است.

منوسیت خون را به سمت بافت ها ترک کرده و به ماکروفاژ، استئوکلاست و سلول‌های دندریتیک تبدیل می‌شود.

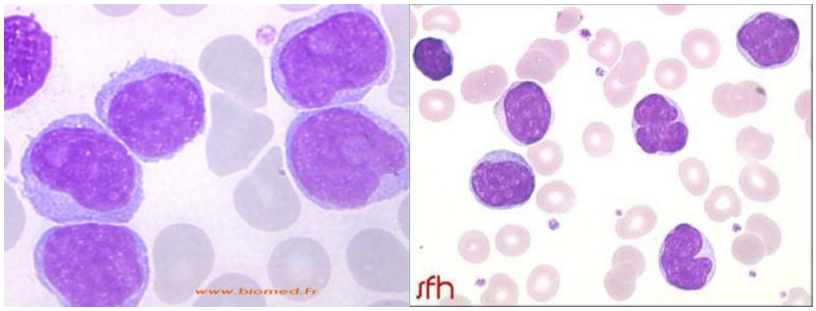
لنفوسیت

اولین سلول قابل شناسایی رده لنفوسیتی، **لنفوبلاست** بوده که از میلوبلاست ها معمولاً کوچکتر بوده و قطری حدود ۱۸-۱۲ میکرون دارد. هسته لنفوبلاست ها، مرکزی، گرد یا بیضی شکل با کروماتینی ظریف و یکنواخت و غشاء نازک بوده که در آن ۲-۱ هستک کوچک یا متوسط ممکن است به چشم بخورد. سیتوپلاسم لنفوبلاست آبی آسمانی و فاقد گرانول با حاشیه ای پر رنگ تر می‌باشد. به علت وجود دستگاه گلژی، حلقه بی رنگی ممکن است اطراف هسته مشاهده شود. نسبت هسته به سیتوپلاسم بالا است. هر چند تفاوت های ظریفی بین میلوبلاست و لنفوبلاست وجود دارد، اما معمولاً به لحاظ مورفولوژیکی تشخیص این دو سلول از یکدیگر مشکل است. رنگ‌آمیزی سیتوشیمیایی برای افتراق این دو، کمک کننده است.

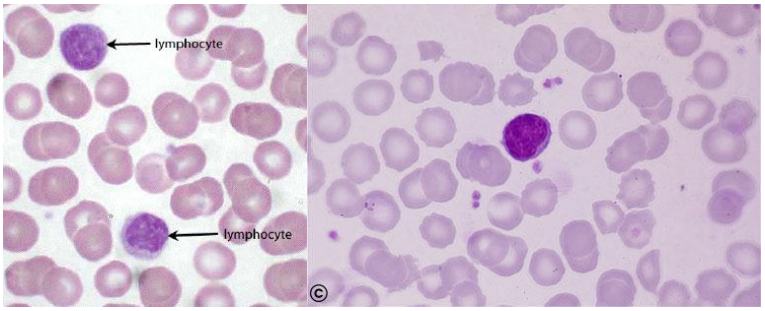


پرولنفوسیت قطری حدود ۱۸-۱۰ میکرون داشته و ممکن است کمی کوچکتر از لنفوبلاست دیده شود. هسته گرد و یا بیضی شکل بوده و کمی فرور فته است. کروماتین هسته متراکم تر از لنفوبلاست بوده ولی توده های کروماتینی ندارد و هستک محوی

درون آن ممکن است مشاهده شود. سیتوپلاسم یکنواخت و بازوفیلی اطراف هسته را فرا گرفته است. احتمال مشاهده گرانول‌های آزوروفیلیک قرمز مایل به بنفش و همچنین واکوئل‌های بی‌رنگ درون سیتوپلاسم وجود دارد. نسبت هسته به سیتوپلاسم پایین می‌باشد.

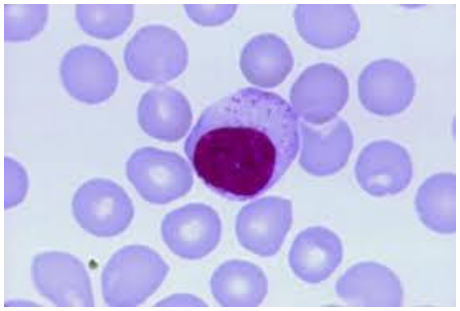


لنفوسیت بالغ اندازه بسیار متغیری داشته و ۱۶-۷ میکرون قطر دارد. این تغییر در اندازه بیشتر به علت تغییر در مقدار سیتوپلاسم است. لنفوسیت‌های کوچک اندازه ای بین ۱۰-۷ میکرون دارند. در این سلول‌ها هسته تقریباً به اندازه یک گلبول قرمز است و ۹۰٪ سلول را شامل می‌شود. کروماتین شدیداً فشرده و خشن بوده و شدیداً رنگ گرفته و زرشکی تیره دیده می‌شود. هستک هرچند همیشه وجود دارد، اما فقط با میکروسکوپ نوری بصورت کوچک و ناحیه روشنی در هسته دیده می‌شود. مقدار کمی سیتوپلاسم به رنگ آبی آسمانی اطراف هسته را فراگرفته است. تعداد کمی گرانول آزروفیل و واکوئل، ممکن است در سلول وجود داشته باشد.



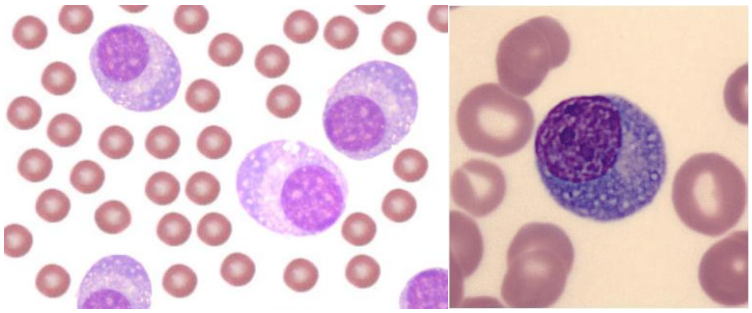
لنفوسیت‌ها متحرکند به همین دلیل ممکن است در گستره خونی به اشکال عجیب و غریب مثل آینه دستی دیده شوند. این سلول‌ها در قسمت قدامی که هسته قرار می گیرد، گرد و در طرف دیگر کشیده شده و به حالتی شبیه دم یا پای کاذب در می آیند.

لنفوسیت‌های بزرگ از نظر اندازه متفاوت بوده و ۱۶-۱۱ میکرون قطر دارند. هسته این سلول‌ها ممکن است کمی بزرگتر از لنفوسیت‌های کوچک باشد، اما تفاوت عمده، بیشتر بودن میزان سیتوپلاسم است. سیتوپلاسم ممکن است به رنگ آبی روشن با نواحی محیطی تیره تر یا کدرتر از سیتوپلاسم لنفوسیت کوچک باشد. گرانول‌های آزروفیلیک ممکن است زیاد باشند که از گرانول‌های موجود در سلول‌های میلوسیتی متفاوتند، زیرا که پراکسیداز منفی هستند. کروماتین هسته شبیه لنفوسیت کوچک می‌باشد و هسته ممکن است کمی فرورفتگی داشته باشد.



شکل: لنفوسیت بزرگ گرانول دار (LGL)

لنفوسیت‌ها پس از تحریک آنتی ژنیک، جهت تولید آنتی بادی، به **پلاسماسل** تبدیل می‌شوند. سلولی است گرد یا کمی بیضی با اندازه ای حدود ۲۰-۹ میکرون. به علت وجود دستگاه گلژی بزرگ و وسیع در سیتوپلاسم، هسته پلاسماسل کناری یا خارج مرکزی بوده و هرچه سلول بالغ تر و تمایز یافته تر باشد، هسته آن نیز کناری تر است. کروماتین هسته بصورت توده های شعاعی، شبیه چرخ درشکه دیده می‌شود. این حالت هسته، فقط در مقاطع آسیب شناسی دیده می‌شود و در گسترش های خون محیطی و یا مغزاستخوان ممکن است هسته به شکل چرخ درشکه دیده شود. هستک ها دیده نمی‌شوند. سیتوپلاسم به علت وجود RNA فراوان، شدیداً بازوفیل بوده و در قسمتی که دستگاه گلژی قرار دارد (اطراف هسته)، رنگ نمی گیرد.



مورفولوژی های دیگر پلاسماسل، سلول شعله ای[1] و سلول کف آلود[2] می‌باشند. Flame cell بدلیل رنگ قرمز-زرشکی سیتوپلاسم، به این نام خوانده می‌شود. رنگ قرمز ایجاد شده بدلیل گلیکوپروتئین های تولید شده در شبکه اندوپلاسمی خشن می‌باشد و رنگ زرشکی بدلیل حضور ریبوزوم ها ایجاد می‌شود.

Mott cell که به آن Grape cell نیز می گویند، پلاسماسلی است که مملو از اجسام گرد و گلبولی بوده که بیشتر حاوی ایمونوگلوبولین می‌باشند. این اجسام را Russell body می نامند. این اجسام بطور طبیعی، بنفش آبی یا صورتی رنگ می گیرند اما در جریان رنگ‌آمیزی ممکن است حل شده و سلول پر از واکوئل های بی رنگ دیده شود.

پلاسماسل ها در حالت عادی در خون محیطی حضور نداشته، ولی پس از تحریکات آنتی ژنیک مانند واکسیناسیون و همچنین بروز پاره ای از عفونت های ویروسی و باکتریال، شاهد افزایش تعداد پلاسما سل ها در جریان خون و لنف خواهیم بود.

افتراق مورفولوژی لنفوسیت از منوسیت

لنفوسیت و منوسیت جزو سلول‌های تک هسته ای هستند و گاهی امکان دارد که لنفوسیت‌های بزرگ با منوسیت اشتباه شوند. توجه به معیارهای زیر در افتراق این دو سلول کمک کننده است:

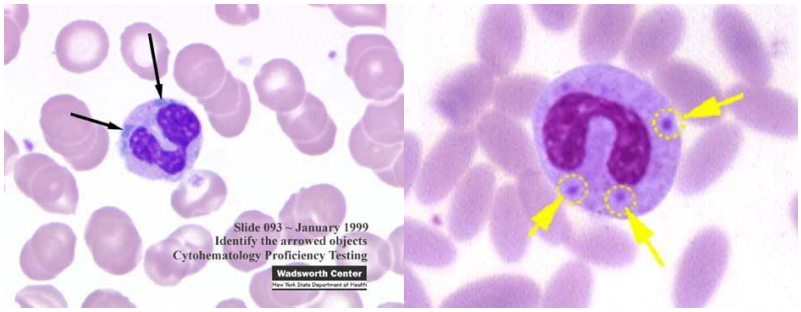
[1] Flame cell
[2] Mott cell

۱- منوسیت، بزرگترین سلول تک هسته ای در خون محیطی است که دارای هسته ای باز با فضای پاراکروماتینی به رنگ سفید است ولی هسته لنفوسیت‌ها غالباً دارای کروماتین فشرده بوده و چنانچه دارای فضای پاراکروماتینی باشد، به رنگ پوست پیازی است.
۲- سیتوپلاسم منوسیت در خون EDTA دار به سرعت واکوئله می‌شود. از این رو یافتن وتکوئل در سیتوپلاسمی به رنگ خاکستری کدر یا شیشه مات، مطرح کننده منوسیت است.
۳- چنانچه سیتوپلاسم منوسیت حاوی گرانول‌های آزروفیل باشد، گرانول‌ها بصورت پودری، ظریف و به رنگ بنفش در تمامی سیتوپلاسم مشاهده می‌شوند، در حالیکه گرانول‌های لنفوسیت در صورت حضور، درشت بوده و معمولاً در یک گوشه از سیتوپلاسم تجمع کرده و غالباً قابل شمارش هستند.
۴- حاشیه سیتوپلاسم لنفوسیت‌ها، غالباً منظم و تحت فشار RBC دارای فرورفتگی است، در حالیکه سیتوپلاسم منوسیت‌ها نامنظم بوده و تحت فشار RBC، تغییری نمی‌کند.

ناهنجاری های مورفولوژیکی گلبول‌های سفید

اجسام دُل[1]

نواحی بیضی به رنگ آبی-خاکستری روشن، نزدیک قسمت محیطی سیتوپلاسم نوتروفیل‌ها و ائوزینوفیل‌ها هستند که از تجمع شبکه اندوپلاسمی خشن ساخته می‌شوند. در عفونت های باکتریایی شدید، حاملگی، سوختگی، سرطان ها، کم‌خونی آپلاستیک و مسمومیت ها دیده می‌شوند. اجسام دُل غالباً همراه با گرانول‌های توکسیک دیده می‌شوند. این اجسام شبیه انکلوژن هایی هستند که در آنومالی مِی- هگلین[2] دیده می‌شوند.

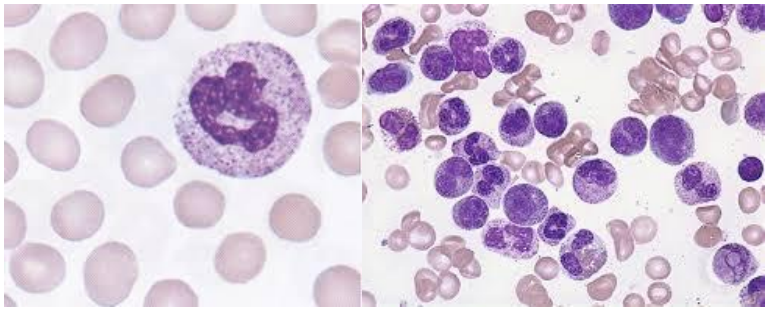


گرانول‌های توکسیک[3]

گرانول‌های بزرگ به رنگ آبی تیره یا آبی-سیاه بوده که در سیتوپلاسم نوتروفیل و برخی اوقات سلول باند و متامیلوسیت دیده می‌شوند. بررسی ها با میکروسکوپ الکترونی نشان داده که این گرانول‌ها در اصل همان گرانول‌های آزروفیل یا اولیه می‌باشند. معمولاً گرانول‌های آزروفیل با بلوغ سلول، خاصیت بازوفیلی خود را از دست می‌دهند و مقدار آنها در نوتروفیل بالغ، به یک سوم کاهش پیدا می‌کند. گرانول‌های اولیه توکسیک، بازوفیلی خود را در نوتروفیل بالغ به دلیل عدم بلوغ، حفظ کرده و در رنگ‌آمیزی به راحتی دیده می‌شوند. در ضمن در صورت طولانی شدن زمان رنگ‌آمیزی و یا pH قلیایی بافر رنگ‌آمیزی، ممکن است به

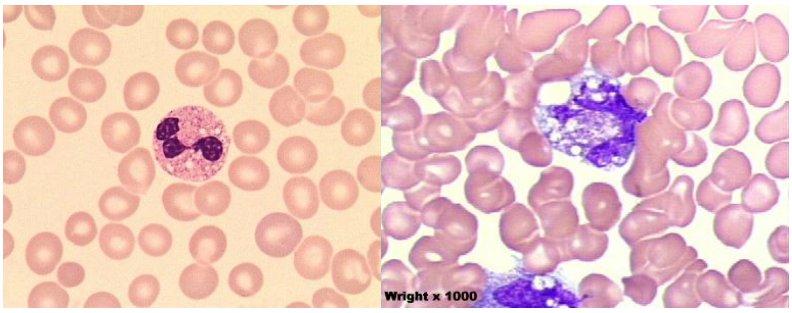
[1] Dohle bodies
[2] May-Hegglin anomaly
[3] Toxic Grinulation

صورت آرتیفکت، گرانول‌هایی شبیه گرانول‌های توکسیک دیده شوند. گرانول‌های توکسیک در تمام حالات گفته شده برای اجسام دُل دیده می‌شوند.



واکوئل های سیتوپلاسمی[1]

واکوئل های سیتوپلاسمی به صورت نواحی شفاف و بدون رنگ در سیتوپلاسم دیده می‌شوند که ممکن است در مرحله آخر هضم مواد فاگوسیتوز شده، مشاهده شوند و از جنس چربی یا سایر مواد ذخیره شده هستند. این واکوئل ها نیز در تمامی حالات گفته شده برای اجسام دُل و گرانول‌های توکسیک، دیده می‌شوند. حضور واکوئل های سیتوپلاسمی به تنهایی، ارزش تشخیصی ندارد، ولی می‌توانند به عنوان یک معیار حساس جهت سپتی سمی مطرح شوند. زمانی که این واکوئل ها همراه با افزایش سلول‌های باند و گرانولوسیت‌ها دیده شوند، احتمال عفونت خونی بیش از ۹۷٪ خواهد بود. ماندن خون در EDTA نیز باعث ایجاد این واکوئل ها به صورت آرتیفکت می‌شود.

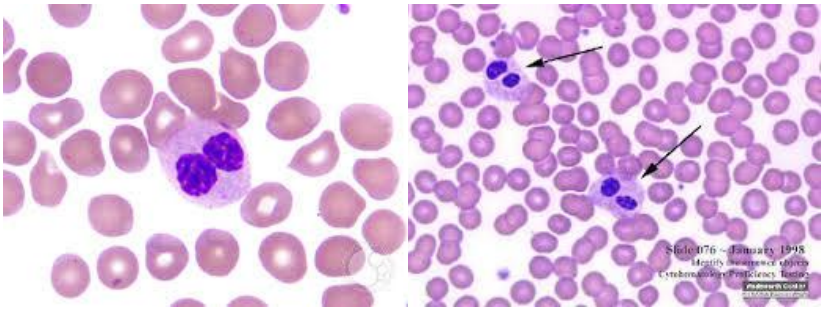


آنومالی پلگر-هوئت[2]

آنومالی پلگر-هوئت (یا پلگر-هیوت) بصورت خوش خیم و اتوزم غالب[3] به ارث می رسد. در حالت هتروزیگوت این بیماری، هسته نوتروفیل‌ها به صورت نوار سگمانته با بیشتر از دو لوب دیده نمی‌شود و اغلب ممکن است هسته، گرد و بدون سگمانته باشد. در حالت نادر هموزیگوت، هسته همه نوتروفیل‌ها گرد یا بیضی و گاهی هم به شکل بادام زمینی است. کروماتین هسته فشرده تر بوده و این مسأله کمک می‌کند تا نوتروفیل‌های پلگر هوئت را از سلول‌های باند افتراق داد. هسته های دو لوبی به صورت دمبل شکل دیده می‌شوند که یک رشته ظریف کروماتین آنها را به هم متصل می‌کند. سلولی با این ظاهر، Pince-nez cell نامیده می‌شود.

اهمیت تشخیص این آنومالی، افتراق این بیماری ارثی از انحراف به چپ[4] ایجاد شده در عفونت هاست.

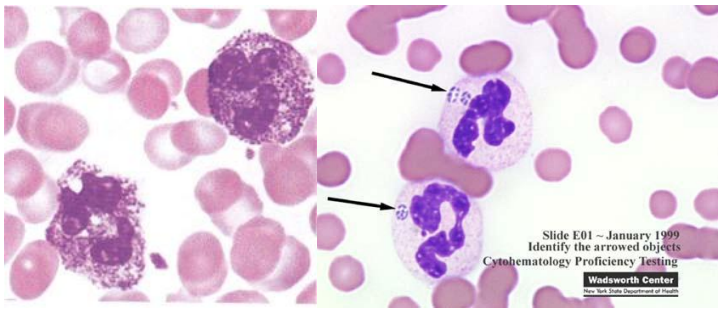
[1] Cytoplasmic vacuoles
[2] Pelger-Huet anomaly
[3] Autosomal Dominant trait
[4] Shift to the left



آنومالی آلدر-ریلی[1]

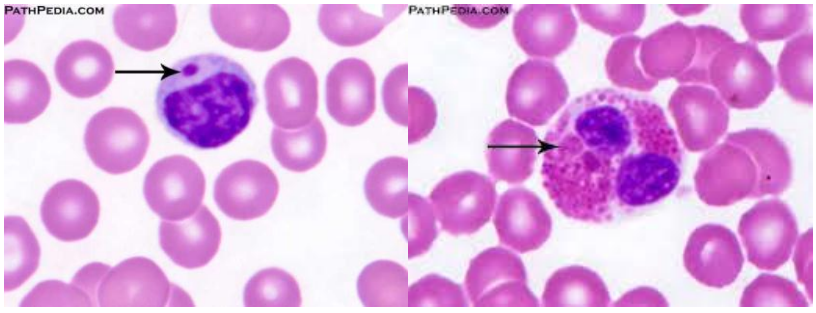
این بیماری به صورت اتوزومال مغلوب[2] به ارث رسیده و مشخصه آن وجود گرانول‌های ارغوانی بزرگ در سیتوپلاسم همه گلبول‌های سفید است. این گرانول‌ها در لنفوسیت‌ها به صورت دستجات خوشه انگوری یا کاما شکل، که توسط واکوئل احاطه شده اند، دیده شده که به این سلول‌ها، Gasser`s cell می گویند.

این گرانول‌های غیرطبیعی، در اختلالات موکوپلی ساکاریدی ارثی، مانند سندروم Hurler و سندروم Hunter، دیده می‌شوند. ناگفته نماند که این گرانول‌ها، بیشتر در سلول‌های مغزاستخوان دیده می‌شوند.



آنومالی چدیاک هیگاشی[3]

این بیماری یک اختلال نادر و اتوزوم مغلوب است و معمولاً در دوران نوزادی و کودکی بدلیل عفونت های چرکی شدید، منجر به مرگ می‌شود. در سیتوپلاسم گلبول‌های سفید، اجسام غول آسا به رنگ سبز خاکستری با خاصیت پراکسیدازی، دیده می‌شوند. در این بیماری، خاصیت کموتاکسی سلول‌ها از بین رفته و سلول‌های غیرطبیعی قادر به کشتن میکروارگانیسم ها نیستند. افراد مبتلا، دچار کاهش پیگمانتاسیون پوست، موهای نقره ای و ترس از نور[4] هستند.



[1] Alder-Reily anomaly
[2] Autosomal Recessive trait
[3] Chediak Higashi anomaly
[4] Photophobia

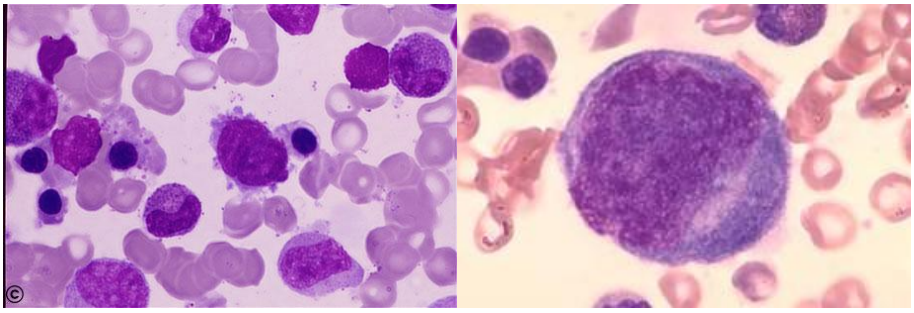
آنومالی می-هگلین

این بیماری به صورت اتوزوم غالب به ارث می رسد. گرانولوسیت‌ها دارای گرانول‌هایی به رنگ بازوفیلی زرد هستند. این انکلوژن ها شبیه اجسام دُل بوده و حاوی RNA می‌باشند. همراه با این اختلال، پلاکت‌های غول آسای حاوی گرانول نیز دیده می‌شود.

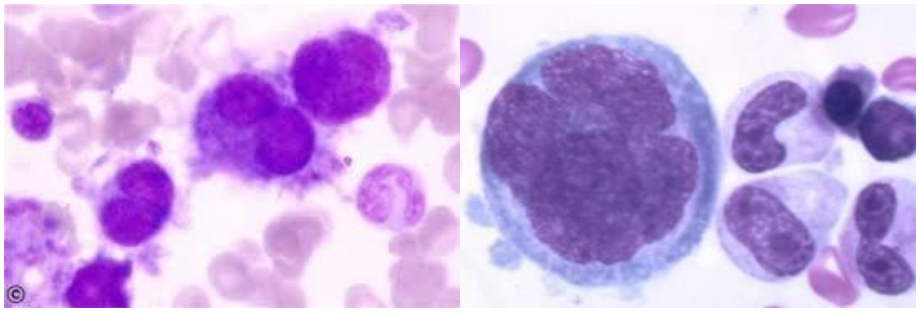
مورفولوژی سلول‌های رده پلاکتی

پیشتاز سازنده پلاکت‌ها، مگاکاریوسیت می‌باشد. در واقع پلاکت‌ها قطعات سیتوپلاسمی مگاکاریوسیت هستند که پاهای کاذب ایجاد شده در آن، جدا شده و وارد جریان خون می‌شوند.

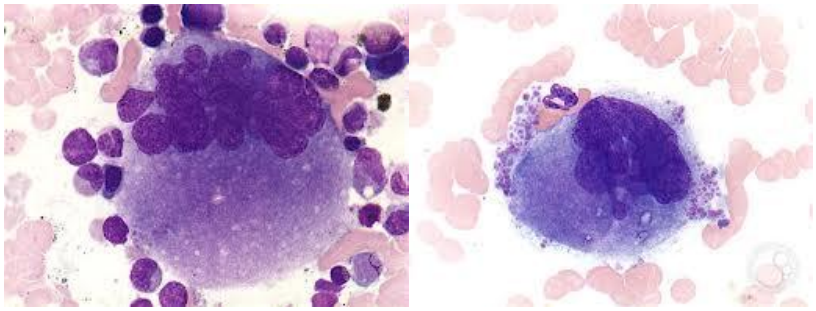
اولین سلول شناخته شده این رده **مگاکاریوبلاست** می‌باشد که در طی مراحل تقسیم توام با تمایز، تولید پرومگاکاریوسیت و مگاکاریوسیت را می‌کند. برخلاف نامش، اندازه چندان بزرگی نداشته و قطر آن ۳۰-۲۰ میکرون می‌باشد. دارای هسته ای بزرگ، بیضی شکل، گاهی نامنظم، گاهی فرورفته، با کروماتین تیره و یکنواخت می‌باشد. ممکن است هسته سلول لوبوله بوده و دارای چند لوب باشد. علیرغم وجود چندین هستک، معمولاً مشاهده آن ها با روش‌های معمولی، مشکل است. مگاکاریوبلاست سیتوپلاسم کمی دارد که نامنظم بوده و به رنگ آبی در اطراف هسته مشاهده می‌شود. حاشیه سیتوپلاسم معمولاً نامنظم بوده و دارای زوائد متعدد نازکی است. به علت وجود ارگانل های درون سلولی، اطراف هسته کم‌رنگ تر از حاشیه آن دیده می‌شود.



پرومگاکاریوسیت بزرگتر از مگاکاریوبلاست بوده و اندازه ای حدود ۷۰-۳۰ میکرون دارد. هسته سلول بزرگ، فرو رفته و چند لوبه است. کروماتین آن متراکم بوده و بعضاً دارای توده های کروماتینی می‌باشد. غشاء هسته ظریف بوده و در این مرحله ممکن است شاهد تقسیم میتوز هسته بدون تقسیم سیتوپلاسم باشیم. تعداد هستک ها از مرحله قبل نیز کمتر بوده ولی باز هم با روش‌های معمول مشاهده آن ها مشکل می‌باشد. سیتوپلاسم آب یا بازوفیلیک است. علیرغم اینکه تعداد گرانول‌های اختصاصی سیتوپلاسمی افزایش یافته، ولی با روش‌های معمولی، سیتوپلاسم بازوفیلی دیده می‌شود. گرانول‌های اختصاصی از دستگاه گلژی مرکزی منشأ گرفته و ابتدا در قسمت حاشیه و کناری سیتوپلاسم، تجمع می یابند. بنابراین در این مرحله شاهد سلولی هستیم با سیتوپلاسم بازوفیلیک و گرانول‌های کناری آزروفیلیک که بصورت نوار باریکی در حاشیه سلول قرار گرفته اند. نسبت هسته به سیتوپلاسم بالا می‌باشد.



مگاکاریوسیت با قطری حدود ۱۰۰–۳۰ میکرون، می‌تواند بزرگترین سلولی باشد که در مغزاستخوان دیده می‌شود، بطوری که می‌توان با عدسی های شیئی ۴۰ و یا حتی ۱۰، به راحتی آن را مشاهده کرد. هسته متراکم تر، فرورفته تر و کاملاً لوبوله است. لوب های هسته در برخی موارد نیز کاملاً از یکدیگر جدا هستند. کروماتین بشدت متراکم بوده و هستک مشاهده نمی‌شود. سیتوپلاسم وسیع، صورتی رنگ با حاشیه نامنظم و دارای برجستگی های متعدد به شکل پای کاذب می‌باشد. زمینه سیتوپلاسم آبی بسیار کمرنگ بوده و دارای تعداد بسیار زیادی گرانول‌های آزروفیلیک می‌باشد. گرانول‌ها بصورت تجمعات توده ای درون سیتوپلاسم دیده می‌شوند و اطراف هر کدام از آن ها را هاله کم‌رنگی فراگرفته است. در حاشیه سلول هر توده پلاکتی، به همراه هاله کمرنگ اطراف خود، از سلول جدا شده و تولید پلاکت‌ها را می‌کند.



قطر **پلاکت** بطور نرمال ۴–۱ میکرون بوده اما ممکن است پلاکت‌های جوان، ۳–۲ برابر پلاکت‌های نرمال قطر داشته باشند. پلاکت‌ها که در واقع قطعات جدا شده از سیتوپلاسم مگاکاریوسیت‌های کاملاً تمایز یافته هستند، سلول‌های بدون هسته بوده که در گسترش های رنگ‌آمیزی شده، بصورت اجسامی کوچک و تقریباً گرد و به رنگ قرمز روشن مشاهده می‌شوند که بطور واضح، حاوی گرانول‌های متعددی هستند. گرانول‌ها بصورت تجمعاتی در مرکز پلاکت دیده می‌شوند که به این تجمعات، Granulomere گفته می‌شود. البته به علت رنگ پذیری این ناحیه، Chromomere نیز گفته می‌شود و در مقابل ناحیه اطراف آن که بدون رنگ دیده می‌شود، Hyalomore نامیده شده است.

مورفولوژی سلول‌های رده اریتروئیدی

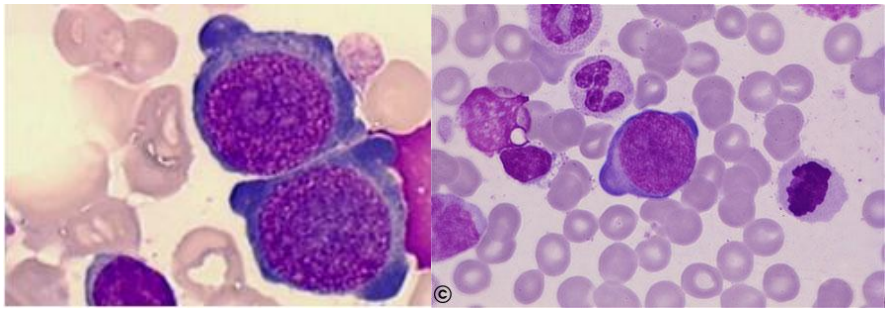
بطور کلی در طی روند اریتروپوئز در مراحل مختلف، به تدریج اندازه سلول‌ها کوچکتر شده و هسته آنها نیز متراکم تر می‌شود و در نهایت به بیرون از سلول رانده می‌شود. سیتوپلاسم نیز از رنگ آبی تیره (بدلیل وجود مقادیر فراوان RNA)، به رنگ قرمز (به علت ساخت هموگلوبین)، تغییر رنگ می دهد.

سلول‌های اریتروئیدی در مغزاستخوان در تماس با ماکروفاژها هستند که در این حالت مجموعه ای از چند سلول اریتروئیدی اطراف یک ماکروفاژ را همچون جزیره فرا گرفته اند که به این مجموعه، جزایر اریتروبلاستی[1] می گویند.

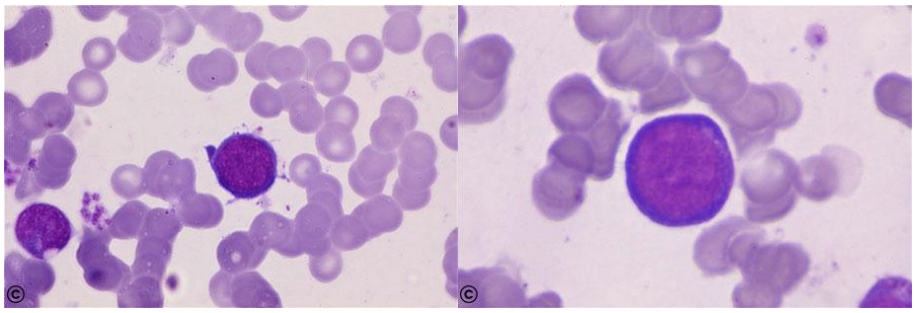
پرونرموبلاست[2] اولین سلول پیشساز رده اریتروئیدی قابل شناسایی در مغزاستخوان بوده و در طی مراحل بلوغی خود، نهایتاً به ۳۲–۸ عدد گلبول قرمز تبدیل می‌شود. قطر سلول ۲۰–۱۲ میکرون بوده و نسبت هسته به سیتوپلاسم در آن بالاست. هسته سلول بزرگ و گرد بوده، یکنواخت رنگ می گیرد و دارای الگوی کروماتینی نقطه ای[3] است، بدین مفهوم که شبیه نقطه های بهم چسبیده است. در مقایسه با هسته سلول‌های بلاست گلبول‌های سفید، متراکم تر بنظر می رسد. ممکن است چند هستک

[1] Erythroblastic Island
[2] Pronormoblast or Proerythroblast
[3] Stippled chromatin

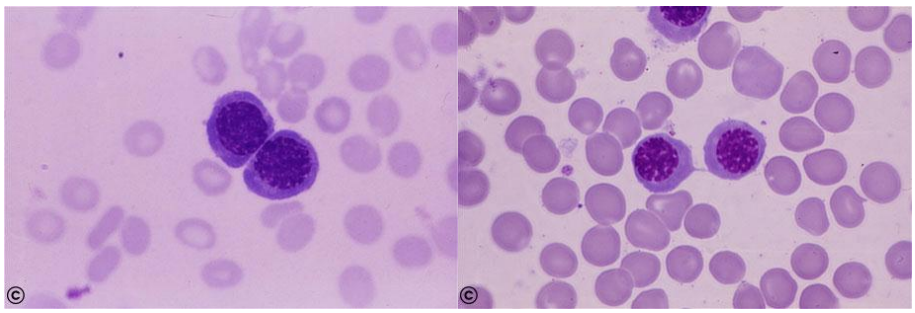
نیز دیده شود. در برخی موارد نیز دستگاه گلژی بصورت یک ناحیه بی رنگ در اطراف هسته و چسبیده به آن دیده می‌شود. سیتوپلاسم شدیداً بازوفیلی و فاقد گرانول، به مقدار کم اطراف هسته را فراگرفته است. در این مرحله ممکن است هموگلوبین سازی آغاز شود. پرونرموبلاست تقسیم میتوز انجام داده و سلول بعدی را ایجاد می‌کند.



دو عدد **بازوفیلیک نرموبلاست**[1] از هر پرونرموبلاست ایجاد می‌شود. این سلول کوچک تر از پرونرموبلاست بوده و اندازه آن ۱۶-۱۰ میکرون می‌باشد. نسبت هسته به سیتوپلاسم کاهش پیدا کرده و در نتیجه دارای سیتوپلاسم بیشتری است که بخاطر فعالیت پروتئین سازی شدید، از بازوفیلی بیشتری برخوردار است. هسته سلول متراکم تر شده و کروماتین آن غیر یکنواخت می‌باشد و در قسمت هایی از هسته فشردگی و کروماتین توده ای دارد بطوری که به هسته نمای چرخ گاری می دهد.

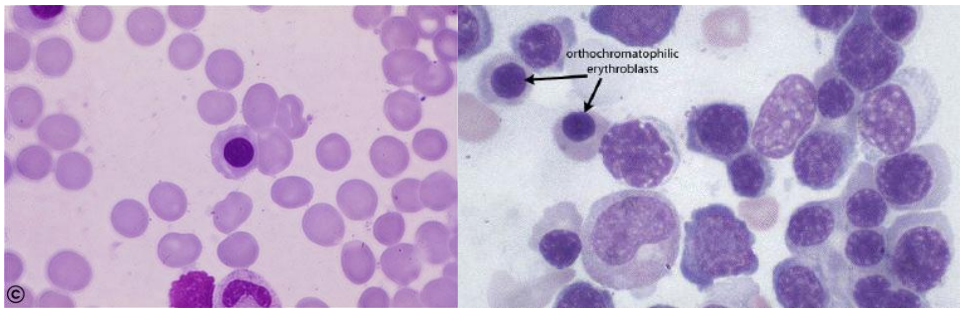


پلی کروماتوفیلیک نرموبلاست[2] قطری حدود ۱۲-۱۰ میکرون دارد. نسبت هسته به سیتوپلاسم کاهش یافته و سیتوپلاسم بخاطر ساخت heme (که به سیتوپلاسم رنگ قرمز می دهد) و ساخت گلوبین (که باعث بازوفیلی سیتوپلاسم می‌شود)، ترکیبی از هر دو رنگ را دارد و به همین علت، پلی کروماتوفیل نامیده می‌شود. هسته سلول گرد و دارای توده های کروماتینی بوده و به شدت رنگ می گیرد. این سلول، آخرین سلول رده اریتروئیدی است که تقسیم میتوز انجام می دهد.

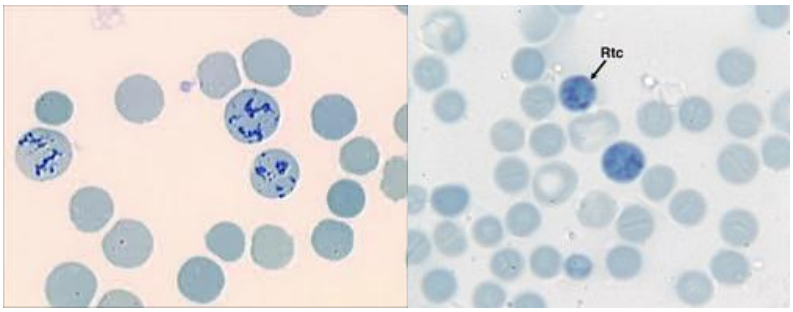


[1] Basophilic normobast/erythroblast
[2] Polychromatophilic normobast/erythroblast

در **ارتوکروماتوفیلیک نرموبلاست**[1] نسبت هسته به سیتوپلاسم کاهش یافته و هسته تنها یک چهارم سلول را اشغال می‌کند. کروماتین از تراکم بسیار بالایی برخوردار است. سیتوپلاسم بیشتر به رنگ نارنجی یا صورتی دیده می‌شود. در اواخر این مرحله، هسته چروکیده شده و به یک گوشه رانده می‌شود که اصطلاحاً به آن هسته Pyknotic می گویند. هسته پیکنوتیک در نهایت قطعه قطعه شده و از سلول خارج می‌شود. ارتوکروماتیک نرموبلاست قادر به سنتز DNA نبوده و بنابراین قابلیت تقسیم ندارد.



رتیکولوسیت گلبول قرمز جوانی است با اندازه ۱۲-۸ میکرون که فاقد هسته ولی دارای بقایای RNA و میتوکندری در سیتوپلاسم می‌باشد. بخاطر وجود همین بقایای RNA، در رنگ‌آمیزی رایت، سلول آبی کمرنگ به خود می گیرد و یا آمیخته ای از رنگ صورتی و آبی می‌باشد که با توجه به نحوه رنگ گرفتن رتیکولوسیت، واژه گلبول Polychromasia نیز به آن اطلاق می‌شود. رتیکولوسیت‌ها در حالت عادی، حدود ۱٪ گلبول هی قرمز در گردش را تشکیل می‌دهند(50×10^{9} /L). در مایسه با گلبول قرمز بالغ دارای دانسیته پایین تری بوده و هنگام سانتریفیوژ، بالاتر از آن قرار می گیرد. تقریباً ۶۵٪ هموگلوبین موجود در گلبول‌های قرمز در مراحل نرموبلاستی و ۳۵٪ بقیه در مرحله رتیکولوسیتی ساخته می‌شود. رتیکولوسیت‌ها پس از ایجاد، در حالت عادی ۲ روز را در مغزاستخوان و یک رو را در خون محیطی سپری کرده و سپس تبدیل به اریتروسیت می‌شوند.



اریتروسیت یک سلول مقعرالطرفین[2] با ضخامت ۲/۶ میکرون، قطر تقریبی ۷/۵-۷ میکرون و حجم ۱۰۰-۸۰ fL می‌باشد. این سلول فاقد هسته، میتوکندری و ریبوزوم بوده و در عین حال برخی از آنزیم های مهم آن از دست رفته است و بنابراین قادر به ساخت پروتئین و یا لیپید جدید نمی‌باشد و بنابراین هموگلوبین سازی در مرحله اریتروسیتی متوقف می‌شود. مقدار زیادی هموگلوبین در درون گلبول قرمز بالغ وجود دارد و از آنجا که یک پروتئین اسیدوفیل است، سلول به رنگ صورتی یا نارنجی در می آید. شکل مقعرالطرفین اریتروسیت، باعث افزایش نسبت سطح به حجم (S/V) و در نتیجه افزایش بازده اکسیژن رسانی می گردد. از طرف دیگر، گلبول‌های مقعرالطرفین در مقایسه با گلبول‌های کروی، از قابلیت انعطاف بیشتری برخوردار است.

[1] Orthochromatophilic normobast/erythroblast
[2] Biconcave disk

مورفولوژی گلبول‌های قرمز در خون محیطی

همزمان با مطالعه گستره خون محیطی، تغییرات پنج گانه گلبول‌های قرمز نیز بررسی و گزارش می‌شوند. این تغییرات عبارتند از:

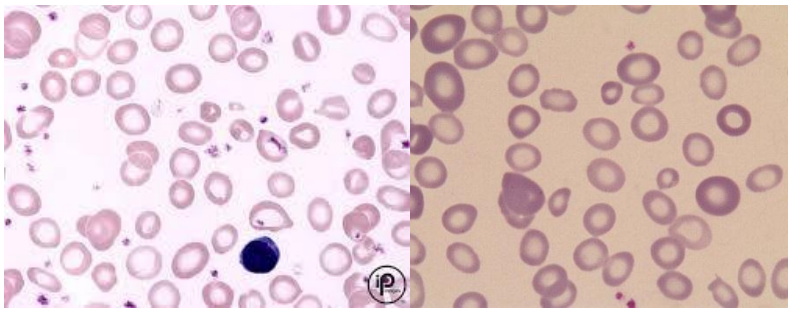
۱- تغییر در رنگ پذیری
۲- تغییر در اندازه
۳- تغییرات در توزیع و تجمعات گلبولی
۴- تغییر در شکل
۵- وجود اجسام غیرطبیعی

تغییر در رنگ پذیری

تغییرات رنگ گلبول‌های قرمز، معمولاً در ارتباط با محتوای هموگلوبین آن ها می‌باشد. گلبول‌های قرمز طبیعی بطور متوسط دارای MCH=30pg بوده که اکثراً در اطراف گلبول (اطراف ناحیه کمرنگ مرکزی) بصورت محلول وجود دارد. در برخی بیماری ها، ناحیه کمرنگ مرکزی، بزرگتر و یا کوچک تر می‌شود.

هیپوکروم[1]

هنگامی که از میزان هموگلوبین کاسته شود، ناحیه کمرنگ مرکزی، بزرگتر شده و گلبول قرمز، رنگ پریده تر و کمرنگ تر دیده می‌شود. در این حالت معمولاً هم MCH و هم MCHC کاهش می یابند. سلول‌های هیپوکروم معمولاً کوچکتر از حد طبیعی بوده (کمتر از ۷۶ fL) ولی ممکن است اندازه طبیعی نیز داشته باشند. گلبول‌های قرمز هیپوکروم در مواردی نظیر کم‌خونی فقر آهن، تالاسمی، کم‌خونی سیدروبلاستیک و گاهی در کم‌خونی بیماری های مزمن دیده می‌شوند.



هیپرکروم[2]

حالتی است که در آن اندازه ناحیه کمرنگ مرکزی کاهش پیدا کرده و گلبول قرمز پررنگ به نظر می رسد. در اصل هیپرکروم واقعی وجود ندارد. بزرگ شدن سلول و افزایش ضخامت (کم‌خونی مگالوبلاستیک و اسفروسیتوز ارثی) باعث این امر می‌شود.

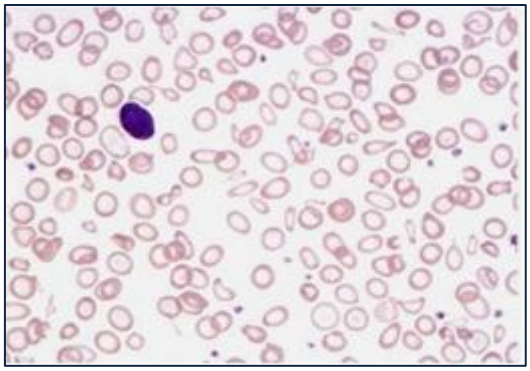
آنیزوکروم[3]

وجود همزمان سلول‌های هیپوکروم و نرموکروم در گستره خون محیطی، آنیزوکرومی یا گاهی کم‌خونی دوشکلی[1] نامیده می‌شود. این حالت ویژگی کم‌خونی سیدروبلاستیک می‌باشد، اما در کم‌خونی فقر آهن بدنبال چند هفته درمان با آهن، یا در کم‌خونی هیپوکرومیک پس از تزریق خون نیز مشاهده می‌شود.

[1] Hypochromia
[2] Hyperchromia
[3] Anisochromia

لپتوسیت[2] و آنولوسیت[3]

لپتوسیت‌ها گلبول‌های قرمز طبیعی هستند که ناحیه کمرنگ مرکزی در آنها افزایش یافته و یک حلقه کمرنگ هموگلوبین در حاشیه گلبول وجود دارد. این سلول‌ها معمولاً فنجانی شکل بوده و شبیه استوماتوسیت هستند، ولی عمق کمتری دارند. افزایش نسبت سطح به حجم به علت کاهش محتوای هموگلوبین یا افزایش سطح می‌باشد. گلبول حلقه ای میکروسیت را آنولوسیت می‌نامند.



تغییرات مربوط به اندازه سلول‌ها

گلبول‌های قرمز طبیعی دارای قطری معادل ۷ میکرون و حجم متوسط در حدود ۱۰۰-۸۰ فمتولیتر می‌باشند.

ماکروسیت[4]

در صورتی که قطر گلبول‌های قرمز بیش از ۸ میکرون شود و یا حجم آن ها از ۱۰۰ fL بیشتر شود، حالت ماکروسیتوز دیده می‌شود. ماکروسیت‌ها در مواردی نظیر بیماری های کبدی، الکلیسم، کم‌خونی مگالوبلاستیک و همچنین در مواردی نظیر برداشت طحال، کم‌خونی آپلاستیکف اختلالات غدد درون ریز و میلودیسپلازی ها ممکن است دیده شود. ماکروسیت‌ها از لحاظ محتوای هموگلوبین، یعنی MCHC، معمولاً طبیعی هستند. اندازه سلول ماکروسیت، ۱۲-۹ میکرون بوده و در صورتیکه اندازه آن به بیش از ۱۲ میکرون برسد، سلول مگالوسیت[5] نامیده می‌شود.

میکروسیت[6]

به گلبول‌های قرمز با اندازه کمتر از ۸ میکرون و حجم کمتر از ۸۰ fL ، میکروسیت گفته می‌شود. کم‌خونی های میکروسیتیک، معمولاً به علت ساخت ناکافی هموگلوبین رخ می‌دهند و به همین دلیل میکروسیت‌ها معمولاً هیپوکروم نیز می‌باشند در تالاسمی، کم‌خونی سیدروبلاستیک، کم‌خونی فقر آهن و در کم‌خونی ناشی از بیماری های مزمن، گلبول‌های میکروسیت دیده می‌شوند.

---

[1] Dimorphic
[2] Leptocyte
[3] Annulocyte
[4] Macrocyte
[5] Megalocyte
[6] Microcyte

آنیزوسیتوز[1]

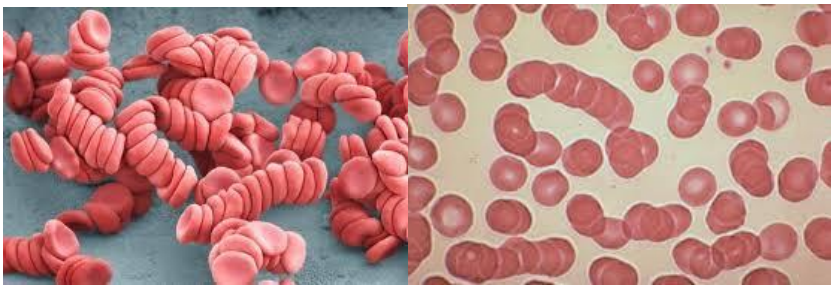
یک اصطلاح کلی برای بیان تنوع در اندازه گلبول‌های قرمز و بررسی MCV و یا RDW می‌باشد. در صورتی که طیف وسیعی از لحاظ اندازه سلول‌ها، شامل ماکروسیت، میکروسیت و نرموسیت در خون وجود داشته باشد، MCV ممکن است طبیعی باشدف زیرا که این پارامتر میانگینی از اندازه تمام گلبول‌های قرمز است. در این موارد، شاخص RDW کمک زیادی به تشخیص و رفع این موارد می‌کند. یک RDW بیش از ۱۴/۵ نشاندهنده آن است که گلبول‌های قرمز از لحاظ اندازه، متنوع و ناهمگون[2] هستند. در این گونه موارد علاوه بر RDW، مطالعه و بررسی لام خون محیطی بیمار نیز بسیار مفید است. با بررسی اندازه گلبول‌های قرمز و مقایسه آن ها با هسته لنفوسیت‌های کوچک، می‌توان تنوع اندازه، یعنی آنیزوسیتوز را به صورت خفیف تا شدید و از یک الی چهار مثبت، گزارش کرد.

تغییرات در توزیع و تجمعات گلبولی

در حالت طبیعی و در گستره خون محیطی که خوب و مناسب تهیه شده باشد، در نوک گستره، گلبول‌ها بطور یکنواخت درکنار یکدیگر قرار می گیرند. تجمعات غیرطبیعی گلبول‌ها در این منطقه از گستره، می‌تواند نشاندهنده موارد پاتولوژیک باشد.

رولو[3]

اصطلاح رولو به گلبول‌های قرمزی اشاره دارد که همچون سکه روی یکدیگر قرار گرفته، جدا از یکدیگر نبوده و در یک ردیف روی هم چیده شده اند. در اکثر مواردف پدیده رولو به صورت آرتیفکت بوده و در اثر ماندن خون برای مدت طولانی بوجود می آید. در رابطه با موارد پاتولوژیک، بیشترین حالتی که با رولو همراه است، هیپرپاراپروتئینمی می‌باشند. افزایش فیبرینوژن یا گلوبولین ها، وجود اشکال غیرطبیعی نظیر گلبول‌های داسی شکل و مالتیپل میلوما، مواردی هستند که در آن ها تشکیل رولو اتفاق می افتد.



آگلوتیناسیون[4]

در صورت وجود آنتی بادی برعلیه گلبول‌های قرمز، این سلول‌ها آگلوتینه شده و تشکیل تجمعات نامنظم در اندازه های مختلف می‌دهند. این تجمعات بواسطه شکل خوشه انگوری خود، از رولو قابل تمییز هستند. در شمارش گلبول‌های قرمز با سل‌کانتر، به علت چسبندگی گلبول‌ها به یکدیگر، شمارش سلولی کاهش داشته، ولی MCV افزایش نشان می دهد. در این گونه موارد میزان طبیعی هموگلوبین می‌تواند نشاندهنده آگلوتیناسیون باشد.

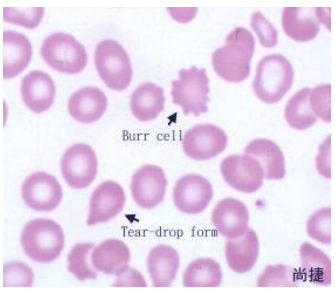
[1] Anisocytosis
[2] Heterogene
[3] Rouleaux
[4] Agglutination

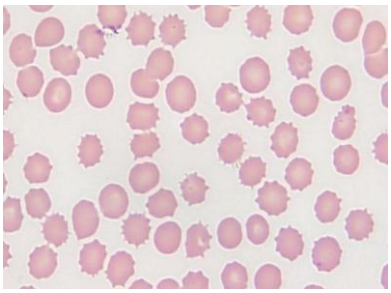
اشکال غیرطبیعی گلبول‌های قرمز

اکینوسیت[1] یا سلول کنگره دار[2]

این سلول‌ها معمولاً کوچک تر از گلبول‌های قرمز طبیعی بوده و همراه با زوائد و برامدگی های ظریف، منظم و نیزه مانند در سطح گلبول می‌باشند. به عبارت دیگر، سلول حالت چروکیده و کنگره دار دارد. ایجاد اکینوسیت هم وجود حالات پاتولوژیک را مطرح می‌کند و هم می‌تواند بدلیل خطاهای تکنیکی و در نتیجه بصورت آرتیفکت بروز کند. کمبود و نقص آنزیم پیرووات کیناز، ناراحتی های کلیوی و اورمی از جمله حالات پاتولوژیک ایجاد اکینوسیت می‌باشند. وجود آب در متانول و همچنین ماندن خون بیمار به مدت چند روز در دمای ۴ درجه و همچنین مقدار نامتناسب ضدانعقاد، از موارد ایجاد اکینوسیت به صورت آرتیفکت می‌باشند.

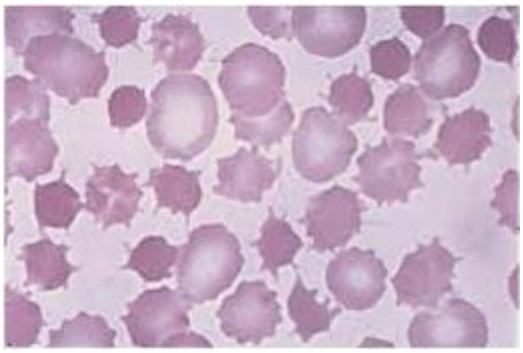
گلبول‌های اکینوسیت، قابلیت برگشت و تبدیل به سلول‌های طبیعی را دارا می‌باشند. در صورت تداوم این وضعیت، ممکن است اکینوسیت توسط طحال به دام افتاده و در نهایت به اسفروسیت تبدیل شود که قابلیت برگشت به سلول طبیعی را ندارد.





آکانتوسیت[3]

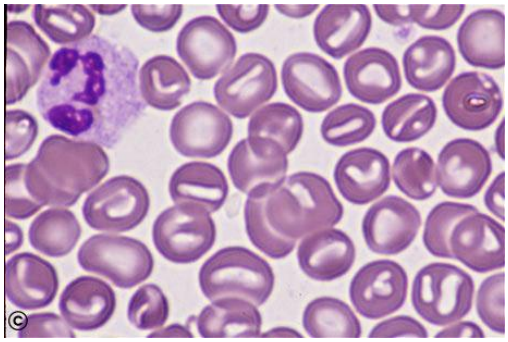
این گلبول‌ها دارای زوائد بزرگ و نامنظم بوده که اغلب انتهای این برآمدگی ها حالت چماقی شکل یا حبابی دارند. احتمالاً تغییر محتوای لیپیدی غشاء و افزایش نسبت کلسترول به لسیتین، علت تشکیل آکانتوسیت باشد. در بیماری های کبدی، Abetalipoproteinemia، سوء جذب چربی، اختلال در متابولیسم لیپیدها و التهاب رنگدانه ای شبکیه[4] و همچنین در افراد دارای فنوتیپ مک لئود[5]، دیده می‌شود. طول عمر آکانتوسیت‌ها طبیعی است و شکنندگی اسمزی ممکن است کاهش مختصری داشته باشد.



[1] Echinocyte or Burr cell
[2] Crenated cell
[3] Acanthocyte or Spur cell
[4] Retinitis Pigmentosa
[5] Mc Leod

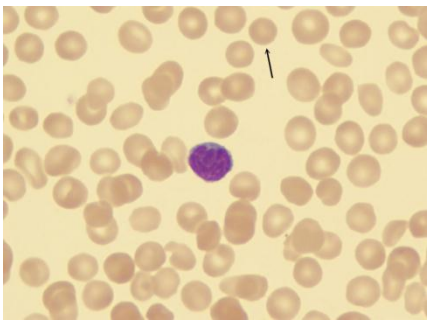
استوماتوسیت[1]

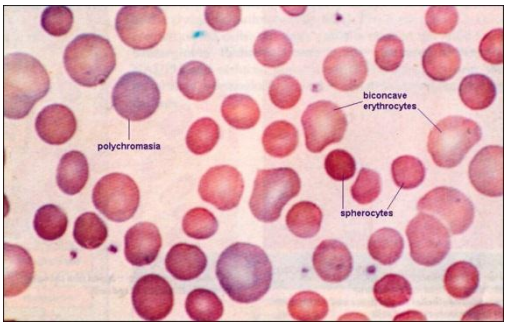
این سلول‌ها در گستره خون محیطی بصورت گلبول‌هایی دیده می‌شوند که ناحیه کمرنگ مرکزی آن ها به شکل یک منطقه شکاف مانند شبیه دهان ماهی درآمده است. این گلبول‌ها در لام مرطوب، فنجانی شکل بوده و به شکل صفحاتی با یک سطح مقعر مشاهده می‌شوند. درست برخلاف آکانتوسیت، تصور می‌شود که علت ایجاد استوماتوسیت، افزایش سطح لایه داخلی غشاء در مقایسه با لایه خارجی می‌باشد. استوماتوسیت‌ها در کم‌خونی نادر استوماتوسیتوز ارثی[2] که بصورت اتوزوم غالب به ارث می رسد، دیده می‌شود. در مواردی نظیر سیروز الکلی، مسمومیت با سرب، بیماری Rh null و نئوپلاسم ها نیز دیده می‌شود. استوماتوسیت‌ها نیز همانند اکینوسیت‌ها، قابلیت بازگشت به سلول طبیعی را دارا هستند، ولیکن ممکن است تحت شرایطی به اسفروسیت تبدیل شده و امکان بازگشت به حالت طبیعی را از دست بدهند.



اسفروسیت[3]

گلبول‌هایی هستند که شکل مقعرالطرفین (دیسکوئیدی) خود را از دست داده و حالت کروی به خود گرفته اند. درنتیجه نسبت سطح به حجم کاهش یافته است. این سلول‌ها در گستره رنگ‌آمیزی شده بصورت کره های توپُر و کوچک تر از حد طبیعی و فاقد ناحیه کم‌رنگ مرکزی و یا همراه با کاهش ناحیه کم‌رنگ مرکزی مشاهده می‌شوند. اگرچه در گستره خون محیطی بصورت میکروسیت دیده می‌شوند، ولی حجم گلبول معمولاً طبیعی است زیرا متناسب با کاهش قطر، ضخامت سلول افزایش پیدا کرده است. به علت افزایش MCHC در اسفروسیتوز، حالت هیپرکروم دیده می‌شود، هرچند که هیپرکروم واقعی وجود ندارد. در اسفروسیتوز، شکنندگی اسمزی افزایش دارد. اسفروسیت‌ها قابلیت انعطاف کمتری نسبت به گلبول‌های طبیعی داشته، طول عمر آنها کمتر بوده و به مرور توسط طحال از جریان خون برداشت می‌شوند. اسفروسیت‌ها بیشتر در اسفروسیتوز ارثی و بندرت در کم‌خونی همولیتیک ایمیون، کم‌خونی همراه با اجسام هاینز و سوختگی های شدید دیده می‌شود.





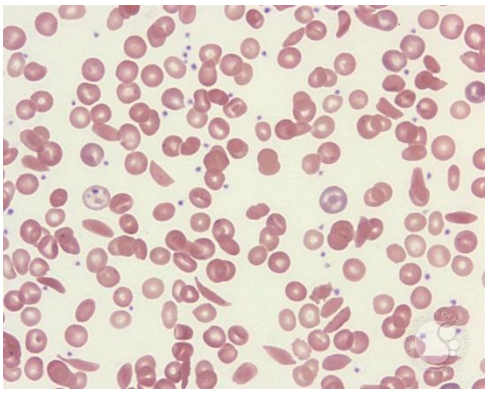
[1] Stomatocyte
[2] Hereditary Stomatocytosis
[3] Spherocyte

سلول هدف[1] یا کودوسیت[2]

این گلبول‌ها به شکل سلول‌های نازک و زنگوله ای شکل بوده که نسبت سطح به حجم آنها، افزایش پیدا کرده است. این سلول‌ها در گستره رنگ شده به شکل سیبل تیراندازی دیده می‌شوند، بدین صورت که مرکز سلول تیره رنگ بوده و اطراف آن را حلقه سیتوپلاسم بدون رنگ فراگرفته است. علت ایجاد این سلول‌ها، افزایش لیپیدهای غشایی می‌باشد و در مواردی چون بیماری های کبدی، نقص ارثی LCAT[3]، متعاقب برداشت طحال، تالاسمی، هموگلوبینوپاتی های S و C و بیماری های کبدی، دیده می‌شود. در کم‌خونی فقر آهن نیز ممکن است سلول‌های هدف دیده شوند.

سلول داسی شکل[4]

سلول‌های کشیده هلالی یا داسی شکل با انتهای نوک تیز و باریک می‌باشند. سلول‌های داسی شکل در گستره رنگ نشده و مرطوب، قابل مشاهده هستند. علت اصلی تشکیل این سلول‌ها، جایگزینی اسیدآمینه والین به جای گلوتامیک اسید در موقعیت ششم زنجیره بتا می‌باشد. در سلول داسی شکل، شکنندگی مکانیکی افزایش یافته ولی شکنندگی اسمزی کاهش می‌یابد. سلول داسی شکل با ممانعت از تشکیل رولو، باعث کاهش ESR، علیرغم وجود التهاب، می‌شود.

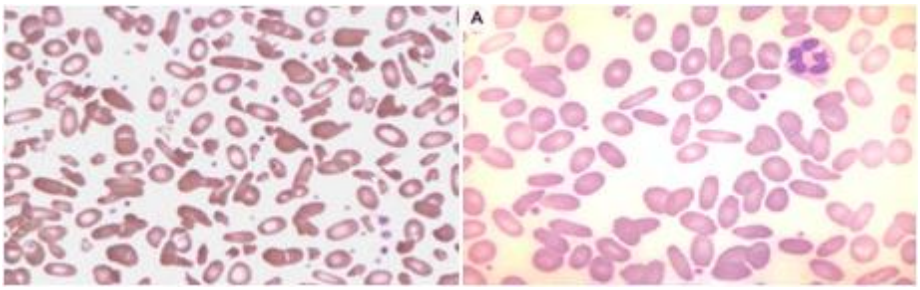


[1] Target cell or Mexican hat cell
[2] Codocyte
[3] Lecithin Cholesterol Acyl Transferase
[4] Sickle cell or Drepanocyte

الیپتوسیت[1] و اوالوسیت[2]

در برخی موارد گلبول‌های قرمز از حالت دیسکوئیدی خارج شده و به حالت بیضی تا حالت کشیده و سیگاری شکل دیده می‌شوند. گلبول‌های بیضی شکل را اوالوسیت و به گلبول‌های کشیده تر، الیپتوسیت گفته می‌شود. در گلبول‌های الیپتوسیت، محور طولی بیش از ۲ برابر محور عرضی سلول است. این سلول‌ها در الیپتوسیتوز ارثی و همچنین در کم‌خونی فقر آهن، تالاسمی و همچنین کم‌خونی همراه با لوسمی ممکن است دیده شوند. در صورتی که الیپتوسیتوز ارثی با مورفولوژی یکدست الیپتوسیت همراه باشد، در گروه غیرهمولیتیک قرار می گیرد و پانچه با گلبول‌های اسفروسیت و الیپتوسیت‌های شکسته همراه باشد، الیپتوسیتوز همولیتیک گفته می‌شود.علت تشکیل الیپتوسیت، نقص در پروتئین های غشایی اسپکترین و پروتئین ۴/۱ می‌باشد.

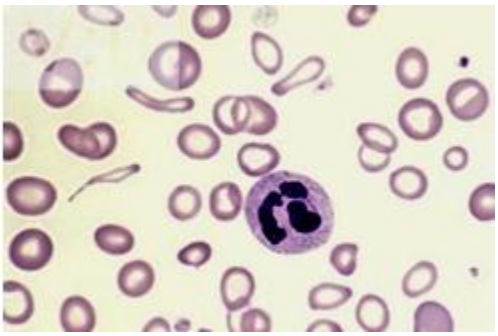
در کم‌خونی مگالوبلاستیک نیز گلبول‌های بزرگ بیضی شکل بنام Macro ovalocyte دیده می‌شوند. شکنندگی اسمزی الیپتوسیت‌ها و اوالوسیت‌ها طبیعی است، مگر اینکه به علت بیماری الیپتوسیتوز ارثی ایجاد شده باشند.



شکل: الیپتوسیتوز: همولیتیک (عکس چپ)، غیرهمولیتیک (عکس راست)

گلبول مدادی شکل[3]

به الیپتوسیت‌های کشیده شده بسیار هیپوکروم می گویند که حاشیه های آنها بسیار به هم نزدیک شده اند. این مورفولوژی در کم‌خونی فقر آهن پیشرفته شایع است.

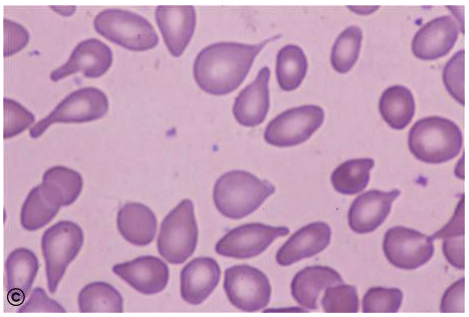


شکل: گستره محیطی در کم‌خونی فقرآهن، مورفولوژی میکروسیت هیپوکروم و آنولوسیت همراه با تغییرات اندازه و گلبول‌های مدادی شکل را نشان می دهد.

[1] Elliptocyte
[2] Ovalocyte
[3] Pencil shape RBC

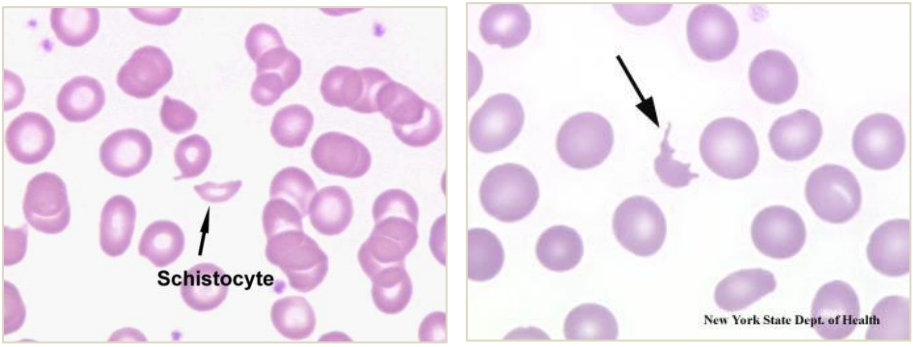
سلول قطره اشکی[1]

همانگونه که از نامشان پیداست، این سلول‌ها از یک طرف کشیده شده و شبیه قطره اشک می‌باشند. متعاقب ورود گلبول‌های قرمز دارای انکلوژن به طحال، سلول‌های قطره اشکی ایجاد می‌شوند. در جریان بیماری تالاسمی، سلول‌های دارای اجسام هاینز پس از عبور از طحال و جدا شدن انکلوژن، به شکل سلول‌های قطره اشکی در می آیند. داکروسیت‌ها در مواردی نظیر میلوفیبروز و سرطان متاستاز دهنده به مغزاستخوان نیز دیده می‌شوند که مکانیسم ایجاد آنها در ای حالت نامشخص است. این سلول‌ها قابلیت برگشت به حالت طبیعی را ندارند.



گلبول‌های قرمز شکسته شده[2]

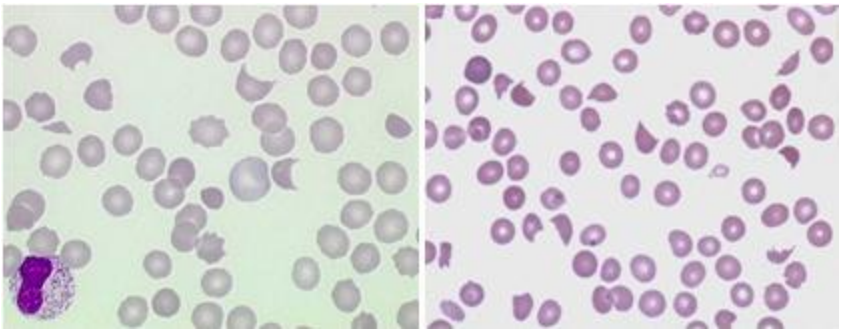
گلبول‌های قرمز قطعه قطعه هستند که به علت صدمه مکانیکی به سلول ایجاد شده اند. این سلول‌ها به اشکال مختلف نظیر مثلثی[3]، کلاه خودی[4]، شبیه کاما و غیره دیده می‌شوند. این سلول‌ها ممکن ست در نتیجه اختلالات عروقی ایجاد شوند، بخصوص در مواردی که رشته‌های فیبرین در داخل عروق تشکیل می‌شود. گلبول‌های قرمز شکسته در حالاتی نظیر DIC، TTP و کم‌خونی های میکروآنژیوپاتیک دیده می‌شوند. اختلالات دریچه های قلبی، اورمی و سوختگی نیز ممکن است ایجاد گلبول‌های شیستوسیت کنند.



[1] Tear drop cell or Dacrocyte
[2] Schistocyte
[3] Triangular
[4] Helmet shaped

کراتوسیت[1]

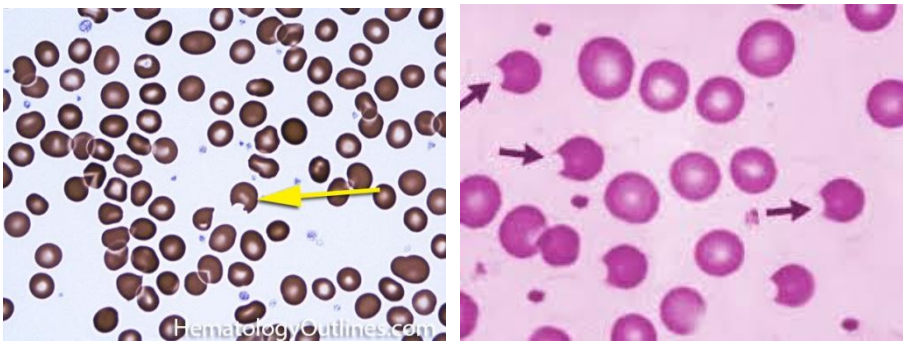
به گلبول قرمزی گفته می‌شود که دارای دو زائده خاری شکل است. این گلبول یا گلبول‌های شکسته، به همراه مورفولوژی های دیگر مشاهده می‌شود.



شکل: کراتوسیت به همراه گلبول‌های شکسته

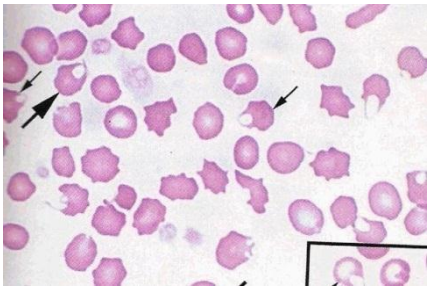
سلول گاز گرفته شده[2]

سلولی است که گویی بخشی از آن کنده شده است. در مواردی نظیر همولیز با واسطه دارو و همچنین نقص G6PD دیده می‌شوند که از ویژگی های تشخیصی این دو بیماری می‌باشند. این موارد با تولید اجسام هاینز همراه بوده، که در هنگام عبور از طحال به دام افتاده و توسط ماکروفاژها، بخشی از گلبول قرمز کنده می‌شود.



سلول تاولی[3]

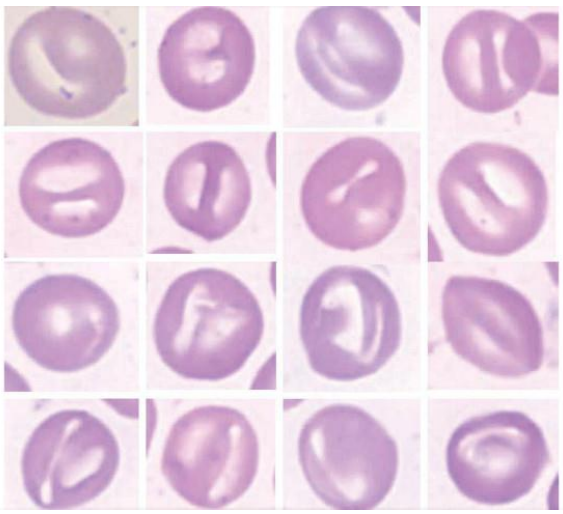
سلولی است که ناحیه کمرنگ مرکزی در آن از حالت مرکزی خارج شده و به گوشه سلول منتقل شده است. این حالت در نقص G6PD دیده می‌شود.



[1] Keratocyte
[2] Bite cell
[3] Blister cell

نیزوسیت[1]

سلول‌هایی هستند با بیش از دو سطح تقعر. مکانیسم تشکیل این سلول‌ها نامشخص بوده و در مواردی نظیر اسفروسیتوز دیده می‌شوند.



پویکیلوسیتوز[2]

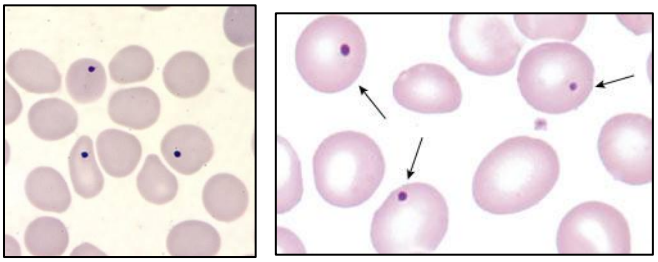
تغییرات شکل گلبول‌های قرمز با اصطلاح کلی پویکیلوسیتوز بیان می‌شود. هر شکل غیرطبیعی گلبول قرمز، یک پویکیلوسیت محسوب می‌شود. چنانچه تغییرات شکل و اندازه باهم مشاهده شوند، اصطلاح Anisopoikylocytosis گزارش می‌شود.

اجسام غیرطبیعی درون گلبول‌های قرمز[3]

در حالت عادی گلبول‌های قرمز فاقد انکلوژن خاصی هستند و ممکن است حتی به تعداد کم در برخی گلبول‌ها وجود داشته باشند که توسط فرآیند Pitting در هنگام عبور از طحال، برداشته می‌شوند. در برخی بیماری ها برخی انکلوژن ها بطور غیرطبیعی در داخل گلبول‌ها دیده می‌شوند که عبارتند از:

اجسام هاول ژولی[4]

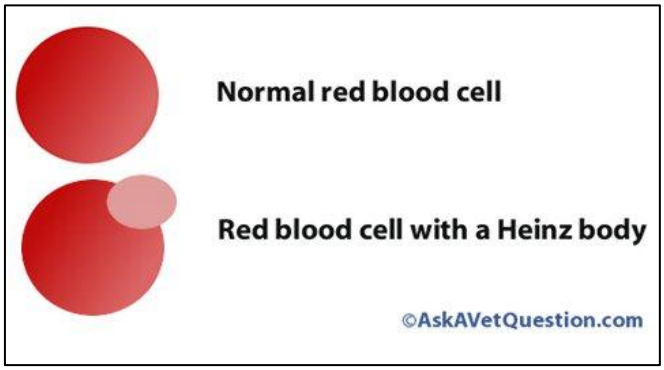
این اجسام بصورت دانه های کروی بنفش و یا ارغوانی در داخل گلبول‌های قرمز دیده می‌شوند و در واقع قطعات DNA می‌باشند. تعداد این گرانول‌ها معمولاً یکی و بندرت بیش از دو عدد است. این گرانول‌ها همراه با اختلالات بلوغ هسته ای نظیر کم‌خونی مگالوبلاستیک و همچنین در کم‌خونی های همولیتیک، کم‌خونی های شدید و متعاقب برداشت طحال، دیده می‌شوند.

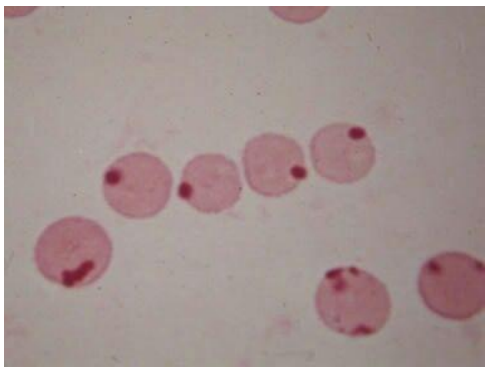


[1] Knizocyte
[2] Poikylocytosis
[3] Inclusion
[4] Howell-Jolly bodies

اجسام هاینز[1]

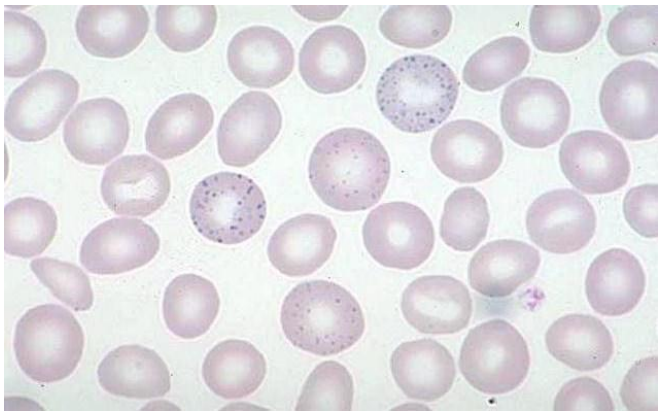
اجسام هاینز بصورت دانه های گرد به اندازه ۳-۲ میکرون، نزدیک یا متصل به غشاء گلبول‌های قرمز دیده می‌شوند. این اجسام متشکل از پروتئین دناتوره بخصوص هموگلوبین می‌باشند. در نقص G6PD، تالاسمی ها و هموگلوبینوپاتی ها و همچنین در اثر مصرف برخی داروها و سموم موثر بر هموگلوبین و متعاقب برداشت طحال، ایجاد می‌شوند.





بازوفیلی منقوط[2]

این گرانول‌ها بصورت ذرات آبی ارغوانی در داخل گلبول‌های قرمز دیده می‌شوند. این ذرات از لحاظ اندازه، متنوع بوده و ممکن است بصورت ریز و پخش در سرتاسر و یا با اندازه های درشت و تنها در بعضی نقاط گلبول مشاهده شوند. بنظر می رسد که در اثر تجمعات ریبوزومی و در نتیجه تجزیه ناقص RNA، این ذرات ایجاد شوند. در رنگ‌آمیزی رایت، این ذرات بصورت گرانول‌های آبی یا ارغوانی در درون سلول مشاهده می‌شوند. از رنگ‌آمیزی حیاتی نیز می‌توان برای مشاهده این ذرات استفاده کرد. بازوفیلی منقوط در مواردی نظیر مسمومیت با سرب، تالاسمی، کم‌خونی سیدروبلاستیک و همولیزهای شدید دیده می‌شود.

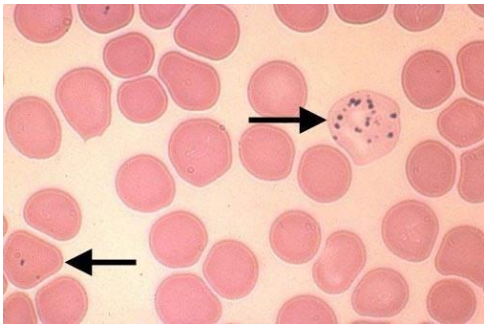


اجسام پاپن هایمر[3]

در حقیقت لیزوزوم های حاوی آهن و یا میتوکندری حاوی ذرات آهن می‌باشند. این گرانول‌های آهن، بصورت رسوبات نامنظم بازوفیلی در داخل گلبول‌های قرمز و نرموبلاست ها دیده می‌شوند و هم با رنگ‌آمیزی های رومانوفسکی و هم با رنگ‌آمیزی

[1] Heinz bodies
[2] Basophilic stippling
[3] Pappenheimer bodies

خاص آهن، یعنی آبی پروس[1]، رنگ می گیرند. با آبی پروس، خود آهن نیز رنگ‌آمیزی می‌شود. در مقایسه با اجسام هاول ژولی، این ذرات کوچک تر بوده و رنگ آنها آبی می‌باشد در حالی که اجسام هاول ژولی، بنفش یا ارغوانی هستند. اجسام پاپن هایمر در تالاسمی ها و کم‌خونی های سیدروبلاستیک، دیده می‌شوند.

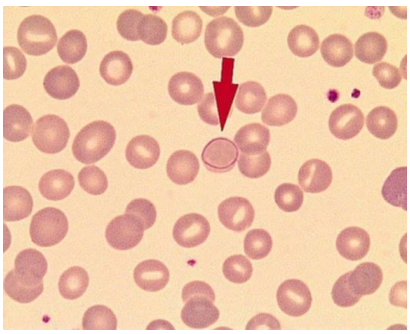


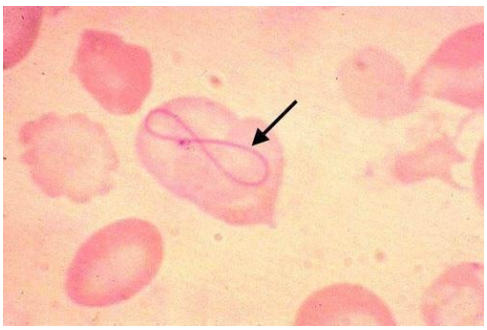
سیدروبلاست[2] و سیدروسیت[3]

در حالت طبیعی در مغزاستخوان، آهن اضافه به شکل ذرات فریتین و تجمعات فریتینی بنام Hemosiderin ذخیره می‌شود. فریتین در آب محلول و هموسیدرین غیرمحلول بوده و بنابراین تنها هموسیدرین در داخل مغزاستخوان رنگ‌آمیزی می‌شود. به سلول‌های پیشساز گلبول‌های قرمز که حاوی تجمعات آهن باشند، سیدروبلاست و به گلبول قرمز بالغ حاوی ذرات آهن، سیدروسیت می گویند. اگرچه هر دو اصطلاح پاپن هایمر و سیدروسیت معادل یکدیگر بکار می روند، ولی معمولاً در مواردی که در رنگ‌آمیزی رومانوفسکی ذرات آهن مشاهده شود، به آنها ذرات پاپن هایمر گفته می‌شود و در صورتی که این ذرات با رنگ آهن مشاهده شوند، ذرات سیدروتیک نامیده می‌شوند.

حلقه های کابوت[4]

ساختارهای حلقه ای شکل بصورت 8 یا پیچ دار بوده که در رنگ‌آمیزی رایت به رنگ قرمز یا ارغوانی دیده می‌شوند. بنظر می رسد که حلقه های کابوت، میکروتوبول های به جا مانده از دوک تقسیم باشند. در کم‌خونی های شدید، مسمومیت با سرب و در اختلالات اریتروپوئز دیده می‌شوند. وجود این حلقه ها نشاندهنده اریتروپوئز غیرطبیعی می‌باشد.





[1] Perl`s Prussian blue
[2] Sideroblast
[3] Siderocyte
[4] Cabot rings

استاندارد گزارش مورفولوژی گلبول‌های قرمز

تغییرات شکل و اندازه با پیشوندهای خفیف (Mild)، متوسط (Moderate) و شدید (Marked) گزارش می‌شود. برای مثال در تالاسمی ماژور، Marked anisopoikilocytosis وجود دارد و یا در اوایل کم‌خونی فقر آهن، Mild anisocytosis مشاهده می‌شود.

تغییرات رنگ با پیشوندهای Slight، Moderate و Marked آورده می‌شوند. برای مثال MCH کمتر از ۱۹ pg، با Marked hypochromia و بین ۲۶–۲۳ با Slight hypochromia همراه است. گلبول‌های پلی کرومازی بدون توجه به MCH گزارش می‌شوند. کمترین مقدار MCH حدود ۱۴ گزارش شده است.

در پیروپویکیلوسیتوز ارثی با MCV حدود ۵۰، بیمار دارای Marked microcytosis است. MCV بین ۸۰–۷۵، گلبول را در گروه Mild microcyte قرار می دهد.

اجسام درون گلبول‌های قرمز با دیدن یک عدد هم گزارش می‌شوند. چنانچه تعداد این اجسام قابل توجه باشد، با واژه های Few، Moderate و Many گزارش می‌شوند، برای مثال در مسمومیت با سرب ممکن است Many Basophilic stippling گزارش شود.

تغییرات شکلی گلبول قرمز به ترتیب اهمیت مورفولوژی گزارش می‌شوند. برای مثال چنانچه گستره خون محیطی دارای اسفروسیت و اکینوسیت باشد، ابتدا اسفروسیت گزارش می‌شود.

چنانچه یک شکل غیرطبیعی بیشتر از ۲۰ عدد در هر میدان میکروسکوپی HPF باشد، با پسوند Osis یا پیشوند Many گزارش می‌شود. مثلاً Spherocytosis یا Many Spherocyte .

مشاهده ۲۰–۱۱ عدد از یک مورفولوژی در تمام میدان های میکروسکوپی، بصورت Moderate و بین ۱۰–۷ عدد، با پیشوند a Few و کمتر از آن با پیشوند Few آورده می‌شود: Many Acanthocyte و یا Few Target cell .

1-6 per OIF*	7-10 per OIF	11-20 per OIF	>20 per OIF
Few	a Few	Moderate	Many (-Osis)
1(+)	2(++)	3(+++)	4(++++)

**OIF : Oil Immersion Field*

لازم به ذکر است که در کتب مختلف، معیارهای مختلفی برای گزارش انواع مورفولوژی گلبول‌های قرمز ذکر شده است که در برخی موارد اختلافات معنی داری بین آن‌ها مشاهده می‌شود. جدول فوق و توضیحات پیش از آن، برگرفته از کتاب مهارت‌های آزمایشگاهی در خون‌شناسی، تألیف دکتر گل‌فشان بوده که خلاصه قابل قبولی از رفرانس‌های مختلف می‌باشد.

U

دستور کار آزمایشگاه خون‌شناسی

آزمایش‌های انعقادی

هموستاز[1] یا انعقاد خون[2]، به معنای توقف خونریزی و بسته شدن خون می‌باشد. در زمان خونریزی، واکنش های انعقاد خون در رگ های آسیب دیده و حتی در رگ های سالم رخ می دهد. پلاکت‌های نرمال، ساختمان سالم جدار عروقی، واکنش صحیح بین فاکتورهای انعقادی، فعالیت مهارکننده‌های انعقادی در زمان مناسب و سیستم فیبرینولیز، عواملی هستند که در انعقاد خون نقش داشته و همه آنها با هم موجب یک هموستاز طبیعی می‌شوند.

تمامی فاکتورهای انعقادی در کبد ساخته می‌شوند. البته فاکتور ۸ علاوه بر کبد، در اندام های دیگر نیز سنتز می‌شود.

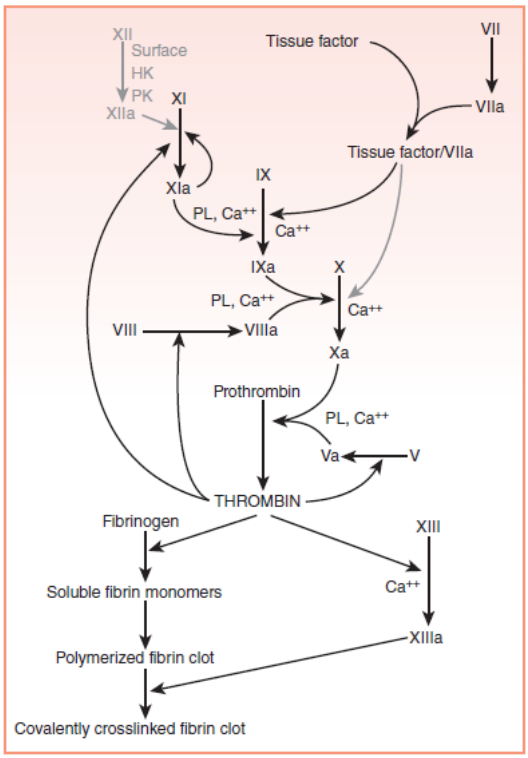
جدول ۱-۸: فاکتورهای انعقادی و اسامی مترادف آنها

Factor I	Fibrinogen
Factor II	Prothrombin
Factor III	Thromboplastin or Tissue factor
Factor IV	Calcium
Factor V	Labile factor
Factor VII	Stable factor
Factor VIII	Anti-Hemophilic factor (AHF) or Anti-Hemophilic factor A
Factor IX	Plasma Thromboplastin component (PTC) or Christmas factor or Anti-Hemophilic factor B
Factor X	Stuart factor or prower factor or Stuart-Prower factor
Factor XI	Plasma Thromboplastin Antecedent (PTA) or Anti-Hemophilic factor C
Factor XII	Hageman factor or Surface factor or Contact factor
Factor XIII	Fibrin Stabilizing factor (FSF) or Fibrinase
Other factors	Prekalikrein (Fletcher factor), High molecular weight kininogen (HMWK, Fitzgerald factor)

** Factor VI: Not assigned*

تصور می‌شود که دو سیستم انعقادی جداگانه داخلی[3] و خارجی[4] وجود داشته باشد. سیستم انعقاد داخلی با فعال شدن فاکتورهای تماسی آغاز به فعالیت کرده و فرآورده نهایی آن تولید فیبرین است. سیستم انعقاد خارجی با ورود فاکتور بافتی به خون آغاز شده و به تولید لخته فیبرینی منتهی می‌شود. هر دو مسیر یاد شده، دارای یک مسیر مشترک[5] می‌باشند.

[1] Hemostasis
[2] Coagulation
[3] Intrinsic pathway
[4] Extrinsic pathway
[5] Common pathway



شکل ۱–۸: نمای شماتیک از آبشار انعقادی. HK (کینینوژن با وزن ملکولی بالا) و PK (پره کالیکرین)

آزمایش زمان نسبی ترومبوپلاستین[1]

اساس آزمایش

آزمایش PTT یا aPTT[2] سیستم انعقاد داخلی را بررسی می‌کند که یک پدیده آزمایشگاهی است. در این آزمایش، پلاسمای سیتراته بیمار با معرف PTT که حاوی فسفولیپید و ذرات شارژدار منفی است، مخلوط شده و با افزودن کلریدکلسیم، زمان انعقاد پلاسما بدست می آید. ذرات با شارژ منفی، موجب تغییراتی در فاکتور ۱۲ و خودفعالسازی آن می‌شوند. فعال شن فاکتور ۱۲ در حضور فاکتورهای PK و HMWK ، تشدید یافته و به ادامه مسیر داخلی مطابق شکل ۱–۸ تا ایجاد لخته فیبرینی منجر می‌شود. در این مسیر، تمامی فاکتورهای انعقادی، بجز ۷ و ۱۳، حضور دارند.

روش انجام آزمایش

مقدار λ ۱۰۰ از پلاسمای بیمار را با λ ۱۰۰ از معرف PTT مخلوط کرده و با توجه با بروشور کیت (معمولاً ۳ دقیقه)، در دمای ۳۷ درجه انکوبه کنید. سپس λ ۱۰۰ از کلرور کلسیم ۰/۰۲۵ مولار که از قبل گرم شده است را به لوله آزمایش اضافه کرده و همزمان کرنومتر را فشار می‌دهیم. زمان لخته شدن پلاسما را به عنوان نتیجه آزمایش PTT برحسب ثانیه ثبت می‌کنیم.

[1] Partial Thromboplastin Time (PTT)
[2] Activated Partial Thromboplastin Time (aPTT)

آزمایش زمان پروترومبین[1]

اساس آزمایش

معرف PT یا ترومبوپلاستین بافتی یا فاکتور بافتی از طریق تخلیص فاکتور بافتی یا تکنولوژی DNA تهیه می‌شود. اندام هایی چون مغز، ریه و جفت، سرشار از فاکتور بافتی هستند. مخلوط معرف PT با پلاسما، موجب فعال کردن فاکتور ۷ و ایجاد کمپلکس با آن می‌شود. همانگونه که در شکل ۱-۸ مشاهده می‌شود، کمپلکس فاکتور ۷ و فاکتور بافتی، فاکتور ۱۰ را فعال کرده و در نهایت، طی مکانیسم های دیگری، شبکه پلیمری فیبرین یا لخته ایجاد می‌شود. این آزمایش به کاهش فاکتور ۷ بسیار حساس است. به کاهش شدید پروترومبین و فیبرینوژن نیز حساس می‌باشد. از آزمایش PT برای پیگیری درمان ضدانعقاد خوراکی وارفارین استفاده می‌شود.

روش انجام آزمایش

ابتدا معرف PT را به دمای ۳۷ درجه برسانید. λ ۱۰۰ از پلاسمای کنترل یا بیمار را در لوله آزمایش ریخته و حداقل ۳ دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه نمایید. دقت شود که پلاسما نباید بیش از ۱۰ دقیقه در ۳۷ درجه قرار بگیرد. سپس λ ۲۰۰ از معرف PT را با فشار به پلاسما اضافه کرده و کرنومتر را می زنیم. بلافاصله پس از مشاهده لخته ایجاد شده، کرنومتر را متوقف کرده و زمان تشکیل لخته را به عنوان نتیجه آزمایش PT ثبت می‌کنیم. در صورتی که آزمایش بصورت دوبل انجام شود، نتایج بایستی در محدوده ۱۰٪ از یکدیگر قرار بگیرند. در غیر اینصورت، آزمایش برای بار سوم تکرار خواهد شد.

نحوه گزارش

نسبت همسو شده بین المللی یا INR[2] ، گزارش دهی آزمایش PT بر مبنای معرف فاکتور بافتی استاندارد شده با معرف بافتی مرجع WHO می‌باشد. نشانگان حساسیت بین المللی یا ISI[3] ، حساسیت معرف PT به کمبود فاکتورهای وابسته به ویتامین K در مسیر خارجی را نشان می دهد و از ۳-۱ متغیر می‌باشد. هر چه مقدار عددی ISI به یک نزدیک تر باشد، بیانگر حساسیت بالای معرف می‌باشد. هنگامی که معرف فاکتور بافتی ساخته شده توسط یک شرکت، ضریب ISI را از WHO دریافت کند، به مفهوم معادل سازی یا همسو سازی آن با معرف بافتی تولید شده توسط WHO می‌باشد. معرف مرجع WHO شبیه فسفولیپید مغز انسان بوده و با تکنولوژی نوآوری DNA تهیه شده و ISI آن برابر یک می‌باشد.

$$INR = \left(\frac{Patient\ PT}{Control\ PT}\right)^{ISI}$$

معرف های حساس دارای ISI بین ۱/۷-۱ و غیر حساس ۲/۷-۲ می‌باشند. با محاسبه INR ، آزمایش PT به معرف بافتی غیروابسته شده و مانند این است که در هر جای دنیا که از واحد INR استفاده می‌شود، گویی که از معرفی شبیه فاکتور بافتی مرجع، استفاده می‌کنند. به مثال زیر توجه کنید:

آزمایش PT بیماری که وارفارین مصرف می‌کند، در یک آزمایشگاه با معرف بافتی با ISI=2.3 برابر ۲۲ ثانیه با کنترل ۱۳ ثانیه، و آزمایش PT همان نمونه در آزمایشگاه دیگری با معرف بافتی با ISI=1.3 برابر ۳۰ ثانیه با کنترل ۱۲ ثانیه شده است:

$$(1)\ \ \mathrm{INR} = \left(\frac{22}{13}\right)^{2.3} = 3.3$$

$$(2)\ \ \mathrm{INR} = \left(\frac{30}{12}\right)^{1.3} = 3.3$$

[1] Prothrombin Time (PT)
[2] International Normalized Ratio
[3] International Sensitivity Index

با توجه به اینکه ISI آزمایشگاه دوم به عدد یک نزدیک و بسیار حساس است، از این رو آزمایش PT، به سرعت طولانی شده و عدد بالاتری در کمبود فاکتورهای وابسته به ویتامین K نشان می دهد. ولی ISI در آزمایشگاه اول به عدد ۳ نزدیک بوده و بیانگر کاهش حساسیت معرف بوده و زمان آزمایش PT نیز کمتر طولانی شده است. اما همانگونه که ملاحظه می کنید، مقدار ISI ، جواب هر دو آزمایشگاه را همسو کرده و حساسیت بالا یا پایین معرف ها را جبران کرده و هر دو دارای INR یکسان هستند. مقدار طبیعی INR بین ۰/۹ تا ۱/۱ می‌باشد.

توضیحات تکمیلی و نکات مهم آزمایشگاهی

بستن تورنیکه بیشتر از یک دقیقه، موجب رکود جریان وریدی و تراکم فاکتورهای ۸ و فیبرینوژن و فون ویلبراند شده و زمان انعقاد طولانی می‌شود. برعکس، جابجا کردن سوزن در هنگام نمونه‌گیری، سبب ورود فاکتور بافتی به نمونه خون و فعال کردن فاکتورها شده، که این مسأله با کاهش زمان انعقاد همراه است.

برای تهیه نمونه خون جهت تست های انعقادی، مسیرهای آغشته با هپارین (مانند کاتترهای وریدی) و مسیرهای تزریق محلول های وریدی، مناسب نمونه‌گیری نیستند. در موارد اجتناب ناپذیر، باید مسیر وریدی را با ۵ میلی‌لیتر سالین شستشو داده و سپس ۱۰–۵ میلی‌لیتر اول خون را دور ریخته و سپس به جمع آوری نمونه پرداخت.

ضدانعقاد مناسب برای آزمایش‌های انعقادی، سیترات سدیم ۱۰۹ میلی مول در لیتر است. برای این منظور ۳/۱۳ یا ۳/۲ گرم $Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$ با وزن ملکولی ۲۹۴ را در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و درون یخچال نگهداری می‌کنیم. برای آزمایشات PT و PTT ، یک حجم سیترات سدیم را به ۹ حجم خون اضافه می‌کنیم. دقت شود که حداکثر تا یک دقیقه پس از خونگیری، بایستی نمونه با سیترات سدیم، بوسیله سر و ته کردن[1]، مخلوط شود.

در پلی‌سیتمی، میزان هماتوکریت به حدود ۶۰٪ افزایش یافته و در مقابل با کاهش پلاسما مواجه هستیم. بنابراین مقداری سیترات درون لوله اضافه می‌ماند. با افزودن کلرور در تست PTT و یا ترومبوپلاستین در تست PT، کلسیم توسط سیترات اضافه خنثی شده و در نهایت منجر به افزایش کاذب نتایج می‌شود.

برعکس، در آنمی شدید، کاهش هماتوکریت و افزایش پلاسماکریت تا ۷۰–۶۵٪ اتفاق افتاده و بنابراین این مقدار پلاسما، دارای کلسیم مازاد بوده که توسط سیترات بطور کامل خنثی نمی‌شود. این کلسیم اضافه، مسیرهای انعقادی را تا حدودی آغاز کرده و در هنگام افزودن کلسیم، زمان انعقاد از چند ثانیه جلوتر شروع شده و در نهایت با کاهش کاذب نتایج روبرو خواهیم بود.

جهت اصلاح این مسأله، از فرمول زیر برای کاهش یا اصلاح مقدار سیترات، استفاده می‌شود:

حجم سیترات مورد نیاز به ازای هر میلی‌لیتر خون = 0.00185×(100-Hct)×Blood volume

برای مثال، میزان سیترات سدیم اضافه شده به ۲ میلی‌لیتر خون بیماری با هماتوکریت ۶۰٪ برابر است با:

0.00185×(100-60)×2 = 0.14 cc

بنابراین برای تهیه ۲ میلی‌لیتر خون، مقدار ۰/۱۴ میلی‌لیتر سیترات سدیم در لوله ریخته و با خون بیمار، به حجم ۲ میلی‌لیتر می رسانیم.

[1] Inversion

چنانچه با سیستم لوله های خلاء اقدام به خونگیری برای آزمایش‌های گوناگون می کنید، نمونه مربوط به تست های انعقادی بایستی اول گرفته شود، زیرا که آلودگی سوزن نمونه‌گیری با محتویات دیگر لوله ها، مانند EDTA و ژل فعال کننده لخته، در آزمایش‌های انعقادی تداخل ایجاد می‌کند.

شکل ۲–۸: نمونه‌گیری با استفاده از لوله های خلاء

وجود هرگونه لخته، همولیز قابل رویت و نمونه با حجم کمتر از ۹۰٪ مقدار استاندارد، اعتبار آزمایش‌های انعقادی را خدشه دار می‌کند. به عنوان مثال برای ۲ میلی‌لیتر نمونه، تا ۰/۲± میلی‌لیتر تغییر در حجم، قابل قبول است. همولیز به علت فعال کردن پلاکت‌ها و فاکتورهای انعقادی، موجب کاهش زمان انعقاد می‌شود.
آزمایش‌های انعقادی و علی الخصوص آزمایش شناسایی آنتی بادی های ضدفسفولیپید، باید با پلاسمای سیتراته فاقد پلاکت (کمتر از $/mm^3$ ۱۰۰۰) انجام شوند. برای این کار، نمونه را به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۲۵۰۰ سانتریفیوژ می‌کنیم.

فاصله زمانی قابل قبول برای انجام تست های انعقادی، وابسته به درجه حرارت نگهداری نمونه است. آزمایش PT با نگهداری نمونه خون در لوله دربسته در دمای ۲۴–۱۸ درجه (سانتریفیوژ شده یا نشده) تا ۲۴ ساعت پس از خونگیری، بلامانع است. باز بودن درپوش لوله، موجب کاهش خاصیت بافری سیترات سدیم می‌شود. نگهداری پلاسما در ۴–۲ درجه، موجب فعال شدن خودبخودی فاکتور ۷ در سرما شده و زمان PT را ۳–۲ ثانیه کاهش می دهد. توصیه می‌شود در صورتی که امکان انجام آزمایش PT تا ۲۴ ساعت از نگهداری نمونه در حرارت اتاق نباشد، نمونه پلاسما را منجمد کنید.

آزمایش PTT در لوله دربسته در دمای ۴–۲ درجه یا ۲۴–۱۸ درجه، بایستی تا ۴ ساعت پس از نمونه‌گیری انجام شود. نمونه‌های مربوط به بیمارانی که در حال درمان با هپارین هستند، با نگهداری در دمای ۴–۲ درجه یا ۲۴–۱۸ درجه، باید ظرف یک ساعت سانتریفیوژ و پلاسمای آن جدا شود. البته در صورت نگهداری نمونه در دمای ۴–۲ درجه، می‌توان آزمایش PTT را تا ۴ ساعت بعد انجام داد. در صورت افزایش این زمان، فاکتور IV پلاکتی از پلاکت‌ها آزاد شده و موجب خنثی شدن هپارین موجود در نمونه بیمار می‌شود.

در صورتی که انجام آزمایش تا ۲۴ ساعت برای PT و تا ۴ ساعت برای PTT مقدور نباشد، پلاسمای فاقد پلاکت را در لوله های پلاستیکی جدا کرده و می‌توان در دمای ۲۰– درجه برای دو هفته یا در دمای ۷۰– درجه برای ۶ ماه، نگهداری کرد. پلاسمای منجمد را بایستی به سرعت در ۳۷ درجه ذوب کرد. از انجماد مجدد پلاسمای ذوب شده، خودداری کنید، زیرا که رسوب کرایو ایجاد شده، موجب کاهش فاکتورهای انعقادی و افزایش کاذب زمان انعقاد می‌شود.

نکته: آزمایش PT و PTT در افزایش شدید فاکتورهای انعقادی، ممکن است کمتر از زمان پلاسمای کنترل باشد.

تهیه کنترل

برای تهیه کنترل می‌توان حداقل از ۶ نفر زن و مرد با ظاهر طبیعی و سالم، که مبتلا به بیماری های عفونی و التهابی نیستند، نمونه‌گیری انجام می‌شود، سپس پلاسماها را جدا کرده و به صورت مخلوط[1] در می آورند. در تهیه کنترل، از پلاسمای زنان باردار، به علت افزایش فیبرینوژن و دیگر فاکتورهای انعقادی، استفاده نمی‌شود.

پلاسمای مخلوط شده را در ویال ها تقسیم کرده و در فریزر نگهداری می‌کنیم. در صورت نگهداری در دمای ۲۰- درجه، تا دو هفته و در ۷۰- درجه تا ۶ ماه قابل استفاده است. سطح فاکتورهای انعقادی در افراد سالم جامعه، بین ۱۵۰-۵۰٪ در نوسان است و میزان هر فاکتور انعقادی در پلاسمای مخلوط، برابر ۱۰۰٪ در نظر گرفته می‌شود.

اندازه‌گیری فیبرینوژن[2]

فیبرینوژن سرشارترین فاکتور انعقادی در پلاسما با غلظت mg% ۴۰۰-۱۵۰ است. کاهش اکتسابی فیبرینوژن در DIC، فیبرینولیز اولیه، سیروز کبدی و نارسایی برق آسای کبدی، شایع است. داروی L-Asparginase که در درمان بدخیمی های هماتولوژیک استفاده می‌شود، ممکن است موجب کاهش شدید فیبرینوژن به کمتر از mg% ۲۰ گردد. خون‌ریزی از بند ناف، خون‌ریزی های مخاطی و مغزی از عوارض کمبود شدید فیبرینوژن است. شانس سقط خودبخودی در کمبود فیبرینوژن، بسیار بالاست. در کاهش شدید فیبرینوژن، آزمایش‌های زمان سیلان و تست تجمع پلاکتی، غیرطبیعی می‌شوند.

آزمایش Clauss که بر پایه زمان ترومبین، مقدار فیبرینوژن را اندازه‌گیری می‌کند، متداول‌ترین روش آزمایشگاهی برای اندازه‌گیری فیبرینوژن است.

اساس آزمایش

اغلب روش‌های اندازه‌گیری بر اساس تبدیل فیبرینوژن به فیبرین در حضور مقادیر زیاد ترومبین استوار هستند. اندازه‌گیری وزن لخته بر اساس روش‌های وزن سنجی[3] (اندازه‌گیری وزن لخته تشکیل شده) بدلیل وجود مهارکننده‌ها که باعث تشکیل نشدن و یا تشکیل ناقص لخته می‌شوند، می‌تواند خطای زیادی داشته باشد. پلاسمین نیز می‌تواند باعث لیز لخته قبل از کامل شدن اندازه‌گیری شود.

روش‌های کدورت سنجی بر اساس رسوب دهی فیبرینوژن با مواد رسوب دهنده نیز بدلیل نداشتن ویژگی و تداخل بسیار زیاد با سایر مواد، منسوخ شده اند.

[1] Pooled
[2] Fibrinogen assay
[3] Gravimeteric

گزارش های CDC[1] و CAP[2] روش Clauss را به عنوان روش انتخابی در تعیین میزان فیبرینوژن معرفی کرده است. این روش میزان تبدیل فیبرینوژن به فیبرین را در حضور مقادیر زیاد ترومبین، اندازه‌گیری می‌کند و روشی سریع و حساس به شمار می آید.

روش انجام آزمایش

نیم ساعت قبل از انجام آزمایش، تمامی معرف‌ها را از یخچال خارج کرده تا دمای آنها به دمای آزمایشگاه برسد. مقدار ۰/۱ mL از پلاسمای بیمار را برداشته و با ۰/۹ mL از بافر رقیق کننده مخلوط می‌کنیم. بافر رقیق کننده در اینجا، بافر Owren`s veronal با pH=7.35 می‌باشد. از رقت بدست آمده، ۰/۲ mL برداشت کرده و در یک لوله شیشه‌ای دیگر درون بن ماری ۳۷ درجه قرار می‌دهیم. پس از گذشت دو دقیقه از انکوباسیون، ۰/۱ mL از ترومبین گاوی با غلظت ۱۰۰ واحد NIH[3] را به آن اضافه کرده و همزمان کرنومتر را روشن می‌کنیم. همانند آزمایش PT و PTT، به محض دیدن اولین علائم تشکیل لخته و یا رشته‌های نازک فیبرین، کرنومتر را متوقف کرده و زمان آن را یادداشت می‌کنیم. توجه داشته باشید که رشته های فیبرین ایجاد شده بسیار نازک بوده و در زمان کوتاهی تشکیل می‌شوند. مقدار واقعی فیبرینوژن را می‌توان از روی جدول ضمیمه کیت (شبیه جدول ۲-۸) و برحسب زمان تشکیل لخته، بدست آورد. مقدار طبیعی فیبرینوژن ۱۵۰-۳۵۰ mg/dL می‌باشد.

جدول ۲-۸: مقدار واقعی فیبرینوژن بر اساس زمان انعقاد

زمان انعقاد	مقدار خام فیبرینوژن (mg/dL)	مقدار واقعی فیبرینوژن (mg/dL)
5.0	403	484
5.5	367	440
6.0	336	403
6.5	310	372
7.0	288	346
7.5	269	323
8.0	252	303
8.5	237	285
9.0	224	269
9.5	212	255
10.0	202	242

نکات مهم

- تشخیص رشته‌های نازک و سفیدرنگ فیبرین در یک زمینه سیاه و با نور غیرمستقیم به راحتی امکان‌پذیر است.
- پس از رقیق کردن پلاسما با بافر، حداقل ظرف مدت ۲۰ دقیقه بایستی آزمایش انجام شود.
- انکوباسیون پلاسمای رقیق شده در ۳۷ درجه نباید بیش از ۴ دقیقه طول بکشد.
- گاهی مقدار فیبرینوژن در پلاسما بسیار کم بوده و در نتیجه زمان تشکیل رشته‌های فیبرین طولانی شده و یا تشخیص آن‌ها مشکل می‌شود. در این گونه موارد، پلاسمای بیمار را به نسبت ۱:۵ با بافر رقیق کرده و در نهایت مقدار واقعی فیبرینوژن خوانده شده از روی جدول، تقسیم بر ۲ می‌شود.
- گاهی نیز مقدار فیبرینوژن پلاسما بسیار زیاد بوده و بنابراین زمان لازم برای تشکیل لخته بسیار کوتاه می‌شود. در این‌صورت، رقت‌های بالاتری از پلاسما را تهیه کرده و در نهایت متناسب با رقت تهیه شده، مقدار واقعی فیبرینوژن

[1] Center for Disease Control
[2] College of American Pathologists
[3] National Institutes of Health

خوانده شده از روی جدول را در یک ضریبی، ضرب می‌کنیم. برای مثال در صورت تهیه رقت ۱:۲۰، ضریب عدد ۲ و در صورت تهیه رقت ۱:۳۰، ضریب عدد ۳ خواهد بود.

- اعداد ارائه شده در ستون سوم جدول ۲-۸ زمانی صحیح هستند که هماتوکریت بیمار در محدوده نرمال ۵۰-۴۰ باشد. اگر هماتوکریت بیمار بسیار بالا و یا پایین باشد، لازم است مقدار فیبرینوژن تصحیح شود. برای این کار، ابتدا مقدار خام فیبرینوژن (ستون دوم جدول) را براساس زمان انعقاد بدست آورید. سپس با استفاده از فرمول زیر:

$$\mathbf{T = 1 + \frac{11}{100 - Hct}}$$

ضریب T را با استفاده از هماتوکریت بیمار بدست آورده و در مقدار خام فیبرینوژن ضرب می‌کنیم. عدد بدست آمده، مقدار واقعی فیبرینوژن برای این بیمار خواهد بود.

توضیحات تکمیلی

هپارین درمانی یا آلوده شدن نمونه خون به هپارین، موجب طولانی شدن زمان ترومبین و کاهش کاذب مقدار فیبرینوژن می گردد. در این موارد، از زمان رپتیلاز برای اندازه‌گیری فیبرینوژن استفاده می‌شود. رپتیلاز تحت تأثیر هپارین قرار نمی گیرد و با فیبرینوژن نسبت عکس دارد.

در DIC غلظت اجزاء پپتیدی فیبرین و فیبرینوژن، یعنی FDP و دایمرD، افزایش می یابند و بنابراین با افزایش زمان انعقاد، موجب کاهش کاذب فیبرینوژن می گردند.

فیبرینوژن، فاکتور ۸ و فاکتور فون ویلبراند، جزء پروتئین های فاز حاد بوده و بنابراین در بیماری های التهابی افزایش می یابند. در حاملگی نیز فیبرینوژن افزایش می یابد.

تزریق خون Massive با کاهش فاکتورهای انعقادی، بویژه فیبرینوژن، ممکن است سبب خونریزی شود. برای ثبات انعقادی، سطح فیبرینوژن بایستی حداقل ۱۰۰ mg% باشد. تزریق هر کیسه کرایو به ازای هر ۱۰ کیلوگرم، ۵۰ mg% فیبرینوژن را افزایش می دهد.

در مواردی که سطح فیبرینوژن در پلاسما از حداقل نرمال پایین‌تر رفته باشد، می‌توان یکی از حالت‌های زیر را در نظر گرفت:

فیبرینولیز، آمبولی حاد ریه، بیماری‌ها و عفونت‌های کبدی، کوآگولوپاتی مصرفی حاد، اختلالات مادرزادی فیبرینوژن، مارگزیدگی، سقط جنین، DIC واکنش‌های انتقال خون، آنمی همولیتیک ، سوختگی‌های شدید ، آکلامپسی، ماکروگلوبولینمیا، تروما، مسمومیت با فنوباربیتال، مولتیپل میلوما، سپتی سمی، TTP، کرایوگلوبولینمیا، کارسینوم پروستات و ریه.

افزایش فیبرینوژن نیز در این حالات دیده می‌شود:

بارداری، دیابت ملیتوس، حالاتی که نکروز وسیع بافتی رخ داده مثل : بدخیمی‌ها و درمان وسیع با مواد کموتراپیک، التهابات شدید، بیماری‌های کلیوی، ترومبوفلبیت، آرتریواسکلروزیس، هپاتیت، عفونت‌های حاد و قاعدگی

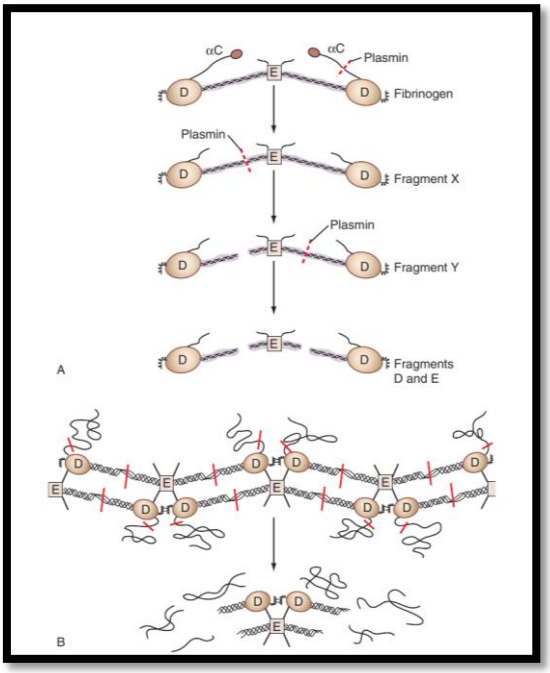
اندازه‌گیری FDP[1] و دایمرD

برای ارزیابی فیبرینولیز، می‌توان قطعات حاصل از تجزیه فیبرین یا فیبرینوژن (FDP) پلاسما را اندازه‌گیری کرد. زمانی که مواد فعال کننده انعقاد وارد جریان خون شده و موجب انعقاد و در نهایت فیبرینولیز شوند، FDPها ایجاد می‌شوند. بطور طبیعی، کمتر از FDP ۵ µg/mL در پلاسما وجود دارد. در موارد پاتولوژیک مانند DIC، بیماری های کبدی، کلیوی و قلبی، آمبولی ریوی،

[1] Fibrin Degraded Product

سکته قلبی و عوارض پس از عمل، کبد توانایی حذف FDPها از جریان خون را نداشته و بنابراین میزان آنها بطور قابل توجهی افزایش می یابد. FDPها عبارتند از: قطعات X، Y، D و E که در اصل قطعات جدا شده مولکول فیبرینوژن هستند. دایمرD جزء FDPها بوده و از محصولات تجزیه فیبرین می‌باشد ولی برخلاف آنها دارای اتصالات کووالانسی عرضی، ناشی از تأثیر فاکتور XIII می‌باشد.

دایمرD یک تست اختصاصی برای ارزیابی و تشخیص فیبرینولیز حاصل از اثر پلاسمین بر فیبرین (نه فیبرینوژن) می‌باشد. وجود دایمرD در خون، نشاندهنده تخریب پیوندهای عرضی توسط پلاسمین بوده و مارکر مهمی جهت تشخیص DIC همراه با فیبرینولیز می‌باشد. در آمبولی ریوی، ترومبوز وریدهای عمقی و بیماری داسی شکل نیز دایمرD در خون دیده می‌شود.



شکل: تجزیه فیبرین و فیبرینوژن و ایجاد FDPها و دایمرD توسط عمل آنزیمی پلاسمین.

متداولترین روش تشخیص FDP، استفاده از تست آگلوتیناسیون لاتکس می‌باشد. از الایزا و نفلومتری نیز برای محاسبه کمّی مقادیر FDP استفاده می‌شود. برای انجام آزمایش، نمونه خون را درون لوله های حاوی ترومبین (یا رپتیلاز) و مهارکننده تریپسین، جمع آوری می‌کنند. ترومبین یا رپتیلاز، باعث انعقاد سریع خون می‌شود و مهار کننده تریپسین از ایجاد فیبرینولیز در محیط آزمایشگاه، جلوگیری می‌کند. ذرات لاتکس پوشیده شده با آنتی بادی پلی کلونال برعلیه قطعات D و E، که با بافر گلیسین آغشته شده اند، با سرم بیمار مجاور شده و خوب مخلوط می‌شود. مشاهده آگلوتیناسیون به معنای مثبت بودن آزمایش و وجود قطعات D و E در سرم بیمار است. می‌توان با تهیه رقت های مختلف، این آزمایش کیفی را بصورت نیمه کمّی نیز انجام داد.

با انجام این تست، FDP حاصل از فیبرین را نمی‌توان از FDP حاصل از فیبرینوژن، تشخیص داد. در صورت لزوم، آزمایش دایمرD بر روی نمونه انجام می‌شود. لازم به ذکر است که وجود فیبرینوژن در نمونه موجب مثبت کاذب می‌شود.

برای انجام آزمایش D-dimer، پلاسمای سیتراته بیمار را با ذرات میکرولاتکس پوشیده شده با آنتی بادی منوکلونال برعلیه دایمرD، مخلوط کرده و ایجاد اگلوتیناسیون را بررسی می‌کنیم. دقت شود که حداکثر زمان برای انجام آزمایش در حرارت اتاق، تا ۴ ساعت و در دمای ۸-۲ درجه، تا ۸ ساعت می‌باشد.

Louis Pasteur (1822-1895)

در هر حرفه‌ای که هستید، نه اجازه دهید که به بدبینی‌های بی‌حاصل آزرده شوید، و نه بگذارید بعضی لحظات تأسف‌بار که برای هر ملتی پیش می‌آید شما را به یأس و ناامیدی بکشاند. در آرامش حاکم بر آزمایشگاهها و کتابخانه‌هایتان زندگی کنید، نخست از خود بپرسید: برای یادگیری و خود آموزی چه کرده‌ام؟ سپس همچنانکه پیشتر می‌روید بپرسید : من برای کشورم چه کرده‌ام؟ و این پرسش را آنقدر ادامه دهید تا به این احساس شادی‌بخش و هیجان‌انگیز برسید که شاید سهم کوچکی در پیشرفت و اعتلای بشریت داشته باشید.

اما هر پاداشی که زندگی به تلاش‌هایمان بدهد یا ندهد، هنگامی که به پایان تلاش‌هایمان نزدیک می‌شویم، هر کداممان باید حق آنرا داشته باشیم که با صدای بلند بگوئیم:

«من آنچه را که در توان داشته‌ام، انجام داده‌ام »

منابع

۱- گل فشان، حبیب اله: ***روش‌های استاندارد در آزمایشـــــــگاه خون‌شناسی***، انتشارات دانشگاه علوم‌پزشکی شیراز، ۱۳۹۲

۲- گل فشان، حبیب اله: ***مهارت های آزمایشگاهی در خون‌شناسی***، انتشارات دانشگاه علوم پزشکی شیراز، ۱۳۹۰

۳- ملکی، علی: ***اصول کار و منابع خطا در آنالیزورهای هماتولوژی (سل‌کانترها)***، انتشـارات اندیشه رفیع، ۱۳۸۴

۴- مهرابی، محمدرضا و همکاران: ***خون‌شناسی***، انتشارات دانشگاه آزاد اراک، ۱۳۸۷

۵- بشاش، داود: ***هماتولوژی و انعقاد خون هنری دیویدسون ۲۰۱۱***، انتشارات کتابخانه فرهنگ، ۱۳۹۲

۶- وظیفه شیران، نادر: ***هماتولوژی سلولی و مولکولی***، انتشارات گروه تألیفی دکتر خلیلی، ۱۳۹۳

۷- مهبد، سیدعلی: ***اصول، کاربرد و تفسیر آزمایش‌ها در هماتولوژی عملی***، نشر اشراقیه، ۱۳۸۵

۸- ملکی، علی و همکاران: ***کنترل کیفی در آزمایشگاه هماتولوژی***، انتشارات اندیشه رفیع، ۱۳۸۸

۹- داهیم، پریسا: ***دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی***، نشر صدرا به سفارش آزمایشگاه مرجع سلامت، ۱۳۸۸

۱۰- ساکی، نجم الدین: ***اطلس خون‌شناسی***، انتشارات خسروی، ۱۳۹۲

۱۱- دارآفرین، حسین: ***مدیریت و کنترل کیفی تجهیزات در آزمایشگاه پزشکی***، انتشارات پیام رسان، ۱۳۹۲

- SM Lewis, BJ Bain, et all: ***Dacie and Lewis Practical Haematology***, Churchill Livingstone publisher, 10th edition (2006)

- Richard Mc Pherson, et all: ***Clinical Diagnosis and management by laboratory methods***, Saunders publisher, 21th edition (2007)