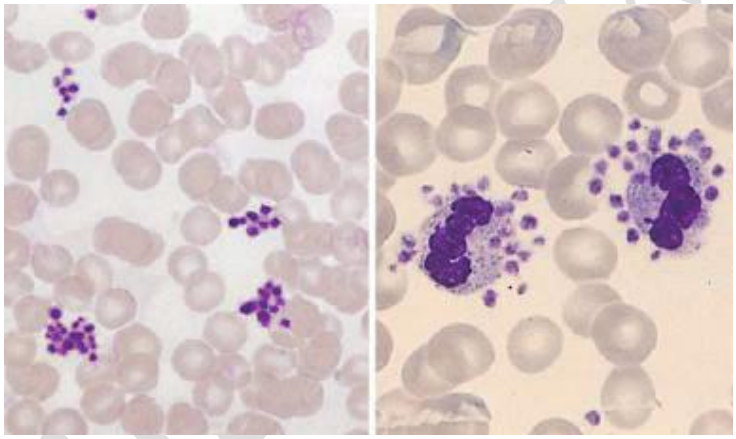
مطالعه استاندارد گستره محیطی و شمارش افتراقی

دکتر حبیبا... گل افشان

نمونه مربوط به آزمایش CBC یا هموگرام در لوله‌های با سرپوش ارغوانی (Lavender) حاوی K2EDTA یا Na2EDTA و یا K3EDTA به آزمایشگاه ارسال می‌شود. تهیه اسلاید در 2 تا 3 ساعت پس از نمونه‌گیری کیفیت خوبی را ارائه می‌دهد و معمولاً اسلاید تهیه شده از نمونه مانده در حرارت اتاق برای بیش از 5 ساعت دارای تغییرات ناشی از مانده شدن خون مانند مرفولوژی اکینوسیت، اسفروسیت و لکوسیت‌های نکروبیوتیک و نوتروفیل‌های واکوئله است.

واکوئله شدن منوسیت‌ها در خون EDTA دار به سرعت رخ می‌دهد، از این رو ارزش تشخیصی شبیه به واکوئله شدن نوتروفیل‌ها ندارد.

توجه داشته باشید که در ضد انعقاد EDTA پدیده اقماری پلاکت‌ها (satellitosis Platelet) و تجمع پلاکتی ناشی از EDTA موجب کاهش کاذب شمارش پلاکتی شده و در ضمن هر توده پلاکتی در دستگاه‌های شمارشگر به عنوان گلبول سفید شمارش شده و لکوسیتوز کاذب می‌دهد.



پدیده اقماری پلاکت‌ها (satellitosis Platelet) و تجمع پلاکتی ناشی از EDTA

تهیه مجدد نمونه خون در این موارد در لوله‌های حاوی سیترات سدیم، شمارش بهتری از پلاکت می‌دهد. شمارش پلاکت و گلبول‌های سفید بیمار را بایستی در عدد 1/1 به علت رقیق شدن در سیترات ضرب کرد. گفتنی است که پارامترهای دیگر CBC بایستی از روی CBC اولیه با نمونه EDTA دار برای بیمار گزارش شود.

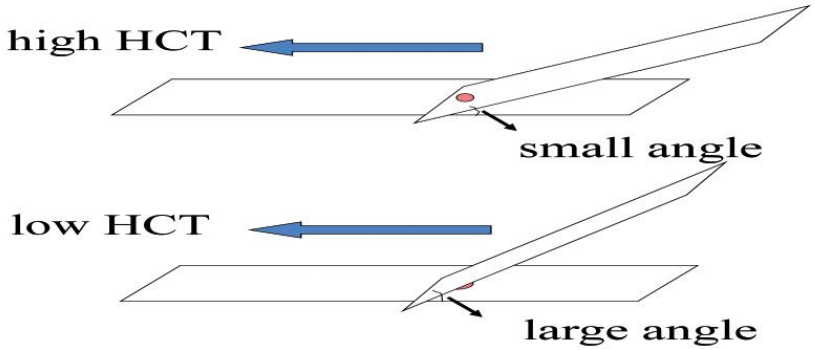
تهیه گستره محیطی: (technic wedge Manual)

تهیه گستره محیطی به روش دو اسلایدی (technic wedge Manual) که یک اسلاید به عنوان پخش کننده به کار می رود بسیار متداول است. اسلاید پخش کننده باید دارای لبه های بسیار صاف و عرض آن کمتر از اسلاید گستره باشد به نحوی که حاشیه گستره محیطی هم قابل مطالعه باشد.

برای تهیه گستره به این روش یک قطره 2-3 میلی‌متری از نمونه خون که به خوبی مخلوط شده باشد را در انتهای یک سانتی‌متری از اسلاید تمیز و بدون گرد و خاک قرار داده و سپس لام پخش کننده را در جلوی قطره خون قرار داده و به آرامی به عقب می‌کشیم تا با

medicalvs.ir

قطره خون تماس پیدا کند و اجازه می‌دهیم تا خون در فاصله بین دو اسلاید پخش شود، پس از آن با یک سرعت ثابت لام پخش کننده را به سمت انتهای دیگر لام حرکت می‌دهیم تا خون به خوبی پخش شود. زاویه پخش کننده باید 30-45 درجه باشد، البته برای افراد مبتلا به پلی‌سایتمی می‌توان زاویه 25 درجه را انتخاب کرد و در افراد کم‌خون زاویه را افزایش داد.



خصوصیات یک گستره محیطی خوب

1- گستره خونی بایستی دو سوم تا سه چهارم طول اسلاید را بپوشاند.
2- حاشیه‌ها قابل مطالعه باشند.
3- گستره نازک، یکنواخت، بدون نامنظمی، بدون حفره هوا و بدون خش (Streak) باشد.
4- وقتی اسلاید در مقابل نور گرفته می‌شود قسمت نازک اسلاید حالت رنگین کمان (Rainbow) داشته باشد.
5- از تمام 2-3 میلی‌متر خون استفاده شده باشد.
6- گستره به تدریج از قسمت ضخیم به قسمت نازک برسد.

نکات مهم در تهیه گستره محیطی

زمان ایده‌آل براي تهیه گستره محیطي و مطالعه مرفولوژي گلبول‌هاي سفید و قرمز حداکثر تا سه ساعت پس از نمونه‌گیري است، در حالي که سنجش پارامترها و شمارش سلول هاي خوني بشرطي که نسبت صحیح ضد انعقاد به خون رعایت شده باشد تا 24 ساعت در یخچال 4 درجه داراي اعتبار است.

نمک $EDTA_2K$ ضد انعقاد سفارش شده از سوي کمیته استاندارد سازي در هماتولوژي به مقدار 5/1 ±25/0 میلي‌گرم به ازاي هر سي‌سي خون است.

گستره شعله شمعي حاشیه‌هاي اسلاید را قابل مطالعه میکروسکوپي مي‌کند و با توجه به اینکه سلول‌هاي بزرگ و غیرطبیعي غالباً در حاشیه‌هاي اسلاید قرار مي‌گیرند از این‌رو سفارش به تهیه این نوع گستره گردیده و براي تهیه گستره‌ای که حاشیه آن قابل مطالعه باشد، کافي است که لبه پخش کننده (spreader) را با قلم الماس قطع کنید.

توجه داشته باشید که گستره بسیار نازک موجب پخش بسیار نامنظم گلبول‌هاي سفید مي گردد، بنابراین ضخامت گستره بایستي در حد متوسط باشد.

در هنگام تهیه گستره امکان دارد سلول‌هاي لوسمي یا غیرطبیعي از نمونه خون توسط پخش کننده که خوب تمیز نشده باشد به اسلاید بیمار دیگر منتقل شود. از این‌رو تعویض پخش کننده بعد از تهیه گستره نمونه غیرطبیعي و یا تمیز کردن آن با گاز مرطوب و خشک کردن کامل آن براي هر بار استفاده سفارش مي‌شود.

medlabnew

براي ارزيابي گستره محيطي در بيماراني كه غلظت خون دارند و تهيه گستره مشكل است مي‌توان يک قطره خون را با يک قطره آلبومين 5% يا پلاسماي گروه AB مخلوط و سپس اسلايد را تهيه و رنگ‌آميزي كرد.

براي جلوگيري از اسماج شدن سلول‌ها نيز مي‌توان يكي دو قطره از آلبومين بانک خون به نمونه خون اضافه و سپس گستره را تهيه كرد. اضافه كردن آلبومين 5% يا پلاسماي گروه AB به رسوب CSF نيز براي رنگ‌آميزي بهتر سلول‌ها سفارش مي‌شود.

رنگ‌آميزی گستره

برای رنگ‌آميزی از رنگ‌های رومانوفسکی مانند رايت و گيمسا استفاده می‌شود. اين رنگ ها از دو بخش قليايی و اسيدی تشكيل شده است. جزء بازی رنگ تيازين است كه مخلوطی از متيلن بلو (ترا متيل تيونين) و نسبت‌های مختلفی از مشتقات دمتيله شده اكسيداتيو آن است كه به نام رنگ‌های آژور خوانده می‌شود. آژور B (تری متيل تيونين)، آژور A (دی متيل تيونين)، آژور C (منو متيل تيونين) می‌باشد.

برای مثال رنگ رايت دارای 50 تا 75 درصد متيلن بلو و 10 تا 25 درصد آژور B و بقيه آن شامل ساير مشتقات رنگ می‌باشد.

جزء اسيدی رنگ، ائوزين است كه مشتقی از اسكلت زانتين (Xanthene) است.

رنگ‌های رايت، گيمسا، جنر، مک نيل، ليشمن و می‌گرانوالد در خانواده رنگ‌های رومانوفسکی قرار دارند و هر كدام دارای مزيت خاص خود می‌باشند. برای مثال رنگ رايت برای آشكارسازی ساختارهای سلول، يک رنگ ايده‌آل و رنگ گيمسا برای رنگ‌آميزی انگل مالاريا ايده‌آل است.

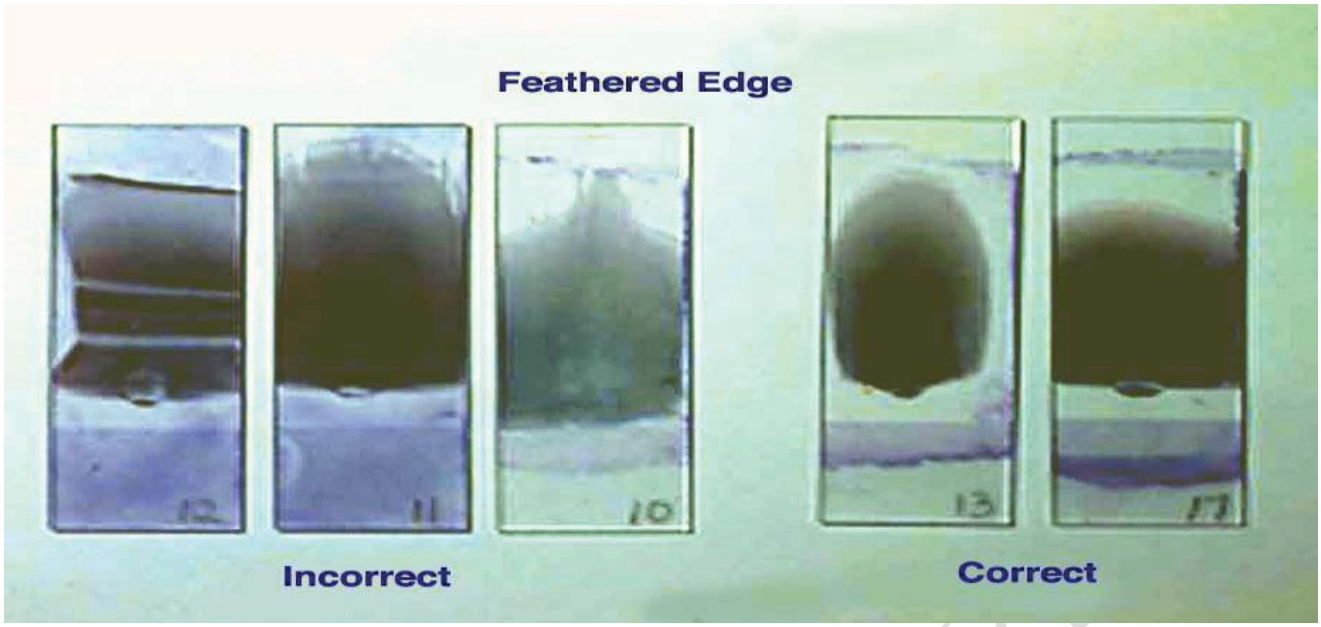
گستره قبل از رنگ‌آميزی بايستی خشک شود. از دميدن بر روی اسلايد به علت ايجاد رطوبت و توليد آرتيفكت آب خودداری كنيد.

پس از خشک شدن، گستره را در عرض يک ساعت پس از تهيه با استفاده از يک رنگ رومانوفسکی حاوی فيكساتيو (رنگ رايت) رنگ‌آميزی می‌كنيم و يا اينكه گستره را در عرض يک ساعت بوسيله متانول بدون آب، فيكس كرده و برای رنگ‌آميزی توسط رنگ‌های فاقد فيكساتيو (مانند رنگ گيمسا) آماده می‌كنيم.

در رنگ‌آميزی با رنگ رايت، متانول موجود در رنگ رايت به عنوان فيكساتيو به كار می رود و رنگ‌آميزی واقعی اسلايد از زمانی صورت می‌گيرد كه بافر به رنگ اضافه می‌شود. بافری كه به اسلايد اضافه می‌شود دارای PH = 6.4 است. از آب مقطر مانده شده در ظروف شيشه‌ای (حداقل 24 ساعت مانده باشد با پ هاش 4/6 تا 8/6) نيز می‌توان به عنوان بافر استفاده كرد، در غير اين صورت برای تهيه بافر 63/6 گرم از پودر بدون آب KH2PO4 و 56/2 گرم Na2HPO4 بدون آب را در يک ليتر آب حل می‌كنيم و پ هاش را روی 4/6 تنظيم می كنيم و از آن به عنوان بافر رنگ‌آميزی با رنگ رايت استفاده می‌كنيم. رنگ‌آميزی بسيار وابسته به پ هاش است.

در رنگ‌آميزی ابتدا اسلايد به مدت 1-3 دقيقه با رنگ رايت پوشانده می‌شود و سپس هم حجم رنگ به آن بافر اضافه كرده و با دميدن، رنگ و بافر را مخلوط كرده تا جلای فلزی در سطح گستره ظاهر گردد و سپس مخلوط رنگ و بافر را برای مدت 3 دقيقه ديگر نگاه داشته و پس از آن اسلايد را با آب شستشو داده و پس از خشک شدن مورد مطالعه قرار می دهيم.

medlabnews.ir



خصوصیات یک اسلاید با رنگ‌آمیزی خوب

1- با چشم غیرمسلح رنگ صورتی متمایل به بنفش کم‌رنگ دارد.

2- گلبول‌های قرمز صورتی رنگ هستند و نه به رنگ قرمز یا لیمویی

3- هسته گلبول‌های سفید بنفش (ارغوانی) و سیتوپلاسم نوتروفیل دارای گرانول‌های خرمایی (Tan) است.

4- گرانول‌های ائوزینوفیل قرمز نارنجی و گرانول‌های بازوفیل بنفش تیره است.

نکات مهم در رنگ‌آمیزی گستره محیطی

بهترین رنگ‌آمیزی مربوط به نمونه‌های جدید است. اسلایدهایی که بیشتر از یک هفته مانده‌اند، آبی رنگ می‌گیرند.

قرار گرفتن اسلاید در برابر تابش نور خورشید موجب پژمردگی رنگ می‌شود.

رنگ‌آمیزی گلبول‌های قرمز به صورت آبی تا سبز رنگ نشانه افزایش زمان رنگ‌آمیزی یا قلیایی بودن بافر است. در این حالت گرانول‌های نوتروفیل نیز برجسته و تیره شبیه به گرانول‌های توکسیک می‌شود و گرانول‌های ائوزینوفیل آبی یا خاکستری می‌گردند.

کوتاه بودن زمان رنگ‌آمیزی یا اسیدی بودن محیط رنگ‌آمیزی یا اسیدی بودن بافر رنگ آمیزی یا اسیدی شدن رنگ به علت تبدیل متانول به اسید فرمیک موجب کاهش کیفیت رنگ آمیزی می‌گردد. گلبول‌های قرمز در این حالت قرمز روشن یا نارنجی بوده و هسته گرانولوسیت‌ها آبی کم‌رنگ است، گرانول‌های ائوزینوفیل قرمز درخشان است.

چنانچه اسلاید قبل از خشک شدن با لامل پوشانده شود نیز ایجاد آرتیفکت صورتی در رنگ آمیزی می‌کند.

رنگ‌آمیزی فوری اسلاید موجب جدا شدن قسمت ضخیم گستره از اسلاید می‌شود.

براي نگه‌داري گستره محيطي رنگ نشده بايستي آن را با متانول فيكس نمود. در غير اين صورت پروتئين‌هاي خشک شده در اسلايد کهنه موجب ايجاد زمينه آبي رنگ در رنگ‌آميزي شده و ارزيابي گستره را دشوار مي‌کند.

براي پاک کردن رسوب رنگ از سطح گستره مي‌توان آنرا براي چند ثانيه در متانول قرار داد و سپس ارزيابي کرد، چنانچه رسوب مانع از ارزيابي گستره شود، گستره جديد تهيه کرده و يا با متانول رنگ آن را کاملاً پاک کرده و دوباره رنگ‌آميزي کنيد.

medlabnews

اسلايدهاي رنگآميزي شده با رنگ رايت را ميتوان رنگزدايي كرد و براي يک رنگ ديگر مانند رنگآميزي آهن در موارد ضروري استفاده كرد.

آرتيفكتهای ناشی از آب و خشک كردن

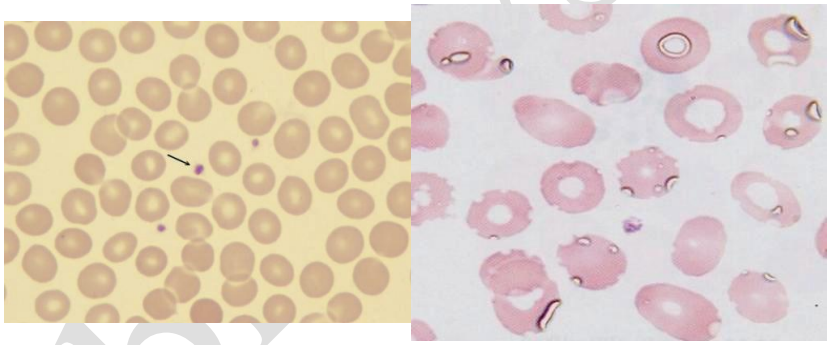
1-گلبولهای قرمز با كناره های خورده شده (شبيه خوردن موريانه)

2- حضور هاله مركزی واضح به علامت قرار گرفتن واكوئل در وسط گلبول قرمز به علت آرتيفكت آب

3- ايجاد مرفولوژی اكينوسيت در ناحيه ای از گستره كه ديرتر خشک شده باشد.

4- هوای مرطوب ممكن است به گلبولهای قرمز مرفولوژی اكينوسيت دهد.

براي جلوگيري از رخ دادن آرتيفكت آب (artifact water) بايستي از رنگآميزي در هواي مرطوب و نمناک آزمايشگاه خودداري كرد. گفتني است كه آلوده شدن الكل فيكساتيو يا رنگ به آب موجب ظاهر شدن واكوئل در گلبولهاي قرمز شده و چنانچه واكوئلها در هاله مركزي قرار گيرند گزارش كاذب هيپوكروم داده ميشود. اين مرفولوژي كاذب ناشی از آرتيكفت آب را توروسيت (torocyte) گويند.

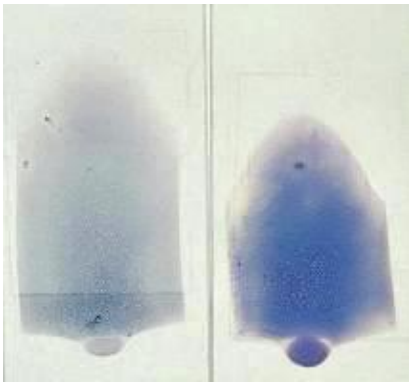


رنگآميزی در هوای مرطوب يا آلوده شدن رنگ با آّب موجب ظهور واكوئل در سطح گلبول قرمز می‌شود.

اطلاعات مهم از شيوه رنگآميزي شدن اسلايد

مشاهده گستره محيطي با زمينه آبي رنگ كه با چشم غيرمسلح قابل مشاهده است ممكن است ناشي از مواد زير باشد:

افزايش پروتئينهاي فاز حاد در بيماريهاي التهابي و افزايش پاراپروتئينها (پروتئينهاي مونوكلونال)، به علت تمايل به رنگهاي متيلنبلو و آژور كه از اجزاي رنگ هاي رومانوفسكي هستند ايجاد زمينه آبی رنگ ميكند.



گستره آبی رنگ با رنگهای رومانوفسكی

medlabrs.ir

بنابراين زمينه آبي گستره ممكن است در موارد زير ديده شود:

1- كم‌خوني بيماري‌هاي مزمن به علت افزايش پروتئين‌هاي فاز حاد

2- سيروز كبدي ناشي از افزايش گاماگلوبولين

3- بيماري‌هاي آتوايمون ناشي از افزايش پلي‌كلونال گاماگلوبولين

4- مايلوم مالتيپل ناشي از انبوه ايمونوگلوبولين‌ها

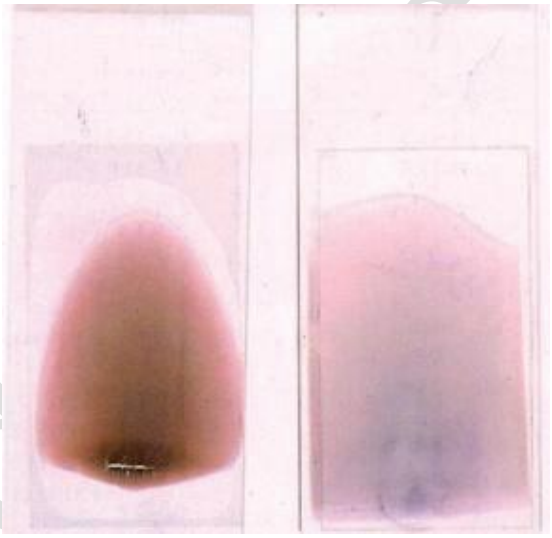
5- حضور كرايوگلوبولين، ناشي از بيماري‌هاي التهابي يا هپاتيت يا اختلالات پلاسما سل

تهيه نمونه خون در ضد انعقاد هپارين و نيز قليايي بودن بافر رنگ‌آميزي ايجاد زمينه آبي مي‌كند.

قليايي بودن بافر به گلبول‌هاي قرمز و گرانول‌هاي ائوزينوفيل نماي آبي رنگ داده و گرانول‌هاي نوتروفيل را شبيه گرانول‌هاي توكسيک مي‌كند.

درگستره قرمز رنگ، ارزيابي مرفولوژي و شناخت سلول‌ها بسيار دشوار مي‌شود. از مهم ترين علت قرمز شدن گستره افزايش نسبت ضد انعقاد به خون است. رنگ‌آميزي در مجاورت بخار اسيد و آلوده شدن وسايل رنگ‌آميزي به اسيد نيز موجب رنگ قرمز گستره مي‌شود.

استفاده از متانول مانده و اكسيد شده به علت تبديل به اسيد فرميک، يكي ديگر از علت‌هاي گستره قرمز رنگ است.



گستره قرمز رنگ

گستره محيطي بايستي يكنواخت و فاقد هر گونه اجسام ذره‌اي (particles) در سطح آن باشد.

وجود اجسام ذره‌اي در سطح گستره ممكن است ناشي از موارد زير باشد:

1- كريستال‌هاي نامحلول ضد انعقاد در خون

2- آگلوتيناسيون سرد با ايجاد دستجات گلبول‌هاي قرمز

3-رسوب كرايوگلوبولين

4- توده‌هاي بهم چسبيده گلبول‌هاي سفيد، براي مثال در لوسمي‌ها

5- رشته‌هاي فيبرين

6- توده‌هاي كروماتين آزاد هسته كه با خاصيت چسبندگي، سلول‌ها را به يكديگر مي چسبانند.

med-news.ir

7- نشستن ذرات گرد و خاک روی اسلاید

8-سلول‌هاي بهم چسبيده تومور از بافت خوني يا بافت‌هاي ديگر

9- تجمع سلول‌هاي پوششي جدار عروق يا آلوده شدن خون به سلول‌هاي پوششي پوست در هنگام تهيه نمونه

01- تجمعات پلاكتي به علت ذرات ريز لخته يا پديده تجمع پلاكتي در حضور نمک‌هاي EDTA

گستره محیطی با اجسام ذره‌ای در سطح آن

ارزیابی گستره محیطی

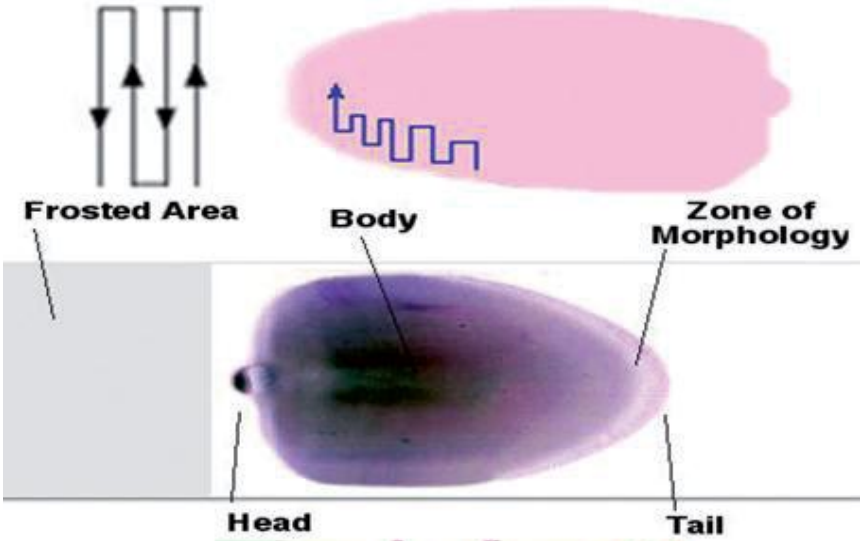
در هنگام مطالعه گستره محيطي بايستي نخست اطلاعات برگه CBC را با اطلاعات برچسب شده روي گستره مطابقت داد و سن و جنس بيمار را در تفسير پارامترها مد نظر داشت. براي مثال براي نوزاد نبايستي گزارش مرفولوژي ماكروسيتيک كرد چون به طور طبيعي مقدار MCV نوزاد بين 104 تا 120 فمتوليتر است. همچنين مشاهده هاولژولي و تعدادي تارگت و اكانتوسيت در خون محيطي نوزاد به علت كم‌كاري فيزيولوژيک طحال نرمال است.

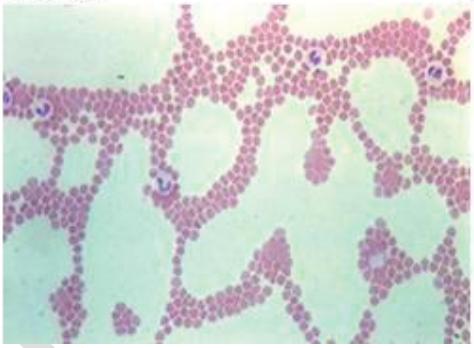
گستره خون محیطی ابتدا باید به صورت ماکروسکوپی مورد ارزیابی قرار بگیرد تا از لحاظ نحوه پخش خون بر روی گستره، تکنیک صحیح رنگ‌آمیزی و از نظر وجود هرگونه ذرات غیرطبیعی که ممکن است نشانه تجمع پلاکت‌های بزرگ (Giant) یا رسوب کرایوگلوبولین و یا تجمع سلول‌های توموری باشد، بررسی شود.

گستره محيطي داراي بخش‌هاي مختلف سر (Head)، دم (tail)، بدنه (body) و ناحيه شياري يا پر مانند (featherian) و ناحيه مرفولوژي (morphology of zone) است.

گلبول‌هاي قرمز در قسمت پر مانند يا شياري گستره محيطي فاقد هاله مركزي بوده و به اشتباه ممكن است گزارش مرفولوژي اسفروسيت داده شود. لنفوسيت‌ها در اين ناحيه بزرگتر از اندازه طبيعي بوده و امكان گزارش لنفوسيت‌هاي آتيپيک هست.

medlabnews





شمارش افتراقی و گزارش مرفولوژی را باید در ناحیه مرفولوژی (morphology of Zone) انجام داد. در این ناحیه گلبول‌های قرمز در کنار هم مانند سنگفرش موزائیک قرار دارند. شمارش افتراقی را می‌توان با حرکت زیگزاکی یا با حرکت جدید باتل منت (New battlement) در ناحیه مرفولوژی 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 است که این شیوه از حرکت نیاز به مطالعه دو طرف اسلاید و در نتیجه کل اسلاید داشته باشد.گلبول‌های قرمز در ناحیه شیاری گستره فاقد هاله مرکزی بوده و به اشتباه گزارش اسفروسیت داده می‌شود.

ناحیه مرفولوژي که پشت قسمت پَر مانند است ناحیه‌اي تک لایه از گلبول‌هاي قرمز کنار هم، شبیه سنگفرش موزائیک بدون همپوشي و بدون فواصل نامتناسب است. در این ناحیه شمارش افتراقي و تخمین گلبول‌هاي سفید و پلاکت و مرفولوژي گلبول‌هاي قرمز مورد آنالیز قرار مي‌گیرد.

تراکم سلولی بیش از 4 برابر در کناره‌ها و یا قسمت‌های پر مانند ناحیه دم اسلاید در مقایسه با قسمت‌های تک لایه و سنگفرشی دال بر اسلاید غیر قابل قبول با پخش نامتناسب است (effect plow Snow) و اسلاید باید مجدداً تهیه شود.

برای مشاهده میکروسکوپی ابتدا باید با درشت نمایی کم 10× وضعیت کلی اسلاید و پخش سلولی در کناره‌ها و قسمت پر مانند را بررسی کنیم.

در این درشت نمایی اسلاید از لحاظ موارد زیر بررسی می‌شود:

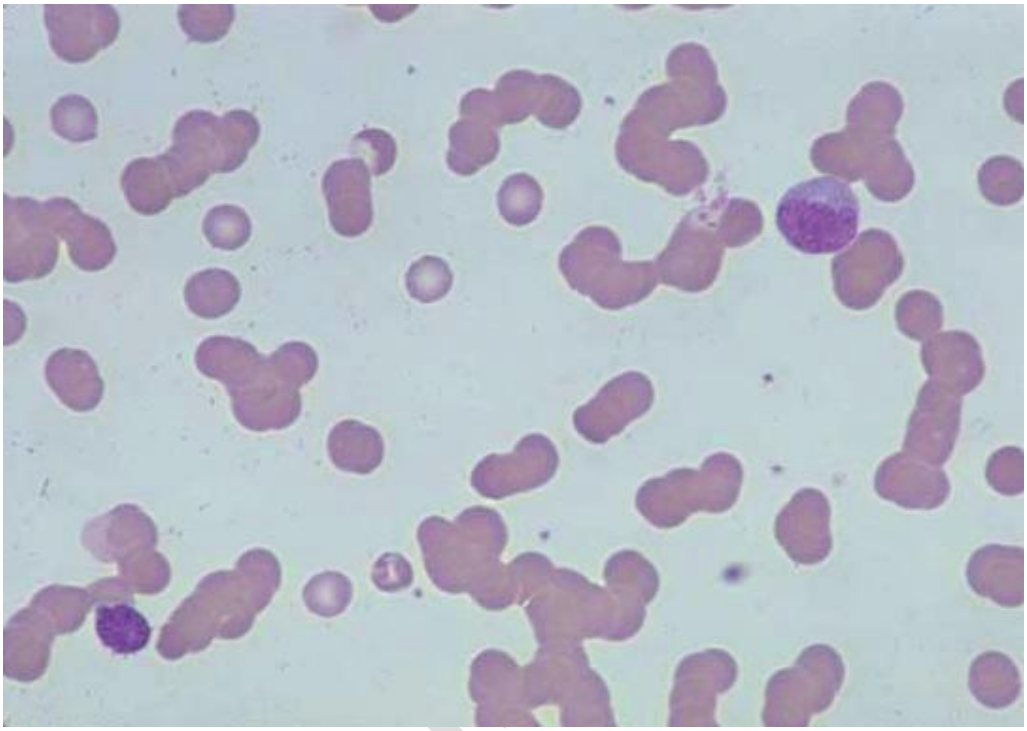
1- وجود رشته‌های فیبرین

2- وجود آگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز، رولکس، تجمع پلاکتی

medlab

3- توزیع گلبول‌های سفید

گفتنی است که پدیده رولکس بایستی در سرتاسر گستره مشاهده شود. در ناحیه دم اسلاید ستونی شدن گلبول‌های قرمز به صورت دوتایی یا سه‌تایی بوده که هر چه به طرف سر اسلاید حرکت کنیم ستون‌های بزرگتر مشاهده می‌شود.



پدیده رولکس

درشت نمایی 40 ×

شمارش افتراقی و بررسی مرفولوژی سلول‌ها و تخمین شمارش گلبول‌های سفید با این درشت نمایی صورت می‌گیرد.

برای تخمین شمارش گلبول سفید، میانگین شمارش گلبول‌های سفید در 10 فیلد با درشت نمایی 40 را در عدد 2000 ضرب می‌کنیم. در میدان‌های انتخابی جهت انجام این روش بایستی بیشتر گلبول‌های قرمز در کنار هم بوده و تعدادی از RBCها به صورت دوتایی و یا سه‌تایی به هم چسبیده باشند.

برای مثال اگر با ارزیابی 8 تا 10 میدان میکروسکوپی میانگین 4 تا 5 عدد گلبول سفید شمارش شود شمارش گلبول سفید حدوداً 10000 -8000 در میلی‌متر مکعب است.

درشت نمایی 100 ×

از این درشت نمایی جهت شناسایی مواردی از قبیل گرانول‌های توکسیک، هاول‌ژولی بادی، پاپن‌هایمر و سایر انکلوزیون‌های داخل سلولی مانند آور راد و بازوفیلیك استیپلینگ، استفاده می‌شود. همچنین برای بررسی نهایی سلول‌های غیرطبیعی باید از این درشت نمایی بهره برد.

نکته:

medlab

چنانچه اسلاید با درشت نمایی 10 و 40 تنظیم شود ولی با درشت نمایی 100 فوکوس نشود احتمال دارد که اسلاید را برعکس زیر میکروسکوپ گذاشته باشیم.

روغن ایمرسیون برای افزایش ضریب شکست نور در هنگام استفاده از درشت نمایی 100 و 50 مورد استفاده قرار میگیرد.

ضریب شکست نور نسبت سرعت عبور نور در هوا به سرعت عبور نور در ماده است. روغن دارای خواص شبیه شیشه است و باعث میشود که عدسی شیئی نور بیشتری را دریافت کند. حباب هوا در روغن مانند منشور عمل میکند. برای برداشتن حباب عدسی شیئی را در روغن جابجا کرده تا حباب محو شود.

شیوه استاندارد گزارش مرفولوژی

1(+)	2(++)	3(+++)	4(++++)
1-6 per oil imm. field	7-10 per OIF	11-20 per OIF	> 20 per OIF

شیوه استاندارد گزارش مرفولوژی در جدول مشاهده میشود. برای مثال چنانچه یک شکل غیر طبیعی مانند گلبول قطره اشکی در هر میدان با درشت نمایی 100 بین 1 تا 6 عدد باشد با درجه +1 یا Few و چنانچه در هر میدان بین 7 تا 10 عدد باشد با درجه +2 یا few a و چنانچه بین 11 تا 20 عدد باشد با درجه +3 یا moderate و بیشتر از 20 عدد با درجه +4 یا many گزارش میشود. آوردن پسوند osis مانند spherocytosis بیانگر درجه +4 است.

شمارش افتراقی

برای شمارش افتراقی بایستی به روش سیستمیک اسلاید را مورد مطالعه قرار داد و ناحیه صحیح را انتخاب کرد. در قسمت پر مانند گلبولهای قرمز فاقد هاله مرکزی (شبه اسفروسیت) و لنفوسیتهای بزرگ شبیه لنفوسیتهای آتیپیک دیده میشود.

سفارش میشود وقتی که شمارش گلبولهای سفید بیشتر از 40000 در میلیمتر مکعب است. برای افزایش دقت حداقل 200 سلول شمارش افتراقی گردد و سپس درصد هر سلول محاسبه شود.

حاشیه اسلاید را در هنگام شمارش افتراقی مد نظر قرار دهید زیرا سلولهای بزرگ مانند لنفوسیتهای بزرگ، سلولهای بلاست و منوسیتها در آنجا تراکم بیشتری دارند.

در مواردی که شمارش افتراقی 100 سلول در بیمار مبتلا به لکوپنی مشکل است هیچگاه نتیجه شمارش افتراقی 20 یا 50 عدد سلول را در عدد 5 یا 2 ضرب نکنید و از آنجایی که شمارش افتراقی بر روی بافیکوت به دلیل پخش نامنظم سلولها مشکل است در این موارد بهتر است که 2 تا 3 اسلاید تهیه کرده و جمع شمارش افتراقی را به 100 سلول برسانید.

لنفوسیتهای آتیپیک را هم میتوان بصورت مجزا درصد گرفت و هم میتوان به صورت درصدی از کل لنفوسیتها گزارش کرد و یا اینکه به صورت نیمه کمی از Slight تا Marked معادل 1+ تا 3+ گزارش کرد.

medlabnet.ir

گلبول‌های قرمز را بایستی از لحاظ اندازه، تغییرات اندازه، تغییرات رنگ و تغییرات شکل و انکلوزیون‌ها مورد بررسی قرار داد. برخی از آزمایشگاه‌ها برای گزارش چنین مواردی از واژه‌های Slight (خفیف)، Moderate (متوسط) و Marked (شدید) استفاده می‌کنند.

برای تخمین پلاکت با بزرگنمایی 100 در منطقه‌ای که گلبول‌های قرمز پخش یکنواخت دارند از شمارش پلاکت‌ها در 10 فیلد میانگین گرفته و در عدد 20000 ضرب می‌کنیم. بایستی دقت کرد که در میدان‌های انتخابی حداقل 250 گلبول قرمز در مواردی که شمارش گلبول قرمز 5 میلیون در میلی‌متر مکعب است، و حداقل 200 گلبول قرمز در مواردی که شمارش گلبول قرمز 4 میلیون در میلی‌متر مکعب است و حداقل 150 گلبول قرمز در مواردی که شمارش گلبول قرمز 3 میلیون در میلی‌متر مکعب است، وجود داشته باشد.

پارامترهای مربوط به گلبول‌ها:

پارامترهای گلبول سفید به شرح زیر است:

1- شمارش تام گلبول‌های سفید در میلی‌متر مکعب خون یا در لیتر

2- شمارش افتراقی به صورت درصد

3- شمارش مطلق هر سلول که حاصلضرب درصد سلول در شمارش کل گلبول‌های سفید است.

4- مرفولوژی گلبول‌های سفید

گلبول‌های سفید طبیعی موجود درخون:

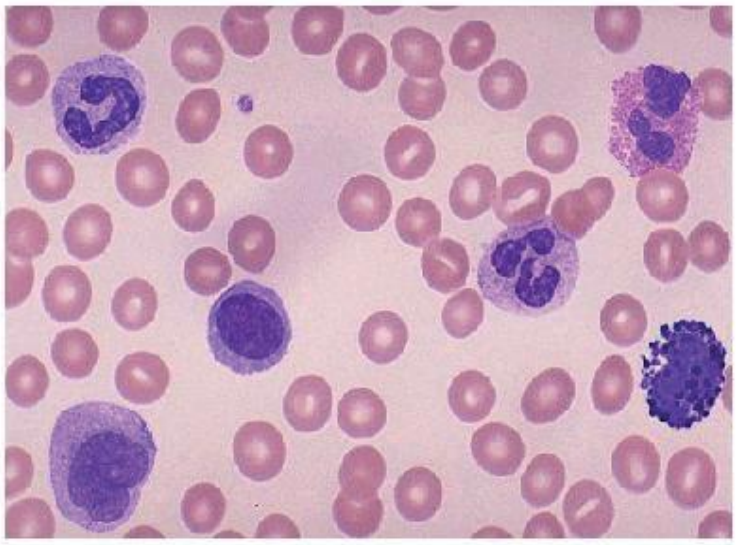
نوتروفیل:

نوتروفیل حدود 40 تا 70 درصد لکوسیت‌های خون در بزرگسالان را تشکیل می‌دهد و دارای هسته‌ای با 2 تا 5 لوب است. نوتروفیل‌های سه و چهار لوبه حدود 80 تا 90 درصد نوتروفیل‌ها و نوتروفیل‌های 5 لوبه کمتر از 5% نوتروفیل‌ها را تشکیل می‌دهند. نوتروفیل ها دارای سیتوپلاسمی بیرنگ و آکنده از گرانول‌های خرمایی رنگ هستند. کاهش لوبولاسیون نوتروفیل‌ها در آنومالی پلگر و سندرم‌های پیش سرطانی مشاهده می‌شود. کم گرانول شدن نوتروفیل‌ها همراه با مرفولوژی شبه پلگر از یافته‌های مهم سندرم پیش سرطانی (مایلودیسپلاستیک) است.

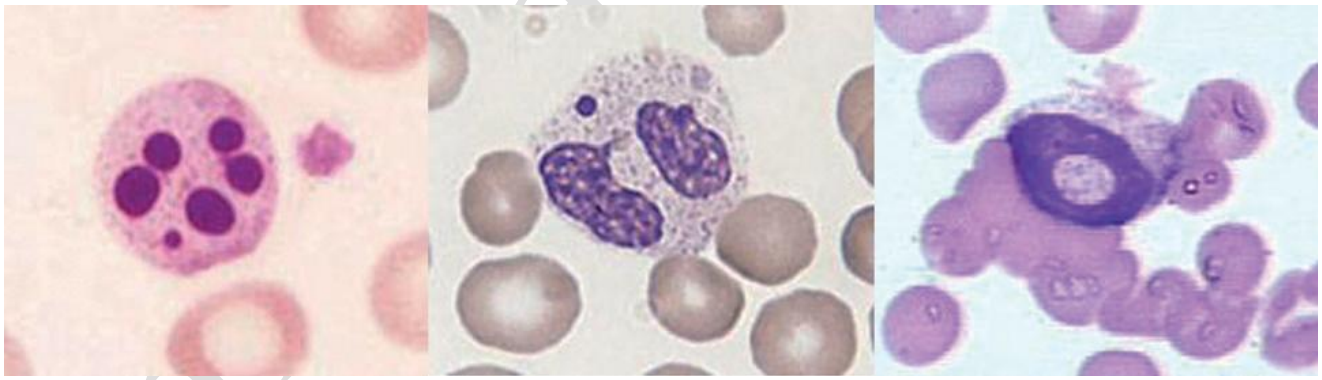
medlabnews.ir

WBC's

- Neutrophil
- Eosinophil
- Basophil
- Lymphocyte
- Monocyte

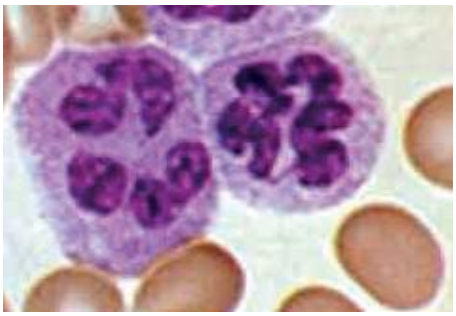


گرانولاسیون توکسیک و اجسام دولی از تغییرات مهم نوتروفیل‌ها در عفونت بوده و چنانچه از نمونه بدون ضد انعقاد گستره تهیه شود و واکوئل در نوتروفیل و یا باند مشاهده شود دارای ارزش فراوان در تشخیص عفونت خون می‌باشد. امکان دارد گاهی تکه‌ای از هسته شبیه اجسام هاول‌ژولی از لوبهای نوتروفیل جدا و در سیتوپلاسم باقی بماند که این حالت در موارد شیمی درمانی و عفونت با HIV گزارش شده است. نوتروفیل با هسته حلقوی به ندرت در افراد سالم و بیشتر در اختلالات مایلوپرولیفراتیو و سندرم‌های پیش سرطانی گزارش شده است.



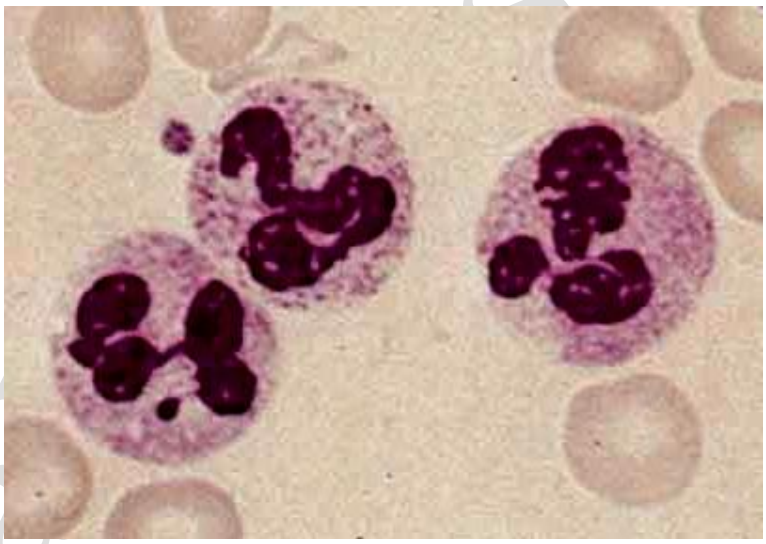
نوتروفیل با هسته حلقوی و نوتروفیل با تکه جدا شده از هسته شبیه هاول ژولی بادی و نوتروفیل با هسته نکروبیوتیک

دیدن یک نوتروفیل با بیش از 6 لوب و یا دیدن بیش از 5% نوتروفیل 5 لوبه به شرطی که نوتروفیل دارای اندازه بزرگ بوده و کروماتین لوبها باز باشد به عنوان هایپرسگمانته شدن نوتروفیل‌ها گزارش می‌شود که اولین علامت مرفولوژی در کم‌خونی مگالوبلاستیک می‌باشد. گرانول‌های نوتروفیل در آنومالی چدیاک و گاهی در لوسمی حاد میلوبلاستیک (شبه چدیاک) به هم چسبیده و ایجاد گرانول‌های درشت می‌کنند.



نوتروفیل‌های هیپر سگمانته

سلول باند 5-4 درصد گلبول‌های سفید را به خود اختصاص می‌دهد. گفتنی است که تعریف سلول باند در آزمایشگاه‌های مختلف گوناگون است و از این رو برخی از آزمایشگاه‌ها درصد باند را بالا و برخی درصد باند را کم گزارش می‌کنند.

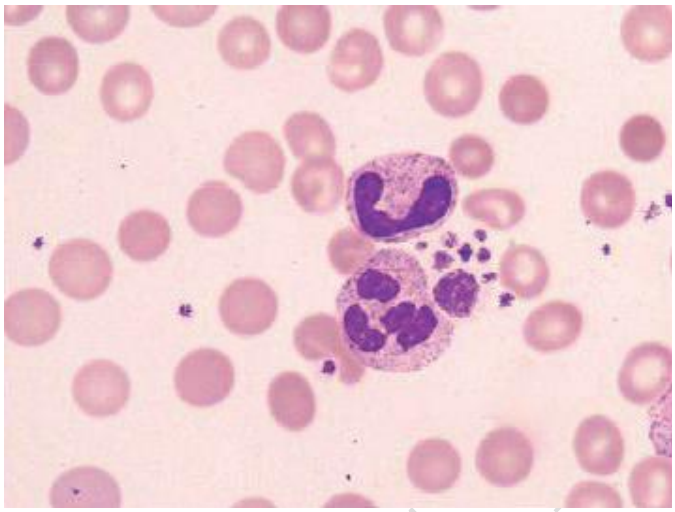


نوتروفیل با زائده درام استیک (Stick Drum)

هسته به شکل U و S و هسته نواری که دارای قطر یکسان در سرتاسر هسته است از مشخصات سلول باند است. اگر فرورفتگی در باند بوجود آید ولی نتوان نام فیلامنت را بر آن گذاشت هنوز جزء باند قلمداد می‌شود.

افزایش سلول باند (شمارش مطلق بیشتر از 500) به ویژه در کودکان و نوزادان علامت عفونت است. گفتنی است که نوزادان به علت تهی شدن سریع مغز استخوان ممکن است پاسخ لکوسیتوز به عفونت را ندهند. باندمی به حالتی گفته می‌شود که تعداد سلول‌های باند به تعداد نوتروفیل نزدیک شود که چنین حالتی در عفونت‌ها و شیگلوز دیده می‌شود.

medlab.ir



سلول نوتروفیل با لوبهای هسته‌ای جدا شده توسط فیلامنت و سلول باند با هسته نعل اسبی

ائوزینوفیل:

ائوزینوفیل حدود یک تا 5 درصد گلبول‌های سفید خون محیطی را تشکیل می‌دهد و شمارش مطلق آن بین 40 تا 550 در میلی‌متر مکعب است. ائوزینوفیل در 80% موارد دو لوبه است و در 20% موارد ممکن است 3 تا 4 لوبه باشد. گرانول‌های نارنجی درشت، سیتوپلاسم را پر می‌کنند.

ائوزینوفیل ممکن است به صورت هایپرسگمانته در کم‌خونی مگالوبلاستیک ناشی از کمبود ویتامین B12 و اسید فولیک و یا به صورت هیپوسگمانته در آنومالی پلگر و یا به صورت حلقوی در اختلالات خونی مشاهده شود.

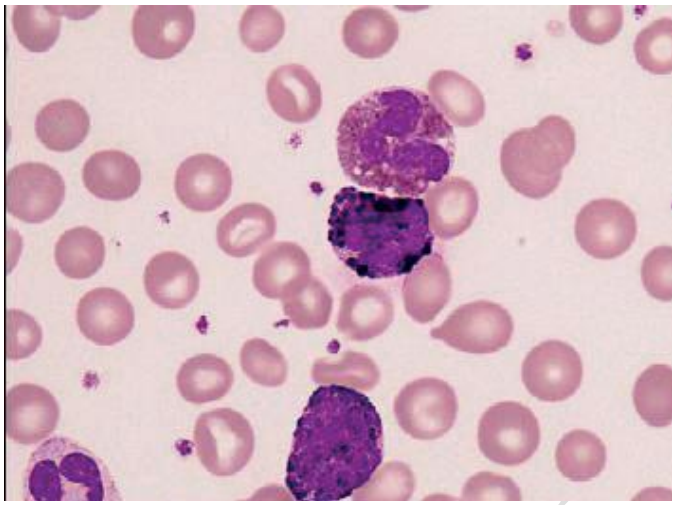
ائوزینوفیل‌های کم گرانول و واکوئله در سندرم‌های پیش سرطانی و سندرم افزایش ائوزینوفیل مشاهده می‌گردد.

بازوفیل:

بازوفیل دارای هسته لوبوله است ولی پوشش گرانول‌های درشت آبی رنگ، دیدن لوبها را مشکل می‌کند. زمان توقف بازوفیل‌ها در خون 7/3 روز ±21 ساعت است که نسبت به سایر گرانولوسیت‌ها بیشتر است. گرانول‌های بازوفیل در آب محلول بوده و از این رو در رنگ گیمسا به سختی قابل رؤیت می‌باشد.

بازوفیل‌های کم گرانول در سندرم‌های پیش سرطانی و اختلالات مایلوپرولیفراتیو مشاهده شده است.

medlabnews



ائوزینوفیل (بالا)، بازوفیل (پایین). گرانول‌های ائوزینوفیل بزرگ و به رنگ نارنجی بوده و معمولاً سطح هسته را نمی‌پوشانند، گرانول‌های بازوفیل بزرگ و شدیداً بازوفیلیک بوده و روی هسته را می‌پوشانند.

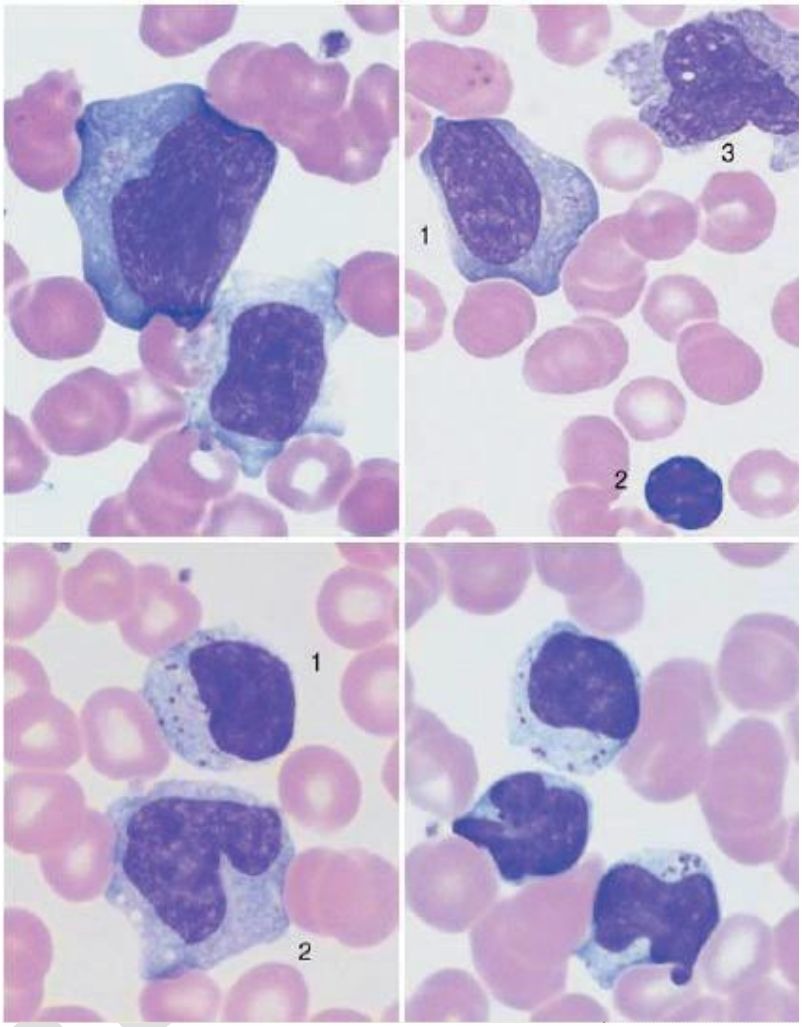
لنفوسیت:

لنفوسیت‌ها بین 20 تا 40 درصد از لکوسیت‌های خون محیطی را تشکیل می‌دهند. شمارش مطلق لنفوسیتی بین 960 تا 4400 در هر میلی‌متر مکعب است. تقریباً حدود 10 تا 15 درصد از لنفوسیت‌های گردش خون، سلول‌های B هستند. حدود 2% از لنفوسیت‌ها سلول‌های کشنده طبیعی (cell NK) و بقیه از نوع T هستند که در میان آن‌ها سلول‌های T کمکی بیشترین درصد را به خود اختصاص می‌دهند.

نکته: روی هم رفته از روی گستره خون محیطی نمی‌توان جمعیت‌های مختلف لنفوسیتی را از هم جدا کرد ولی لنفوسیت‌های NK و لنفوسیت‌های فعال شده T در جمعیت لنفوسیت‌های بزرگ دانه‌دار (LGL) هستند.

لنفوسیت‌ها در سه دسته کوچک (Small)، متوسط (Median) و بزرگ (Large) در خون محیطی مشاهده می‌شوند. لنفوسیت‌های کودکان بزرگتر و متنوع‌تر از بزرگسالان است.

medlabnews

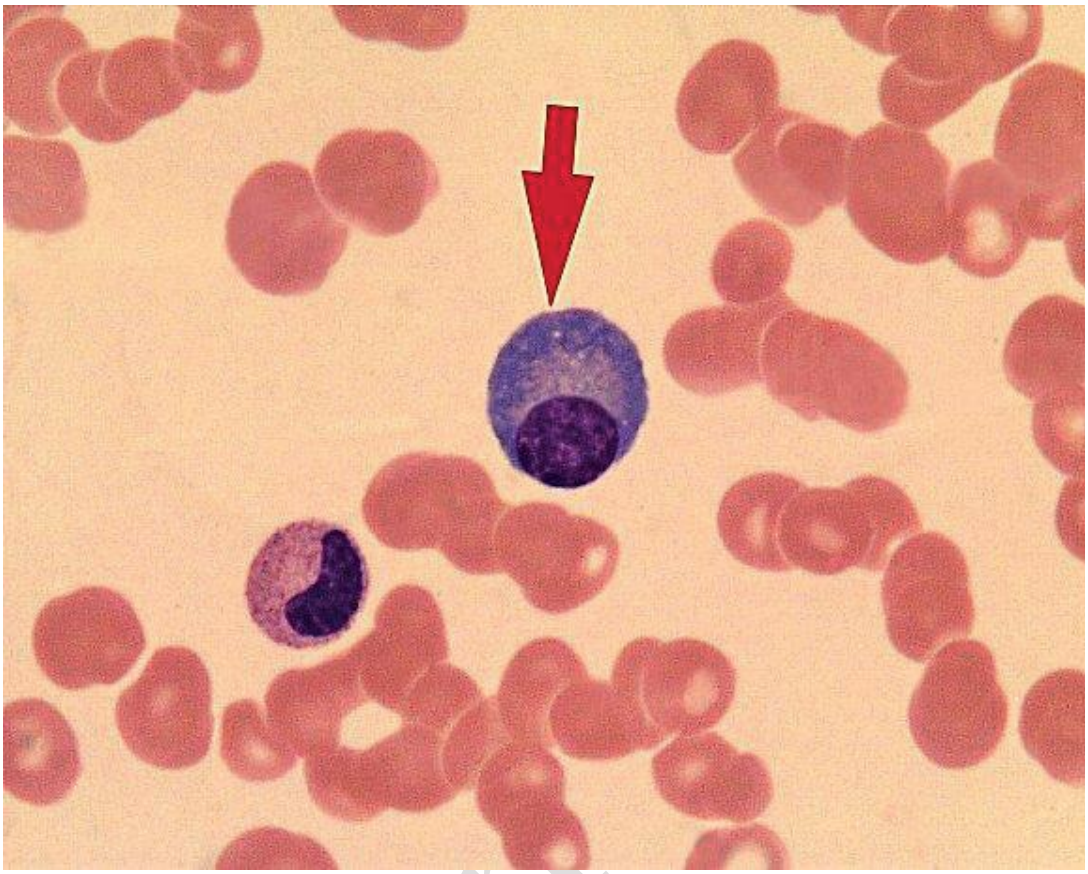


لنفوسیت‌های NK در گروه لنفوسیت‌های بزرگ دانه‌دار قرار می‌گیرند

کروماتین هسته فشرده و یکنواخت، هسته گرد و گاهی دندانه‌دار و تابدار از ویژگی لنفوسیت است. لنفوسیت‌ها ممکن است دارای تعداد محدود و قابل شمارش از گرانول‌های آژروفیل باشند. در لنفوسیت‌های بزرگ دانه‌دار تعداد زیادتری از گرانول‌های درشت آژروفیل که دارای خاصیت پراکسیداز منفی هستند در گوشه‌ای ازسیتوپلاسم قرار دارد.

لنفوسیت کوچک دارای هسته‌ای معادل 6-8 میکرون بوده و از این رو به عنوان راهنمای اندازه طبیعی گلبول قرمز است. توجه داشته باشید که لنفوسیت‌های خون محیطی بر خلاف سلول‌های دیگر سلول‌های پایان بلوغ نیستند بلکه در هنگام برخورد با آنتی‌ژن به اشکال متنوع از جمله سلول‌های شبیه به بلاست تبدیل شده و قابلیت میتوز پیدا می‌کنند و نکته دیگر اینکه بر خلاف سایر سلول‌ها می‌توانند از خون به بافت وارد شده و دوباره از بافت به خون برگردند.

medlab



لنفوسیت آتیپیک به شکل پلاسماسایتوئید

منوسیت:

منوسیت دارای قطری معادل 15-20 میکرون است و نظر به اینکه تمایل به چسبیدن و پهن شدن روی شیشه و پلاستیک دارد بزرگتر از نوتروفیل به نظر می‌رسد. منوسیت خون را به سمت بافت‌ها ترک کرده و به ماکروفاژ، استئوکلاست و سلول‌های دندریتیک تبدیل می‌شود.

هسته ممکن است گرد یا بیضی باشد ولی اغلب دارای دندانه عمیق و شبیه نعل اسب است. توجه داشته باشید که منوسیت نعل اسبی را با سلول باند اشتباه نکنید. منوسیت با هسته نعل اسبی دارای هسته پهن و فضای پاراکروماتینی است در حالی که باند مانند نوار باریک بوده و دارای گرانول‌های نوتروفیلی است.

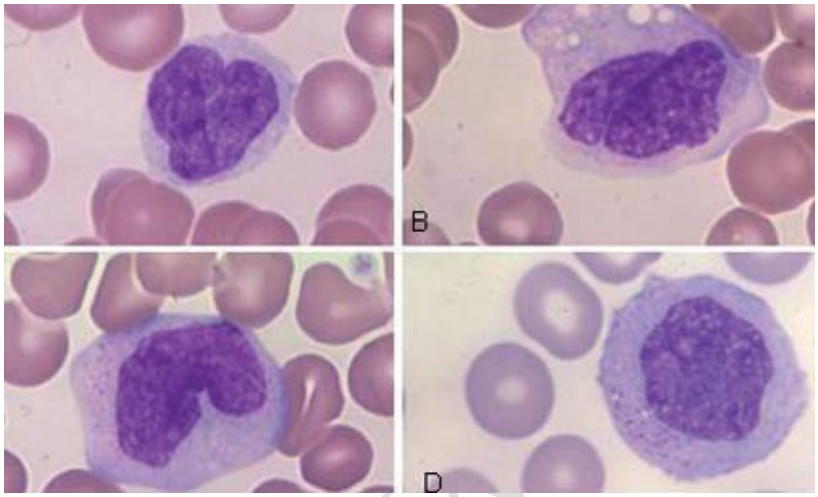
هسته منوسیت دارای کروماتین بنفش رنگ و دارای فضاهای راه راه است که به آن فضای پاراکروماتین گویند. هستک یا بقایای آن ممکن است در منوسیت یافت شود چون در واقع منوسیت سلول نارسی است که در بافت‌ها به تکامل بلوغ می‌رسد. سیتوپلاسم منوسیت آبی خاکستری یا شبیه شیشه مات است و گاهی گرانول‌های آژروفیل شبیه گرد و غبار سیتوپلاسم را می‌پوشاند.

گفتنی است که منوسیت‌ها به سرعت در ضد انعقاد واکوئله می‌شوند و از این رو واکوئله شدن سیتوپلاسم منوسیت‌ها ارزش گزارش ندارد.

بر اساس مطالعات فلوسیتومتری دو زیر گروه منوسیتی $CD16^+$ و $CD16^-$ وجود دارد. گفتنی است که منابع ذخیره‌ای منوسیت در مغز استخوان وجود ندارد و این نشان می‌دهد که چرا در بهبودی نارسایی مغز استخوان نخست منوسیت در مغز استخوان ظاهر می‌شود.

medlabir

شمارش مطلق منوسیتی حدود 800 در میلی‌متر مکعب بوده و بین 1 تا 8 درصد گلبول‌های سفید خون را تشکیل می‌دهد. منوسیتوز در عفونت سل، اندوکاردیت تحت حاد، سندرم‌های پیش سرطانی و در بهبودی مغزاستخوان از نارسایی و بیماری‌های اتوایمیون و مالاریا گزارش شده است.



منوسیت در اشکال مختلف

تفاوت‌های مرفولوژی لنفوسیت و منوسیت:

لنفوسیت و منوسیت جزء سلول‌های تک هسته‌ای بوده و گاهی امکان دارد که لنفوسیت‌های بزرگ با منوسیت اشتباه شوند. توجه به معیارهای زیر در افتراق این دو سلول کمک کننده است.

1- منوسیت بزرگترین سلول تک هسته‌ای در خون محیطی است که دارای هسته‌ای باز با فضای پاراکروماتین به رنگ سفید است ولی هسته لنفوسیت‌ها غالباً دارای کروماتین فشرده بوده و چنانچه فضای پاراکروماتین داشته باشد به رنگ پوست پیازی است.

2- سیتوپلاسم منوسیت در خون EDTAدار به سرعت واکوئله می‌شود و از این رو یافتن واکوئل در سیتوپلاسمی به رنگ خاکستری کدر یا شیشه مات، سلول منوسیت را مطرح می‌کند.

3- سیتوپلاسم منوسیت چنانچه دارای گرانول‌های آژروفیل باشد، گرانول‌ها به صورت پودری و به رنگ بنفش قرمز در تمامی سیتوپلاسم مشاهده می‌شود، در حالیکه گرانول‌های لنفوسیت در صورت حضور درشت و معمولاً در یک گوشه از سیتوپلاسم و غالباً قابل شمارش هستند.

4- سیتوپلاسم لنفوسیت‌ها اندک، روشن و گاهی آبی است. لنفوسیت دارای هسته گرد، گاهی دندانه‌دار و گاهی دارای پیچ و تاب است. هسته منوسیت‌ها گرد، نعل اسبی و گاهی دارای پیچ و تاب فراوان است.

5- جدارسیتوپلاسم لنفوسیت‌ها غالباً منظم و گاهی تحت فشار RBC دارای فرورفتگی است. در حالیکه جدار سیتوپلاسم منوسیت‌ها نامنظم بوده و چندان تحت اثر فشار RBC برای تولید چین خوردگی قرار نمی‌گیرند.

نکته: گلبول‌های قرمز هسته‌دار در بسیاری از آنالیزورها به جای گلبول سفید شمرده می‌شود و در این حالت به عنوان لنفوسیت قلمداد می‌گردد و شمارش افتراقی معکوس می‌دهد؛ بدین معنا که در حضور NRBC همیشه لنفوسیت از نوتروفیل بیشتر است، درچنین مواردی با استفاده از فرمول زیر شمارش گلبول‌های سفید بایستی تصحیح شود:

medlabnews

$$\text{Corrected WBC} = \frac{\text{شمارش تصحیح نشده گلبولهای سفید} \times 100}{100 + NRBC}$$

برای مثال شمارش تصحیح شده گلبول سفید 40000 با 30% گلبول قرمز هسته‌دار برابر است با:

$$\frac{40000 \times 100}{100 + 30} = 30769$$

در برخی از آزمایشگاه‌ها شمارش گلبول سفید با NRBC≤10% تصحیح می‌شود، ولی بهتر است که برای هر میزان تصحیح صورت بگیرد.

برای محاسبه شمارش مطلق نوتروفیل درصد نوتروفیل در کل WBC ضرب می‌شود.

برای مثال برای WBC=8000/µl و نوتروفیل 70% شمارش مطلق نوتروفیل برابر با 5600 می باشد.

نکته: شمارش مطلق نوتروفیل یا ANC در تمام سنین بیشتر از 1500 تا 2000 در میلی متر مکعب است و کمتر از 500 بیمار را مستعد عفونت می‌کند. نرمال شمارش مطلق لنفوسیت 7800-1500 است.

چنانچه شمارش مطلق سلولی نرمال باشد ولی درصد آن افزایش یابد به آن افزایش نسبی گویند. برای مثال شمارش مطلق لنفوسیتی بین 4000- 1500 در میلی‌متر مکعب طبیعی است. حال چنانچه شخصی با شمارش گلبول‌های سفید 3000 در میلی‌متر مکعب دارای 70% لنفوسیت باشد شمارش مطلق لنفوسیتی 2100 است که در طیف طبیعی است. ولی چون درصد آن بالاست افزایش نسبی دارد، ولی چنانچه هر دو بالا باشد به آن لنفوسیتوز گفته می‌شود. برای مثال WBC= 12000 و 80% لنفوسیت به عنوان لنفوسیتوز در نظر گرفته می‌شود.

شمارش مطلق منوسیت بین 800-1000 در میلی‌متر مکعب و شمارش مطلق ائوزینوفیل 50-500 در میلی‌متر مکعب می‌باشد.

مثال: شمارش گلبول سفید بیماری 20000 و دارای 4% ائوزینوفیل است در این حالت شمارش خالص (مطلق) ائوزینوفیل برابر با 800 می‌شود. گرچه در صد طبیعی ائوزینوفیل بین 1 تا 5 درصد است ولی بیمار ائوزینوفیلی دارد.

برای محاسبه AGC یا ANC یا شمارش مطلق نوتروفیلی درصد سلول‌های باند و نوتروفیل در کل WBC ضرب می‌شود.

نکته: اسماج سل بیشتر از 5% اهمیت داشته و به صورت Few و Moderate و Many می‌توان آن را گزارش کرد.

سری نارس نوتروفیلی در شمارش افتراقی با نام سلول گزارش می‌شود. مثلاً بیماری دارای 5% باند و 8% میلوسیت و 2% پرومایلوسیت است. سلول‌های نارس ائوزینوفیل و بازوفیل تحت عنوان سلول نارس (cell Immature) گزارش می‌شوند.

مثال: اگر 2% ائوزینوفیل به شکل باند و 3% به صورت متا دیده شود بیمار دارای5% Eosinophil Immature است. برای گزارش مرفولوژی گلبول‌های سفید به نکات زیر دقت کنید:

گرانولاسیون توکسیک

هیپو سگمانتاسیون

medlabnews.ir

اجسام دولي و واکوئله شدن باند و نوتروفيل
لنفوسيت‌های آتيپيک
ميله آور (rod Auer)
هيپرسگمانتاسيون

پارامترهای گلبول‌های قرمز عبارتند از:

1- شمارش گلبول قرمز در ميلی‌متر مکعب يا ليتر
2- هموگلوبين (dl/gr)
3- هماتوکريت (% يا L/L)
4- حجم متوسط گلبول قرمز (MCV بر حسب فمتوليتر)
5- ميانگين هموگلوبين در گلبول (MCH بر حسب پيکوگرم)
6- غلظت هموگلوبين در سلول (MCHC بر حسب درصد يا گرم درصد)
7- دامنه پراکندگی حجم (RDW بر حسب درصد يا SD)
8- مرفولوژی گلبول‌های قرمز

پارامتر MCHC ارزش کنترل کيفی دارد. کاهش واقعی آن بيانگر هيپوکروميا يا استوماتوسيتوز است و افزايش آن در حد 37 يا 38 بيانگر اسفروسيتوز، گلبول‌های داسی شکل و يا بايت سل است.

افزايش غير قابل قبول MCHC مثلاً بيش از 40% غالباً بيانگر خطای آناليتيکال از قبيل نمونه‌های هيپرليپيدمی، نمونه‌های ژاندیس، آگلوتيناسيون‌های سرد و افزايش زياد گلبول‌های سفيد است. غالب موارد فوق با افزايش هموگلوبين، MCHC را افزايش می‌دهند.

پارامتر RDW (Width Distribution Cell Red) از روی هيستوگرام گلبول‌های قرمز به دست می آيد و پارامتری برای تغييرات اندازه يا آنيزوسيتوز است. هرچه تنوع اندازه RBC بيشتر باشد هيستوگرام گلبول‌های قرمز پهن‌تر و مقدار RDW که بيانگر تغييرات اندازه است وسيع‌تر می‌شود.

مقدار نرمال RDW بر حسب CV برابر است با 5/14 – 5/11 درصد و بر حسب SD برابر با 3± 42 فمتوليتر است.

با همراه کردن پارامترهای MCV و RDW می‌توان پزشک را در تشخيص ياری داد. برای مثال:

افزايش MCV و RDW در کم‌خونی مگالوبلاستيک ممکن است ديده شود. کاهش MCV و افزايش RDW احتمال آنمی فقر آهن را مطرح می‌کند.

مرفولوژی گلبول‌های قرمز:

تغييرات شکل و اندازه
گزارش مرفولوژی سلول‌های ويژه مانند داسی، اسفروسيت، آکانتوسيت و ...
پلی کروماژی
گلبول قرمز هسته‌دار

نکته: در کم‌خونی‌هايی مانند تالاسمی ماژور و آنمی داسی شکل، گلبول‌های قرمز هسته‌دار معمولاً در مراحل ارتو و پلی‌کروم در خون ظاهر می‌شوند. مشاهده اشکال نابالغ‌تر از قبيل

medlabnews.ir

پرونرموبلاست و بازوفیلیک نرموبلاست بسیار غیرطبیعی است و امکان بیماری‌های بدخیم مانند سندرم‌های پیش سرطانی یا اریترولوکمی را در بزرگسالان مطرح می‌کند.

همولیز در نوزادان ممکن است با ورود گلبول‌های قرمز در تمام رده‌های بلوغ مشاهده شود.

گلبول‌های پلی‌کروماژی در خون محیطی به مفهوم رتیکولوسیت‌های بسیار نارس(Shift reticulucyte) است. همولیز و خونریزی موجب ورود گلبول‌های پلی‌کروماژی به خون می‌شود.

چنانچه بافر رنگ‌آمیزی اسیدی باشد گلبول‌های قرمز به رنگ قرمزتر از نرمال در آمده و نوتروفیل‌ها به سختی قابل رؤیت و گرانول‌های ائوزینوفیل نارنجی روشن می‌شوند.

پارامترهای پلاکتی عبارتند از:

1- شمارش پلاکت در میلی‌متر مکعب

2- حجم متوسط پلاکتی (MPV)

3- مرفولوژی پلاکت

نکات مهم:

1- کوچکترین ذره لخته در خون موجب کاهش فوق‌العاده پلاکت‌ها می‌شود.

2- هنگام گزارش ترومبوسیتوپنی پدیده اقماری و پدیده تجمع پلاکتی در حضور EDTA را باید مد نظر قرار داد.

3- گلبول‌های شکسته و میکروسیتوز شدید موجب افزایش کاذب پلاکت می‌شود. بیشترین افزایش کاذب پلاکت در بیماری هموگلوبین اچ دیده می‌شود.

4- زمان ایده‌آل برای محاسبه MPV یک تا سه ساعت پس از خون‌گیری است و دامنه طبیعی آن 2/10 – 9/6 فمتولیتر است.

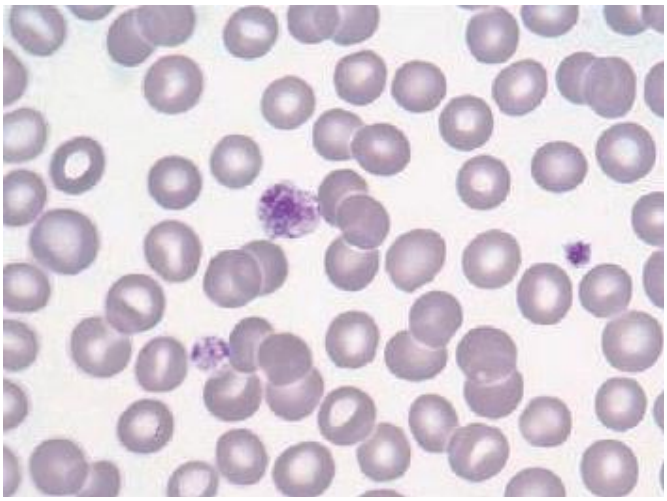
گزارش مرفولوژی پلاکت:

پلاکت‌های درشت (platelet Large) با حجمی دو برابر پلاکت معمولی

پلاکت‌های غول‌آسا (platelet Giant) به اندازه گلبول قرمز

پلاکت‌های با اشکال عجیب و غریب (Bizarre)

پلاکت‌های کم گرانول (Hypogranular)



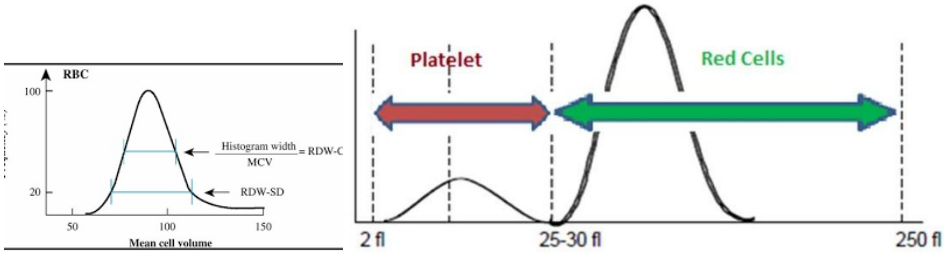
پلاکت غول‌آسا

medlabnews.ir

medlabnews.ir

منابع خطا در اندازه گیری MCV :

میانگین حجم گلبول قرمز، MCV می باشد که از روی منحنی هیستوگرام RBC بدست می آید. MCV تحت تاثیر عواملی همچون ضد انعقاد، نگهداری خون (رعایت زمان و زنجیره سرد)، درجه لکوسیتوز و آگلوتیناسیون سرد می باشد. نگهداری خون در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت باعث افزایش ۶ واحدی در MCV می شود. افزایش نسبت ضد انعقاد به حجم خون (حجم کم نمونه در ویال CBC) نیز باعث افزایش MCV می شود. شرایطی مانند دیابت کنترل نشده، افزایش اوره خون، افزایش سدیم خون سبب افزایش کاذب MCV می گردد.



دهیدراتاسیون شدید هم می تواند سبب هیپراسمولاریته سلول ها و ورم آنها در شرایطی که موقع انجام CBC نمونه جهت شمارش و اندازه گیری با ایزوتون رقیق می گردد شود. حضور آگلوتینین سرد در نمونه نیز موجب افزایش MCV، MCH و MCHC گردد که با گرم کردن جزئی بر طرف می گردد. در غلظت ها و شمارش های WBC معمول و نرمال، WBC اثری در خوانش MCV ندارد اما WBC بالای ۵۰۰۰۰ سبب افزایش کاذب MCV می شود. سلول های هیپوکروم، سبب گزارش MCV کمتر از مقدار واقعی و گلبول های غیر سیال مانند اسفروسیت باعث گزارش بالای MCV بعضا تا ۱,۵ برابر مقدار طبیعی می شود.

در حضور بیماریهای مزمن کبدی به علت تغییرات Cholestrol آزاد خون و توسعه غشای گلبول قرمز، افزایش MCV مشاهده می شود و سلول های عادی که MCV نرمال دارند به صورت MCV بالا گزارش می شوند. و سلولهای کوچک (میکروسیت) به صورت MCV نرمال گزارش می شوند.

RDW: دامنه پراکندگی حجم گلبول قرمز حول میانگین است. در اصل پارامتری جهت گزارش کمی آنیزوسیتوز می باشد. مقدار طبیعی آن حدود ۳ ± ۴۲ بر حسب فمتولیتر و ۱,۲ ± ۱۲,۸ بر اساس ضریب تغییرات یا CV می باشد.

MCV توسط دستگاه مستقیما اندازه گیری می شود.

MCH: میانگین هموگلوبین گلبول قرمز بر حسب پیکوگرم می باشد. محدوده طبیعی آن حدودا ۳۲-۲۷ می باشد و بر خلاف MCV که مستقیما محاسبه می گردد، MCH در دستگاههای سل کانتر از رابطه زیر بدست می آید. (Hb/RBC)

با توجه به پایداری بهتر Hb و RBC، MCH پارامتر پایدارتری می باشد.

MCHC: میانگین غلظت هموگلوبین در گلبول قرمز بوده و از رابطه زیر بدست می آید. ((Hb/(MCV*RBC))

با توجه به نسبت روبرو، در نمونه های لیپمیک، افزایش کاذب هموگلوبین سبب افزایش نسبت MCHC می شود. همولیز هم به سبب کاهش شمارش RBC و افزایش هموگلوبین آزاد سبب کاهش کاذب در MCHC می گردد. افزایش واقعی پارامتر MCHC در مرفولوژی اسفروسیتوز و Sickle Cell و کاهش واقعی آن در آنمی فقر آهن پیشرفته دیده می شود.

اساس شمارش WBC در دستگاههای شمارش گر:

در غالب سل کانترها برای شمارش WBC نخست با اضافه کردن محلول لیز(Lyse) و رقیق کننده به خون، گلبول قرمز لیز شده و هموگلوبین آزاد شده به سیانومتهموگلوبین تبدیل می گردد. معمولا محلول لیز با ایجاد منفذ در غشاء WBC موجب چروکیدگی غشاء بر روی هسته می گردد و در این وضعیت مورد حجم سنجی قرار می گیرد. در آنالیزورهای ساده رایج WBCها به سه دسته نوتروفیل، لنفوسیت و MIX تقسیم بندی می شوند. غالب منوسیت ها، ائوزینوفیل ها و بازوفیل در دسته Mix قرار می گیرند. گلبول قرمز هسته دار (NRBC) در اغلب آنالیزورهای رایج به جای WBC شمارش می گردند و چنانچه تعداد آنها بیشتر از 10% باشد باید اقدام به تصحیح شمارش WBC کرد. احتمال دارد گلبول های قرمز نوزاد، سلولهای Target در بیماران مبتلا به یرقان انسدادی لیز نشود در نتیجه سبب افزایش کاذب WBC موقع شمارش گردد و معمولا بصورت لنفوسیت شمارش می گردند.

ESR:

سرعت رسوب گلبولهای قرمز می باشد. روش مرجع برای این آزمایش استفاده از لوله های وسترگرین می باشد. طول قسمت مدرج این لوله ها ۲۰۰ میلی متر و قطر داخلی آن ۲,۵۵ میلی متر می باشد. برای تهیه نمونه جهت اندازه گیری ESR، ۴ حجم از خون با ۱ حجم از سیترات سدیم ۳,۸ درصد مخلوط می شود. در صورت استفاده از CBC جهت نمونه ESR در بیماران بد رگ باید به ۴ حجم خون EDTA دار ۱ حجم سیترات سدیم یا نرمال سالین اضافه گردد. آزمایش باید طی دو ساعت بعد از نمونه گیری انجام گیرد در غیر این صورت گلبولهای قرمز کم کم کروی می شوند و سرعت رسوب کاهش می یابد.

انحراف لوله از حالت عمودی سبب افزایش قابل توجه در سرعت رسوب می شود. در برخی سیستم های اتوماتیک (سدیمان ریدر) با قرار دادن لوله های ESR در زاویه حدود ۱۸ درجه نسبت به حالت عمودی آزمایش سرعت رسوب یک ساعته در ۲۵-۲۰ دقیقه قرائت می شود.

عوامل موثر در سرعت رسوب گلبولهای قرمز به به دو گروه کلی تقسیم بندی می شوند:

۱. عوامل مرتبط با RBC مانند شکل گلبولهای قرمز نسبت سطح به حجم و ...
۲. عوامل مرتبط با پلاسما مانند میزان فیبرینوژن، ایمونوگلوبولین ها و سایر پروتئین های فاز حاد

اصول اندازه گیری دستگاهی: نور مادون قرمز در طول لوله ESR که با زاویه ۱۸ درجه قرار گرفته حرکت کرده و ابتدا و انتهای نمونه را شناسایی می کند. عمل خوانش برای یک ESR یک ساعته ۸-۱۰ بار انجام می گیرد. دستگاه ESR باید در محل صاف و تراز بدور از هر گونه لرزش سانتریفیوژ قرار گیرد. با توجه به خوانش مبتنی بر عبور نور دیواره لوله ها در قسمت خوانش باید فاقد هر گونه برچسب یا آلودگی باشد. توصیه می گردد قبل از قرار دادن لوله مخصوص ESR در دستگاه حداقل به مدت ۵ دقیقه با میکسر مخصوص ESR (حدود ۱۵ دور دقیقه) یا با دست به میزان لازم مخلوط گردد. توصیه می گردد روزانه حداقل ۱ نمونه به صورت دوبل خونگیری شده و همزمان با روش دستگاهی با روش مرجع وسترگرین نیز خوانده شود.

کنترل کیفیت درون کانالی (تکرارپذیری) حداقل بصورت ماهانه ۱ بار برای خانه های مورد استفاده دستگاه ریدر موجود باشد. میزان CV قابل قبول محاسبه شده برای نمونه های نرمال حداکثر تا ۲۰ درصد و برای نمونه های بالای ۳۰ در محدوده ۴ تا ۶ درصد باشد.

با توجه به خوانش مستقل کانال های مختلف با هم توصیه می گردد ماهانه حداقل یک بار خوانش تمام خانه ها با یک نمونه کنترل گردد. (کنترل کیفی بین کانالی) ترجیحا ۱۰ نمونه از یک فرد اخذ شده و در جایگاههای مختلف قرار گیرد. و خوانش آنها با هم مقایسه گردد.

در انتخاب نمونه ها جهت کنترل دستی و دستگاهی سعی گردد هم از ESR بالا و هم نرمال استفاده گردد.

ضروری است با توجه به اهمیت ESR بالا در تصمیم پزشک و پیگیری درمان حتما نمونه های بالای ۸۰ به روش دستی چک شده یا با سوابق بیمار کنترل گردد. (در بیماران شدیدا آنمیک مبنای تصمیم گیری ESR اصلاح شده باشد). بعد از خوانش ESR توسط دستگاه ریدر سعی گردد لوله ESR بلافاصله از دستگاه خارج شده و به صورت چشمی نیز میزان رسوب بررسی گردد.

در نمونه های شدیدا لیپمیک احتمال کاهش کاذب در خوانش به علت عدم عبور نور از پلاسمای غنی از TG وجود دارد.

برای ارزیابی دقت خوانش از نمونه ای که دارای ESR بالای ۳۰ می باشد، استفاده گردد. در ESR دستگاهی به ازای هر سه درجه انحراف از حالت عمودی، تغییرات تا ۳۰ درصد در نتایج می تواند رخ دهد.

برای کنترل صحت خوانش ESR برای بیمارانی که خوانش ESR به روش دستگاهی در دسترس است می توان از نمونه ESR به روش مرجع نیز استفاده کرد. یا برای ارزیابی صحت ESR آنالایزور به روش ICSH International Council

of standardization of haematology که در منابع علمی وجود دارد استفاده کرد و نتایج همبستگی خوانش ها با جدول استاندارد که به این منظور تهیه شده مقایسه و بررسی گردد.

برای اصلاح مقادیر ESR با با هماتوکریت بیمار فرمولها و گراف های متعددی وجود دارد، توصیه می گردد حتما هر دو جواب (اولیه و اصلاح شده در برگه جواب بیمار قید گردد). برای اصلاح ESR با هماتوکریت می توان از گراف ICSH یا فرمول فابری استفاده کرد.

$$Adj\ ESR = \frac{WG * 15}{55 - HCT}$$

برای مثال اگر هماتوکریت بیماری ۳۰ باشد و میزان ESR بیمار ۱۱۴ باشد با فرمول بالا مقدار ESR اصلاح شده حدود ۶۸ خواهد بود.

تست های انعقادی

کلیات:زمانی که بیمار با خونریزی به پزشک مراجعه می‌کند چندین تست غربالگری جهت تشخیص و طبقه‌بندی این اختلالات مورداستفاده قرار می‌گیرد که معروف‌ترین این تست‌ها تست PT و PTT است. در آزمون PT مسیر انعقاد خارجی و مشترک (فاکتورهای ۱، ۲، ۵، **۷،۱۰**) را کنترل می‌کنیم؛ البته از آزمون PT برای مانیتورینگ داروهای ضدانعقاد خوراکی مثل وارفارین یا کمادین نیز استفاده می‌شود. کمبود ویتامین K نیز باعث افزایش زمان تست های انعقادی بخصوص PT می شود.فاکتوز های انعقادی وابسته به ویتامین K عبارتند از ۲، ۷، ۹، ۱۰و پروتئین های C، S و Z. آزمون PTT مسیر انعقاد داخلی را چک می‌کند؛ برای مانیتورینگ مصرف هپارین نیز از آزمون PTT استفاده می‌شود. در آزمایش PTTفعال شده یا aPTT حجم مساوی از محلول حاوی سطوح با شارژ منفی و فسفولیپیدی (**سفالین**) برای فعال کردن فاکتورهای تماسی به ویژه ۱۲ به همراه پلاسمای بیمار در ۳۷ درجه انکوبه می گرددو بعد از ۳-۵ دقیه کلرور کلسیم به لوله آزمایش اضافه می گردد و زمان لازم برای تولید لخته فیبرینی اندازه گیری می شود. در این آزمایش کمبود تمام فاکتورهای انعقادی بجز ۷ و ۱۳ سبب طولانی شدن آزمایش می گردد. اساس اندازه گیری زمان PTT و aPTT مشابه است ولی با توجه به اینکه مواد فعال کننده به aPTT اضافه می شود زمان اندکی کوتاه تر بوده و نتایج تکرارپذیری خوبی دارد. تست PT و PTTو سایر تست‌های انعقادی را می‌توان هم با روش دستی و هم با روش دستگاهی انجام داد که برای این کار از دستگاه کوآگولومتر استفاده می‌شود.

مکانیسم دستگاه‌های آنالایزر انعقاد خون (کوآگولومتر)

آنالایزرهای انعقاد خون کامل برای پایش انعقاد از یکی از چند روش زیر استفاده می‌کنند؛ ایمپدانس، فتومتری، الکترومغناطیس و روش ایمپدانس مکانیکی که از تغییرات ویسکوزیته خون جهت تعیین زمان تشکیل لخته استفاده می‌شود.

ابزارهایی که از روش فتومتریک استفاده می‌کنند معمولاً از یکی از مکانیسم‌های زیر بهره می‌برند:

Scattered Light Detection for Clotting Assay:کدورت حاصل از تشکیل لخته فیبرین اندازه‌گیری می‌شود؛ بدین ترتیب که شدت نور متفرق شده به علت لخته اندازه‌گیری می‌گردد. طول‌موج نور معمولاً ۶۶۰ است.

Transmitted Light Detection for Chromogenic Assay:ترکیبات رنگی می‌توانند جذب نوری را تغییر دهند که این تغییرات نور گزارش می‌شود و زمان تغییرات در جذب نور برحسب دقیقه حساب می‌شود.

Transmitted Light Detection for immune Assay:واکنش Ag-Ab می‌تواند سبب تغییر در جذب نور شود. این تغییر در جذب نوری برحسب دقیقه محاسبه می‌شود.

Nephlometry

ابزارهایی که از روش فتومتریک استفاده می‌کنند تغییر در دانسیته نمونه را تا تعیین شروع لخته پایش می‌کنند. نمونه در یک کووت قرار داده می‌شود و یک اشعه نور که توسط Collimator فوکوس شده است از میان نمونه تا فتودتکتور عبور داده می‌شود. هنگامی که لخته تشکیل می‌شود، فتودتکتور افزایش دانسیته نوری را با اندازه‌گیری کاهش Transmittanceتعیین کرده و سیگنال‌ها شروع پروسه تشکیل لخته را مشخص می‌کنند.

کنترل کیفی:

نتایج PT و APTT توسط یکسری عوامل پس از آنالیز همچون نحوه جمع‌آوری نمونه، خصوصیات سطحی ظرف نمونه‌برداری، نوع ضدانعقاد مصرفی، نحوه ذخیره‌سازی نمونه و عوامل آنالیتیک همچون دما، زمان انکوباسیون، زمان تماس با ماده فعال‌کننده سطحی، نوع معرف‌ها و نحوه بررسی اتمام کار تحت‌تأثیر قرار می‌گیرند. نمونه های شدیدا لیپمیک و ایکتر در برخی از دستگاه های کوآگلومتر که اساس فتومتری دارند می تواند ایجاد تداخل کند.

نمونه‌گیری:

نمونه‌گیری باید توسط یک فرد باتجربه و در شرایط آرامش کافی گرفته شود زیرا استرس و تمرین بدنی (ورزش) باعث افزایش فاکتور ۸ و Vwf و فیبرینولیز می‌شود. نمونه‌گیری باید ساده باشد و بدون فشار سرنگ از خون پر شود. انسداد رگ سبب آزاد شدن پلاکت، افزایش فعالیت فیبرینولیتیک و فعال شدن بعضی از فاکتورهای انعقاد می‌شود. گرفتن نمونه

ازIV Line و کاتتر ممنوع است؛ به علت رقیق شدن نمونه و تداخل با هپارین. برای به حداقل رساندن اثرات فعال شدن تماسی، باید سرنگ مورداستفاده از پلاستیک باکیفیت بالا و پلی‌پروپین باشد. خون باید در زمان نمونه‌گیری با ضدانعقاد مخلوط شود و سپس چند بار لوله سروته شود. نمونه‌گیری باید سریع و با سرنگ و نیدل مناسب (G21) انجام شود. اگر قبل از خشک شدن الکل اقدام به نمونه‌گیری شود همولیز ایجاد می‌شود و نمونه فاقد ارزش است. نمونه مورداستفاده برای تست انعقادی قبل از جدا کردن پلاسما، نباید در یخچال بماند. برای اکثر تست‌های انعقادی لازم است پلاسما در کمتر از یک ساعت پس از نمونه‌گیری از گلبول‌ها جدا گردیده و به‌سرعت آزمایش شود (برای فاکتورهای ناپایدار باید زودتر این کار صورت گیرد). ماندن پلاسما در حرارت اتاق باعث تخریب فاکتورهای انعقادی و کاهش فعالیت آن‌ها می‌شود. پلاسما پس از جدا شدن بایستی در لوله درب بسته در یخچال نگهداری شود. در صورت بازماندن درب ظروف محتوی پلاسما، تغییر PH باعث ایجاد خطا می‌گردد. وجود همولیز در نمونه می تواند باعث کوتاه شدن زمان PT شود. بهترین زمان برای نمونه‌گیری تست انعقادی صبح است ولی نمونه‌گیری بستگی به رژیم دارویی (ضد انعقاد) مریض دارد. در رابطه با میزان پایداری نمونه های گرفته شده برای تست های انعقادی به بروشور کیتها مراجعه گردد اما توصیه می شود تستهای انعقادی حدکثر تا ۴ ساعت انجام گیرد.

ضد انعقاد:

ضد انعقاد برای تست‌های انعقادی تری‌سدیم سیترات gr/L 32است. بقیه ضدانعقادها پذیرفتنی نیست. فاکتور ۵ و ۸ در اگزالات ناپایدار است و هپارین و EDTA نیز مکانیسم انعقاد را مختل می‌کنند. مزیت دیگر تری‌سدیم سیترات این است که Ca به‌صورت سریع در توسط سیترات شلاته می‌شود. برای تست‌های انعقادی روتین، ۹ حجم از خون با ۱ حجم از ضدانعقاد مخلوط می‌شود (۰/۲ میلی‌لیتر برای ۱,۸ سی سی نمونه). اضافه شدن خون به ضدانعقاد باید در یک دقیقه صورت بگیرد و بعد از اضافه شدن باید حداقل ۴ تا ۶ بار لوله به‌آرامی تکان داده شده و سروته شود. برای هماتوکریت های غیر طبیعی حجم سیترات مورد نیاز به ازای هر سی سی خون از فرمول زیر قابل محاسبه است

$$\frac{100 - HCT}{595 - HCT}$$

سانتریفیوژ نمونه:

اکثر تست‌های انعقادی روی پلاسمای با حداقل پلاکت (PPP) انجام می‌شود که به‌وسیله سانتریفیوژ در دور g1500-2500(به بروشور مربوطه مراجعه گردد) برای ۱۵ دقیقه تهیه شده است.

سانتریفیوژ مورداستفاده برای تست انعقادی باید کالیبر باشد و تمام معیارهای لازم که در کنترل کیفی سانتریفیوژ آمده است را دارا باشد.

نکات قابل‌توجه هنگام انجام تست‌های PTوAPTT

دستورالعمل تولیدکنندگان: این دستورالعمل‌ها باید همراه کیت باشد و کاملاً می‌بایست از آن‌ها پیروی کرد. پرسنل انجام دهنده باید کاملا نسبت به بروشور مسلط بوده و بر اساس آن عمل کند.

تغییرات قابل‌قبول: خطاهای آنالیتیکال در اثر عوامل تداخلی می‌توانند روی نتایج PT اثر بگذارند. با توجه به این خطاها (آنالیتیکال) جهت قابل‌قبول بودن نتایج می‌بایست میزان CV روزانه کمتر از ۵٪ باشد.

خصوصیات آب مورداستفاده:آب مورداستـــــفاده می‌بایست شرایط موجود در NCCLS (C3-A2) را دارا باشد.

غلظت یون کلسیم:غلظت یون کلسیم می‌بایست طبق دستورالعمل سازنده باشد ولی معمولاً غلظت استفاده در تست انعقادی ۰/۰۲۵ مولار می‌باشد.

شرایط وسایل مورداستفاده:درصورتی‌که نتایج کنترل‌ها خارج از محدوده تعیین‌شده باشد می‌بایستی همگی مراحل شامل معرف‌ها، پلاسمای کنترل و وسایل از لحاظ کارایی ارزیابی شوند.

INR بیماران را می توان از فرمول زیر محاسبه کرد.

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

میزان ISI هر چقدر به عدد یک نزدیک باشد نشانگر اینست که معرف PT به ترومبوپلاستین WHO نزدیکتر بوده و حساستر است. توصیه می گردد از معرف ها با ISI بیش از ۲ استفاده نگردد.

جمع‌آوری، حمل‌ونقل و نگهداری پلاسمای کنترل:

استفاده از استانداردهای مرجع بین‌المللی و کنترل های تجاری جهت کنترل و کالیبر تست انعقادی ارجحیت دارد.

در صورت عدم دسترسی به استاندارد بین‌المللی می‌توان پلاسمای خون ۲۰ فرد نرمال (ترجیحاً مرد ۴۰-۲۰ ساله نرمال و بدون مشکل انعقادی ولی اگر زن باشد باید داروی ضدحاملگی استفاده نکند) را با هم mix کرد (۲۰ نفر برای داشتن فعالیت انعقادی ۱۰۰٪ می‌باشد) و بعد از چک کردن از نظر آلودگی به کار برد.

باید برای بدست آوردن عدد Pooled Serum حداقل ۲۰ بار روی آن با روش مرجع PT انجام داد و بعد آن را در ۷۰- فریز کرد.

اگر پلاسمای کنترل توسط آزمایشگاه تهیه شود می‌بایست همانند پلاسمای مورداستفاده درست با آن عمل شود یعنی از همان ضدانعقاد و به همان میزان به خون افزوده شود و شرایط حمل و نگهداری آن مشابه پلاسمای بیماران باشد.

تفاوت انجام تست‌های کنترل: کنترل را می‌بایست در روز ابتدای انجام آزمایش و یا در حین آزمایش انجام داد. همچنین با تغییر ویال مصرفی و یا تغییرات اساسی در وسایل (مثل تغییر سمپلر، پیپت) می‌بایست کنترل مجدداً انجام بگیرد. در صورت بالا بودن حجم کاری آزمایشگاه می‌بایست حداقل پس از هر ۴۰ تست، یک‌بار کنترل گذاشت (یک کنترل نرمال و یک کنترل غیرطبیعی)

تکرارپذیری تست دوتایی NCCLS: می‌گوید: میزان تفاوت نتایج دوتایی بین دو کنترل نباید بیش از ۱۰٪ باشد، البته نظر آزمایشگاه رفرنس ایران (پائیز ۸۶) نیز همین است. بعضی از مراجع میزان تفاوت مجاز جواب‌ها بین دو بیمار باسابقه مصرف وارفارین جهت آزمایش PT را حداکثر ۱ ثانیه و برای بیماران بدون مصرف ضد انعقاد، ۰/۵ثانیه می‌دانند.

محدوده مرجع:محدوده مرجع می‌بایست طبق سند C28-A NCCLS در آزمایشگاه تعیین شود.

کنترل کیفی عمومی:

نتایج کنترل کیفی می‌بایست هر روز توسط افراد ورزیده از جهت بررسی Shift نتایج کنترل یا اعداد خارج از محدوده کنترل بررسی شود. نگهداری تمامی محلول‌ها و وسایل می‌بایست طبق توصیه سازندگان دستگاه صورت گیرد.

همچنین نتایج کنترل کیفی می‌بایست حداقل ماهی یک‌بار بازنگری شوند تا نتایج از نظر تغییرات بلندمدت نیز بررسی گردند. آزمایشگاه می‌بایست در برنامه‌های کنترل کیفی که توسط سازمان‌های معتبر تدارک دیده می‌شود، مستمراً شرکت جوید. همچنین می‌بایست شماره سریال تمامی معرف‌ها و مواد مصرفی نیز در محل مطمئنی ثبت گردد.

محاسبه SD و رسم نمودار کنترل کیفی آزمایش های انعقادی

برای تهیه پلاسمای پولد در حجم انبوه به شیوه زیر عمل می گردد حداقل ۲۰ نمونه نرمال (پلاسمای مرد و زن با شرایط مناسب از جمله زنان غیربارادار و افراد بدون مشگل انعقادی و غیر سیگاری) را جمع آوری کرده و پس از سانتریفیوژ پلاسمای آنها جدا گردد و در لوله پلاستیکی ریخته شود و سپس این پلاسماها در فریزر -۷۰ منجمد شده و زمانی که میزان آنها به حجم مورد نظر رسیده همگی آنها را در دمای ۳۷ ذوب کرده و مخلوط نموده و مجددا سانتریفیوژ نمایید.سپس در مقادیر کم تقسیم نموده و در فریزر -۷۰ نگهداری کنید. ذوب و انجماد مکرر سبب کاهش کیفیت نمونه ها می شود.

توصیه می گردد موقع خارج کردن از فریزر سریعا پلاسما به دمای ۳۷ درجه برسد تا فاکتورهای انعقادی به صورت کرایو رسوب نکنند.

برای به دست آوردن پلاسمای پولد غیر طبیعی می توان پلاسمای پولد نرمال را به نسبت ۱ به ۳ با بافر فسفات سالین با PH=7.2رقیق نمود. این نمونه ها را می توان در دمای −۲۰ به مدت ۲ هفته یا در −۷۰ به مدت ۶ماه ذخیره نمود.

پس از محاسبه میانگین و انحراف معیار ,مقادیر ۱±SD ,±2SD,±3SDبرای هرپارامتر بر روی محور عمودی و روزها بر روی محور افقی ثبت می گردد.

تفسیر نمودار کنترل کیفیت با استفاده از قوانین وستگارد ,لوی جنینگ و یا سازمان بهداشت جهانی بر اساس طراحی کنترل کیفی در آزمایشگاه صورت می گیرد.

لازم به ذکر است که در آزمایشگاه هایی که تعداد نمونه های روزانه آنها زیاد است,بایستی به ازای هر ۲۰ نمونه یا هر ۴۰ نمونه , یک نمونه کنترل, آزمایش شود و بطور روزانه و به ازای هر داده این تفسیر صورت پذیرد.

ضمنا پیشنهاد می شود تا مواد , کالیبراتورها و سایر معرف ها برای دستیابی به نتایج صحصح تر , حداقل برای شش ماه تهیه شود. برای بررسی تکرارپذیری دستگاه, در پایان هر ماه می توان با استفاده از داده های نمونه کنترل روزانه , میانگینCV, SD را محاسبه نمود.

رتیکولوسیت:

برای گزارش میزان درصد رتیکولوسیت در خون محیطی فرمول های زیر مد نظر قرار گیرد .

$$\text{Absolute count} = \text{Retic \%} * \text{RBC count}$$

$$Retic\ Index = \frac{Retic\% * Patient\ Hct}{0.45}$$

$$\textbf{Retic Production Index} = \frac{\textbf{Retic\%}}{\textbf{Maturation Day}} * \frac{\textbf{patient Hct}}{\textbf{0.45}}$$

Maturation Day
1 day when Hct : 45
1.5 day when Hct : 35
2 day when Hct : 25
2.5 day when Hct : 20

برای شمارش رتیکولوسیت توصیه می گردد حداقل ۱۰۰۰ عدد RBC شمرده شده و درصد رتیکولوسیت مشخص گردد.

سلول های رتیکولوسیت اندکی بزرگتر از گلبول های قرمز بوده و حداقل دو عدد گرانول مشخص باید داشته باشند

(without requiring fine focus microscope adjustment on the individual cell to confirm their presence).

بسته به میزان بلوغ رتیکولوسیت ها گرانول های داخل رتیکولوسیتها می تواند از یک یا چند Clump درشت در مراحل اولیه (stage1) تا دانه های بسیار ریز در مراحل نهایی دیده شود.

روش اندازه گیری حجم سلول‌های متراکم شده به روش میکروهماتوکریت PCV نسبت حجم گلبولهای قرمز متراکم شده به حجم خون کامل است. این نسبت پس از سانتریفوژ مناسب نمونهٔ خون به دست آمده و ترجیحا به صورت اعشاری گزارش می شود (مانند ۰/۴۲ به جای ۴۲ .)٪ روش مرجع اندازه گیری حجم سلولهای متراکم شده، روش میکروهماتوکریت است که برای کالیبراسیون دستگاههای شمارنده نیز استفاده می شود. نکته های مهم در آزمایش اندازه گیری حجم گلبولهای قرمز متراکم شده انجام آزمایش با استفاده از خون مویرگی، شریانی و وریدی امکان پذیر است. در جمع آوری نمونه به طریق مویرگی، از لوله های هپارینه حاوی حداکثر ۷ واحد هپارین به ازای هر لولهٔ موئینه استفاده می شود. می توان نمونه را پس از جمع آوری در دمای اتاق نگهداری و حداکثر در مدت ۶ ساعت پس از نمونه گیری آزمایش نمود. نمونه ها باید به روش دوتایی آزمایش شوند. مقدار هماتوکریت نمونه های دوتایی نباید بیش از ۰/۰۰۵(۰/۵)٪ با یکدیگر اختالف داشته باشند. درصورت انجام این آزمایش، به منظور کالیبراسیون دستگاه شمارنده فقط باید از ضدانعقاد K2 استفاده شود تا از چروکیدگی گلبولهای قرمز جلوگیری شود. استفاده از K3 -EDTA به علت ایجاد چروکیدگی در گلبول های قرمز میزان MCV را ۲% ضدانعقادEDTA کاهش می دهد. درصورت استفاده از ضدانعقاد مایع، ضریب رقت باید محاسبه شود. توصیه می شود برای انجام آزمایش کالیبراسیون دستگاه شمارنده از لوله های موئینه با حلقهٔ آبی (بدون ضدانعقاد) استفاده شود. هنگام خواندن نتیجه با خط کش مخصوص، مقدار بافی‌کوت درنظر گرفته نشود. خطای قابل قبول اندازه گیری حجم سلولهای متراکم شده به روش میکروهماتوکریت ۱ ±٪است.

روش آزمایش

۲/۳ تا ۳/۴ طول لولهٔ میکروهماتوکریت باید از خون کامل، که پیش از آن حداقل ۸ بار سروته شده است، پر و با خمیر مخصوص مسدود شود. طول خمیر نباید از ۴ mmکمتر و سطح آن نیز باید کاملا صاف باشد. از هر نمونهٔ خون باید دو لوله به این روش پرشده و روبه روی هم در دستگاه میکروهماتوکریت قرارگیرد. با تنظیم زمان سنج دستگاه سانتریفوژ نمونه ها انجام شده و پس از طی مدت تعیین شده نتیجهٔ آزمایش حداکثر ۱۰ دقیقه پس از توقف دستگاه و با استفاده از

خط کش هماتوکریت خوانده می شود. با گذشت زمان و باقیماندن لوله ها به صورت افقی، حد فاصل پلاسما و سلول به تدریج شیب دار و خواندن نتیجه با مشکل مواجه می شود.

منابع خطا

توقف جریان خون به علت بستن طولانی تورنیکه که باعث افزایش غلظت خون میشود؛

خونگیری های سخت و طولانی به دلیل ورود مایع بین بافتی به فضای داخل عروقی که باعث رقیق یا لخته شدن خون می شود؛

همولیز در اثر استفاده از سرسوزن نازک؛

مخلوط نشدن نمونه با ضدانعقاد؛

پر یا مسدودکردن نادرست انتهای لولهٔ هماتوکریت؛

مسدودکردن انتهای لوله با حرارت؛

خطای دید هنگام خواندن نتیجهٔ آزمایش؛

محاسبهٔ بافی‌کوت به عنوان جزیی از ستون گلبولهای قرمز هنگام خواندن نتیجهٔ آزمایش؛

خطای به دام افتادن پلاسما که این مورد در آنمی های ماکروسیتیک در اسفروسیتوز، تاالسمی و آنمی سیکل سل زیاد است. در حالت طبیعی، میزان پلاسمای به دام افتاده ۱ ٪ تا ۳ ٪ است که هنگام کالیبراسیون دستگاه شمارنده باید ۲ ٪درنظر گرفته شود.

جدول شمارهٔ ۱۱: علل کاهش و افزایش کاذب هماتوکریت

علل کاهش کاذب میزان هماتوکریت	علل افزایش کاذب میزان هماتوکریت
EDTA اضافی	هیپوناترمی
همولیز	به‌دام افتادن پلاسما
هیپرناترمی	

ویژگی‌های دستگاه میکروهماتوکریت استاندارد

- شعاع چرخش بیشتر از ۸cm؛
- توانایی رسیدن به حداکثر سرعت در ۳۰ ثانیه؛
- توانایی ایجاد RCF حدود ۱۰۰۰۰g تا ۱۲۰۰۰g در محیط، حداقل به‌مدت ۵ دقیقه بدون افزایش دما از ۴۵°C؛
- داشتن زمان‌سنج خودکار(با قابلیت تنظیم حداقل ۳۰ ثانیه).

$$RCF = ۱/۱۱۸ \times ۱۰^{-۵} \times r \times RPM^{۲}$$

دستگاه میکروهماتوکریت باید توانایی ایجاد حداقل نیرویی برابر با ۱۰۰۰۰ g به مدت ۵ دقیقه را دارا باشد.

کنترل کیفیت دستگاه باید هر سه ماه انجام شـود. برای انجـام این کـار بررسی موارد زیر ضروری است:

- سرعت سانتریفوژ،
- زمان سنج
- حداکثر توان در تجمع سلولها (ین مورد پس از خرید و پیش از شروع به کار با دستگاه و حداقل هر ۶ ماه یک‌بار باید انجام شود).

سرعت سانتریفیوژ (دور در دقیقه) و عملکرد زمانسنج دستگاه به ترتیب با تاکومتر کالیبره و کرونومتر ارزیابی می شوند.

برای بررسی حداکثر توان دستگاه در تجمع سلولها از خون تازه استفاده میشود.

برای انجام این امر دو نمونه خون تازه حاوی ضدانعقاد EDTA دی پتاسیک که به خوبی مخلوط شده اند را به صورت دوتایی به مدت دو دقیقه سانتریفوژکرده و مقادیر PCV آنها ثبت می شود. سپس، زمان سانتریفوژ را ۳۰ ثانیه به ۳۰ ثانیه افزوده تا زمانی که میزان دو هماتوکریت اندازه گیری شدهٔ پی درپی بدون تغییر بماند. این زمان به عنوان حداقل زمان لازم برای متراکم نمودن گلبول های قرمز درنظر گرفته می شود. این آزمایش بهتر است حداقل با یک نمونه دارای هماتوکریت ۰/۵(۵۰)٪ یا بیشتر نیز انجام شود.

ارزیابی عملکرد دستگاه میکروهماتوکریت به روش توصیه شدهٔ سازمان جهانی بهداشت به صورت زیر انجام می شود:

چند نمونه خون با هماتوکریت کمتر از ۰/۵ و حاوی ضدانعقاد EDTA دی پتاسیک 1.5 mg برای هر میلی لیتر خون (را پس از بیست بار سروته نمودن ظرف نمونه، به صورت دوتایی به مدت ۳ ،۵ ،۷ ،۹ و ۱۱ دقیقه سانتریفوژ کرده و سپس نتایج آنها ثبت می شود. درصورت مناسب بودن توان دستگاه (برحسب g)، نتایج باید از دقیقهٔ ۵ به بعد بدون تغییر بماند.

راهنمای کمیته استانداردسازی هماتولوژی (ICSH) در گزارش مرفولوژی

(1)

دکتر حبیب‌اله گل‌افشان

با توجه به اینکه سیستم نمره‌دهی یا درجه‌بندی شدت ناهنجاری گلبول‌های قرمز و سفید در بسیاری از آزمایشگاه‌ها سلیقه‌ای است، ازاین‌رو با در نظر گرفتن اهمیت بالینی این ناهنجاری‌ها، گروه استانداردسازی در هماتولوژی (ICSH) با استفاده از تجارب متخصصین مرفولوژی و پاتولوژی و علوم آزمایشگاهی، اقدام به تهیه یک راهنما برای گزارش درجه و یکسان‌سازی نامگذاری مرفولوژی نموده است. در این نوشتار به اهمیت بالینی برخی از ناهنجاری‌های مرفولوژی اشاره می‌گردد و شیوه گزارش مرفولوژی بر اساس خفیف (+) Few، متوسط (++) Moderate و شدید (+++) Marked، طبق جدول ارائه می‌گردد. سفارش می‌شود که برای دست‌یابی به درصد یک مرفولوژی سلول غیرنرمال، 1000 سلول مورد ارزیابی قرار گیرد.

در این نوشتار نیز سعی شده است که اخطار آنالیزورها (Flags) برای اپراتورها و شیوه برطرف کردن اخطار و نیز چگونگی مطالعه گستره محیط در رابطه با اخطارهای مرفولوژی موردتوجه قرار گیرد. هرگونه اخطار مرفولوژی آنالیزور بایستی با ارزیابی گستره محیطی همراه گردد.

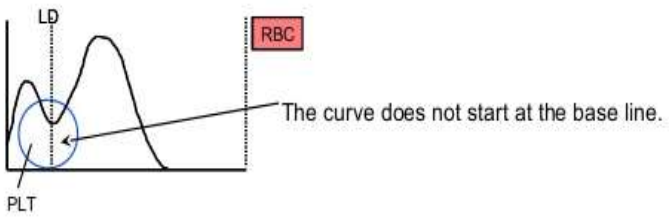
با وجود پیشرفت‌های تکنولوژی در زمینه‌ی ساخت آنالیزورهای خون‌شناسی، هنوز مطالعه گستره محیطی سنگ بنای تشخیص بیماری‌های خون است و یافته‌های آنالیزور بایستی با یافته‌های خون محیطی مورد تأیید قرار گیرد. شیوه درجه‌بندی (grading Level) مرفولوژی‌های غیرطبیعی گلبول‌های قرمز و سفید در آزمایشگاه‌های مختلف قانونمند نبوده و سلیقه‌ای عمل می‌گردد. درجه‌بندی براساس تعیین درصد گلبول‌های غیرنرمال در میان جمعیت نرمال است و گفتنی است که حتی در میان کتاب‌های مرجع خون‌شناسی (text book)، شیوه‌های مختلف و غیریکنواخت برای گزارش مرفولوژی وجود دارد؛ برای مثال در یک مرجع یک مرفولوژی غیرطبیعی 2 تا 5% به‌عنوان اندک (slight)،6 تا 15% متوسط و بیشتر از 16 درصد به‌عنوان شدید (marked) آمده است، درحالی‌که در رفرانس دیگر یک مرفولوژی غیرطبیعی بین 6 تا 10 درصد با علامت + و بین 10 تا 25 درصد 2+و بین 25 تا 50 با 3+و بیشتر از 50 درصد به‌صورت 4+ گزارش می‌گردد و گاهی مقادیر کم مرفولوژی با لغت نایاب (Rare) و گاه (Occasional) گزارش می‌گردد.

گزارش شدت درجه یک مرفولوژی ویژه ممکن است در رابطه با طول دوره بیماری و یا ناشی از شیوه وراثت آن باشد و برای هر مرفولوژی شیوه گزارش متفاوت است، برای مثال گلبول‌های قرمز شکسته یا شیستوسیت کمتر از یک درصد نرمال تلقی می‌گردد، درحالی‌که حضور بیشتر از یک درصد در همراهی با کاهش شمارش پلاکت و نبود مرفولوژی دیگر هرگز نبایستی نادیده گرفته شود، زیرا ممکن است در زمینه بیماری‌های اورژانس همچون انعقاد داخل عروقی منتشره و میکروآنژیوپاتی ترومبوتیک باشد و حتی در این موارد گزارش درصد شیستوسیت‌ها برای پیگیری درمان سودمند است. برخی از آنالیزورهای خون‌شناسی، گلبول‌های شکسته را از روی اخطار شروع طرف چپ هیستوگرام گلبول‌های قرمز که بالای محور x قرار می‌گیرد مورد شناسایی قرار می‌دهند.

medianews.ir

Erythrocyte-Histogram Flagging

Mark " RL ", abnormal height at lower discriminator



Possible causes:

- Giant Platelets
- Micro-Erythrocytes
- Platelet Clumps

در حضور گلبول‌های قرمز شکسته، لبه‌ی هیستوگرام گلبول‌های قرمز در سمت چپ از خط پایه شروع نمی‌شود

مشاهده شیستوسیت در همراهی با الیپتوسیتوز همولیتیک یا پیروپویکیلوسیتوز گرچه قابل گزارش است ولی به اهمیت کم‌خونی‌های میکروانژیوپاتیک نمی‌باشد. در این حالت گلبول‌های شکسته در میان جمعیت گلبول‌های نرمال ظاهر می‌گردند که بسیار حائز اهمیت است.

مرفولوژی‌های الیپتوسیت/ اوالوسیت از مرفولوژی‌های شایع است و در برخی از کتاب‌های مرجع تا کمتر از 10 تا 15 درصد نرمال تلقی می‌شود، درحالی‌که گزارش‌های اخیر بیشتر از 5 درصد را نرمال تلقی نمی‌کند. در الیپتوسیتوز ارثی بیشتر از 25 تا 75 الی 100 درصد از گلبول‌های قرمز به‌صورت الیپتوسیت یا اوالوسیت هستند.

مرفولوژی الیپتوسیت ممکن است در زمینه کم‌خونی فقر آهن، کم‌خونی مگالوبلاستیک و بدخیمی‌های متاستازدهنده به مغز استخوان همراه با گلبول‌های قطره اشکی یافت شود، ازاین‌رو گزارش این مرفولوژی در رابطه با یافته‌های دیگر اهمیت می‌یابد، برای مثال مرفولوژی الیپتوسیت همراه با گلبول‌های شکسته، الیپتوسیت‌های شکسته و اسفروسیت گویای الیپتوسیت همولیتیک است که ممکن است نیاز به برداشتن طحال داشته باشد.

مرفولوژی رولکس در رابطه با افزایش هموگلوبین‌ها و فیبرینوژن است که شاهد بهم چسبیدن گلبول‌های قرمز مثل ستون سکه در سرتاسر گستره محیطی هستیم. گزارش رولکس از درجه slight (ملایم) تا متوسط و شدید در رابطه با غلظت پروتئین‌ها و میزان ESR متفاوت است، ولی باید در نظر داشت که در بیماران کم‌خون مشاهده خفیف رولکس به علت کاهش تعداد گلبول‌های قرمز و تمایل آنها به چسبیدن به یکدیگر نرمال تلقی می‌گردد.

در گزارش مرفولوژی اسفروسیت، مشاهده اسفروسیت‌های هم‌اندازه، ارثی بودن را مطرح می‌کند که در اغلب موارد با MCV در طیف نرمال و افزایش MCHC همراه است، درحالی‌که مشاهده اسفروسیت در اندازه‌های گوناگون امکان کم‌خونی آتوایمیون را مطرح می‌کند.

medlabnews

تارگت سل شبیه به چشم جغد در موارد مختلفی مشاهده می‌شود؛ تارگت سل ممکن است در تالاسمی و آنمی فقر آهن به‌صورت میکروسیتیک و در هموگلوبینوپاتی‌های داسی و C و E به‌صورت نرموسیت و در بیماری‌های کبدی به علت توسعه غشا و انباشت آن از چربی به‌صورت ماکروسیت مشاهده شود. در گزارش تارگت بایستی دقت کرد زیرا می‌تواند به‌صورت آرتیفکت ناشی از دیر خشک شدن گستره محیطی یا افزایش نسبت ضدانعقاد به خون باشد.

گزارش آکانتوسیت ممکن است ارزش تشخیصی برای بیماری‌های کبدی، سوءتغذیه و کم‌کاری تیروئید داشته باشد و در همراهی با اجسام هاول‌ژولی و تارگت سل، علامت کم‌کاری طحال یا اسپلنکتومی می‌باشد. گاهی با برداشتن طحال در برخی از بیماران، افزایش شمارش لنفوسیت‌ها نمایی شبیه به لوسمی مزمن لنفوسیتیک به خون می‌دهد.

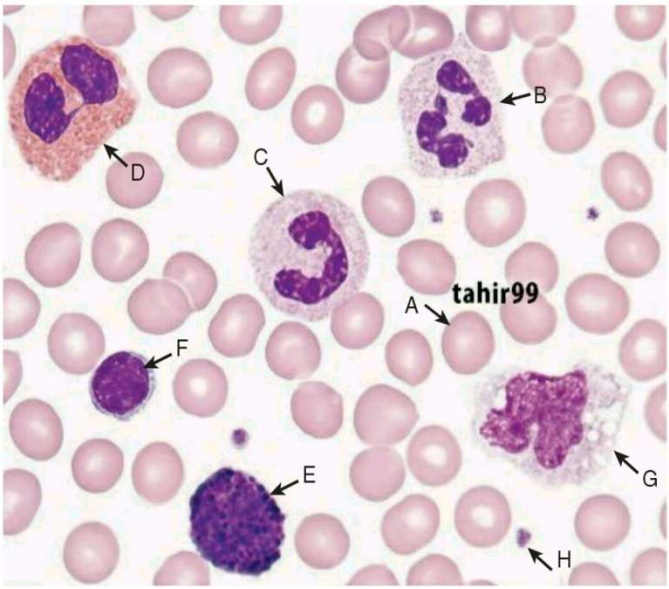
توجه داشته باشید که مرفولوژی طبیعی گلبول‌های قرمز نوزادان دارای تفاوت چشمگیر نسبت به بچه‌ها است. در بچه‌ها و بزرگسالان تا یک درصد گلبول شکسته نرمال است درحالی‌که یک نوزاد ممکن است تا 3 درصد گلبول شکسته، گلبول پلی‌کروماژی، تعدادی اسفروسیت و آکانتوسیت و اجسام هاول‌ژولی را به‌طور طبیعی نشان دهد. گلبول‌های قرمز هسته‌دار بین 3 تا 10 به ازای 100 گلبول سفید تا هفته دوم تولد نرمال قلمداد می‌گردد. گلبول‌های قرمز به‌طور فیزیولوژیک در بدو تولد ماکروسیتیک هستند و MCV بین104 تا 120 فمتولیتر متغیراست.

گزارش درجه هایپوکرومی با توجه به میزان MCH یا با توجه به درصد گلبول‌های قرمزی که قطر هاله مرکزی آنها بیشتر از 1:3 قطر گلبول باشد صورت می‌گیرد. مقدار طبیعی MCH بین 34-27 پیکوگرم است و مقدار 26-22 به‌صورت slight(1+) و بین 21-18 به‌صورت هایپوکروم متوسط (+2) و کمتر از 18 به‌صورت هایپوکروم شدید گزارش 3+ می‌گردد.

مقدار طبیعی MCV در بزرگسالان 99-80 فمتولیتر است و بین 79-70 و 69-60 و کمتر از 60 به ترتیب با درجه میکروسیت خفیف (slight) و متوسط و شدید و یا با علامت + و ++ و +++ درجه‌بندی می‌گردند. میزان MCV بین110-100 و 125-111 و بیشتر از 125 به ترتیب ماکروسیت خفیف و متوسط و شدید یا با علائم + و ++ و +++ درجه ماکروسیت گزارش می‌شوند.

چنانچه هسته لنفوسیت کوچک به‌عنوان راهنمای اندازه‌ی طبیعی گلبول‌های قرمز در نظر گرفته شود، می‌توان در نبود پارامترRDW درجه تغییرات اندازه (Anisocytosis) را با مقایسه سایز گلبول‌های قرمز با هسته لنفوسیت انجام داد و چنانچه بین 11 تا 20 درصد گلبول‌های قرمز دارای تفاوت سایز باشند با علامت 2+ یا متوسط و بیشتر از 20 درصد را به‌صورت 3+ یا شدید گزارش کرد. تفاوت اندازه در کمتر از 10 درصد از گلبول‌های قرمز به‌صورت 1+ گزارش می‌گردد.

medlabnews.ir



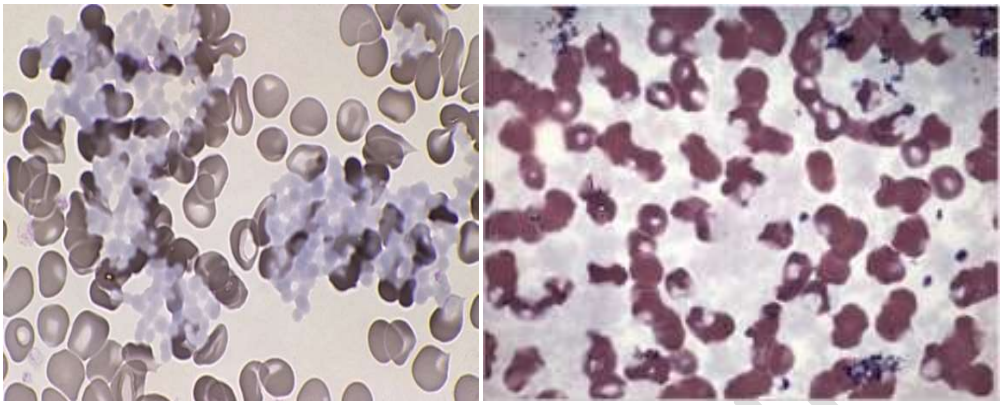
هسته لنفوسیت کوچک (شکل F) راهنمای اندازه طبیعی گلبول‌های قرمز می‌باشد

برای گزارش درجه میکروسیت و ماکروسیت در نبود MCV می‌توان درصد گلبول‌هایی که کوچک‌تر از هسته لنفوسیت هستند را به‌عنوان درصد گلبول‌های میکروسیت و درصد گلبول‌هایی که از هسته لنفوسیت کوچک بزرگترند را به‌عنوان ماکروسیت در نظر گرفت و بین 1 تا 10 درصد و 11 تا 20 درصد و بیشتر از 20 درصد را به‌صورت 1+ و 2+ و 3+ گزارش کرد.

بخش‌های نامنظم گلبول‌های قرمز روی گستره‌ی محیطی

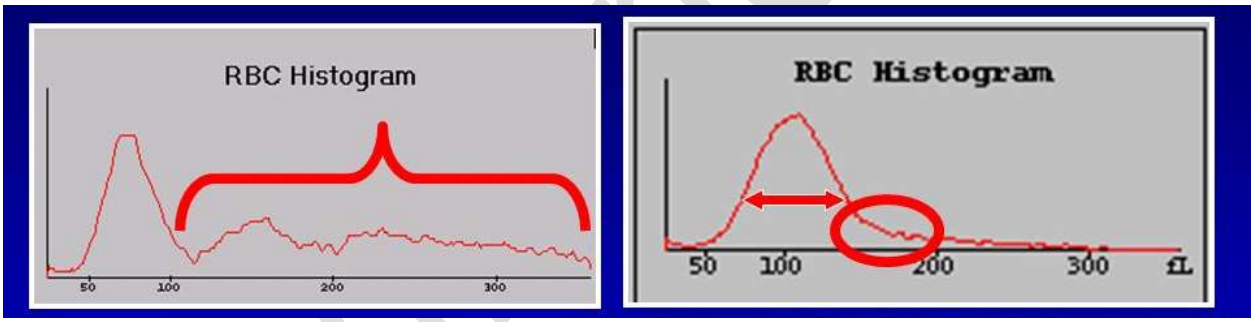
آگلوتیناسیون سرد، رولکس، رسوب کرایو و رشته‌های فیبرین موجب بخش‌های نامنظم سلول‌ها شده و در مواردی با تغییر مرفولوژی گلبول‌های قرمز به‌صورت آرتیفکت همراه می‌شود. رسوب کرایو به‌صورت رسوب گلوبولار نامنظم به‌صورت آبی کمرنگ و یا به‌صورت زمینه‌ای از مواد پروتئینی لابه‌لای گلبول‌های قرمز ممکن است، مشاهده گردد. رسوب کرایوگلوبولینی در هپاتیت C و اختلالات لنفوپرولیفراتیو و بیماری‌های اتوایمیون مشاهده گردیده و گزارش می‌شود.

medlabnews.ir



رسوب کرایو گلوبولین به‌صورت ذرات آمورف به رنگ آبی کم‌رنگ در زمینه گستره

آگلوتیناسون سرد به‌صورت تجمعات خوشه‌ای شکل گلبول‌های قرمز در گستره‌ی محیطی نمایان شده و با خطای افزایش اندکس‌های خونی MCV و MCH وMCHC و کاهش شمارش گلبول‌های قرمز همراه است. شدت آگلوتیناسیون سرد وابسته به عیار آنتی‌بادی سرد و طیف حرارتی آن است.



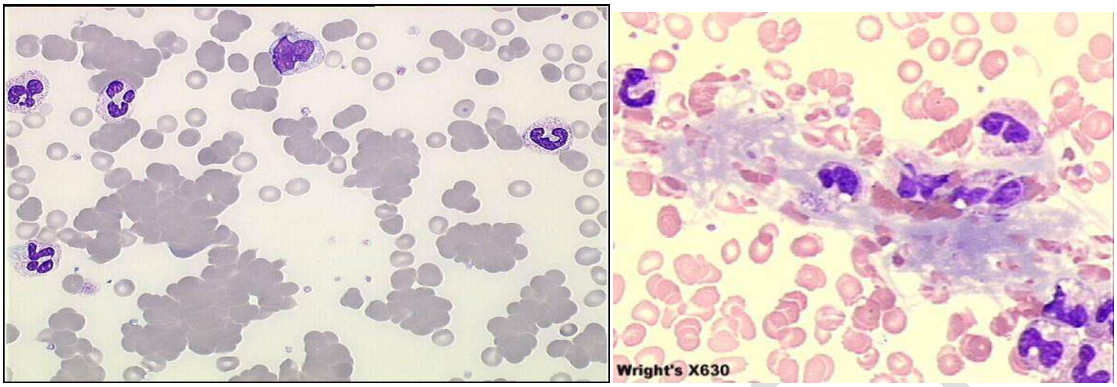
هیستوگرام گلبول‌های قرمز در سمت راست گلبول‌های ماکروسیت و در سمت چپ توده‌های به‌هم چسبیده آگلوتیناسیون سرد در اندازه‌های مختلف را نشان می‌دهد

لنفوم سلول‌های B و عفونت با میکوپلاسما و منونوکلئوز عفونی از مهم‌ترین علل شکل‌گیری آنتی‌کرهای سرد هستند. گلبول‌های قرمز در صورت‌بندی رولکس به‌صورت ستون سکه روی هم قرار می‌گیرند و با افزودن سرم فیزیولوژی به یک قطره خون، تجمعات گلبول پخش می‌گردد. پدیده رولکس ناشی از افزایش پروتئین‌های فاز حاد یا پاراپروتئین‌ها در اختلال پلاسماسل یا لنفوپرولیفراتیو است.

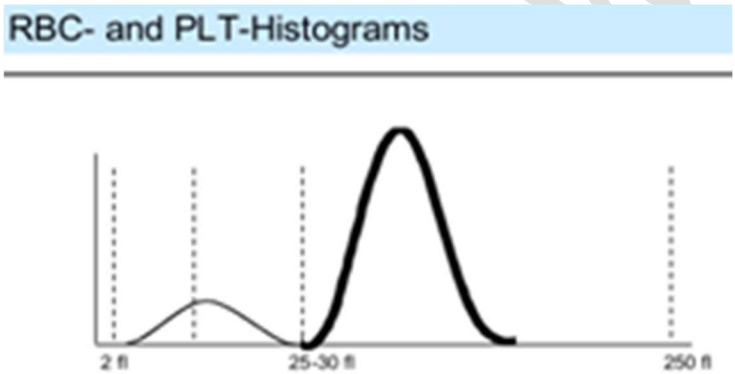
پدیده رولکس با افزایش سرعت رسوب همراه است و چنانچه در حضور این پدیده سرعت رسوب نرمال باشد ممکن است هایپرویسکوسیته پلاسما مانع از رسوب گلبول‌های قرمز شده باشد.

تجمعات رولکس به علت اینکه در رقیق‌کننده‌های آنالیزور پخش می‌گردند موجب خطا در پارامترهای خون نمی‌شوند.

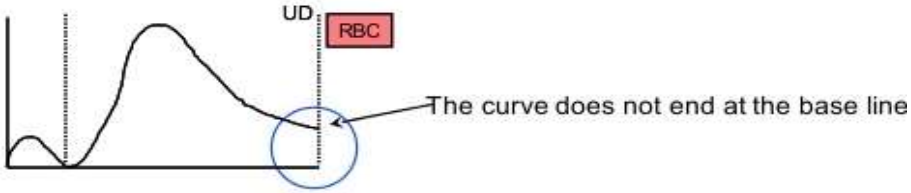
گزارش آگلوتیناسیون سرد و رولکس با درشت‌نمایی 10 یا 40 صورت می‌گیرد و بایستی آنها را از ابتدای منطقه نازک گستره مشاهده کنیم و منطقه ضخیم گستره برای بیمار گزارش نشود.



تصویر سمت راست آگلوتیناسیون سرد و تصویر سمت چپ رسوب فیبرین را نشان می‌دهد



Mark " RU ", abnormal height at the upper discriminator.

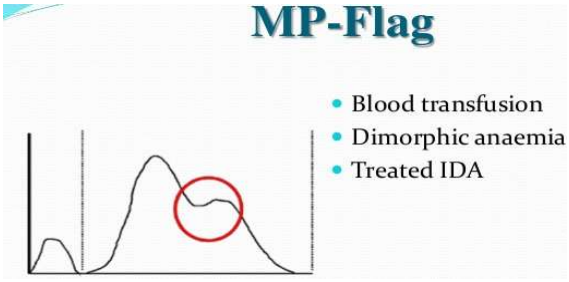


Possible causes:

- Cold Agglutinins (check MCHC > 40 g/dl)
- Erythroblasts / Normoblasts

Note:
The RBC-result and all results marked with " RL " should be reviewed.

اخطار هیستوگرام گلبول‌های قرمز در حضور آگلوتیناسیون سرد یا حضور گلبول‌های قرمز هسته‌دار و یا لکوسیتوز شدید

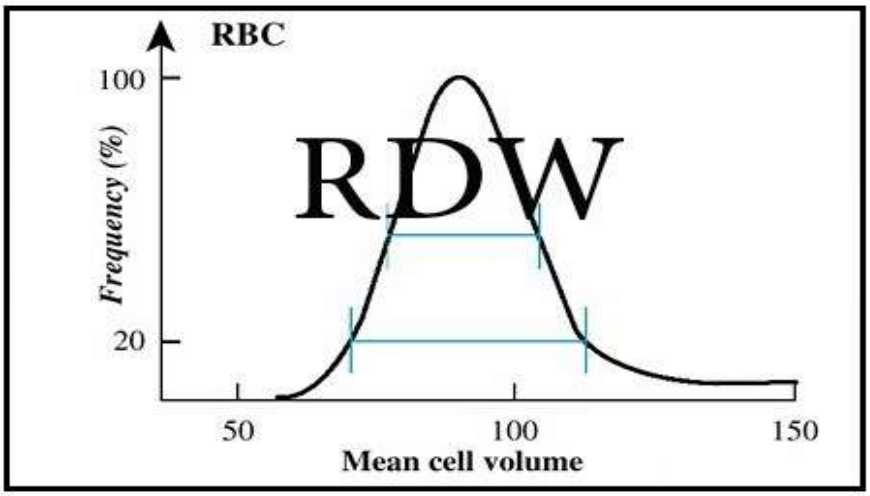


اخطار هیستوگرام گلبول‌های قرمز در حضور دو جمعیت گلبول‌های قرمز با اندازه‌های مختلف

تغییرات اندازه و رنگ گلبول‌های قرمز

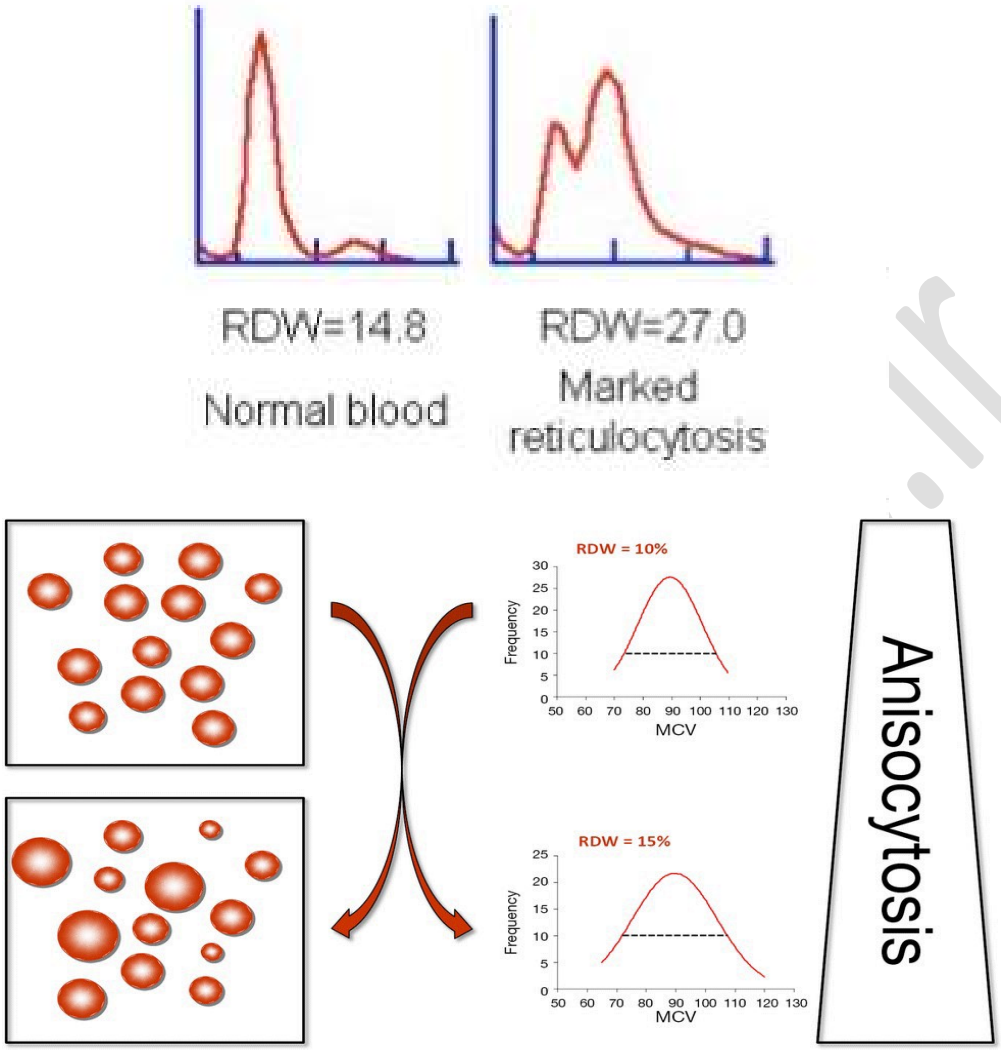
تغییرات اندازه (Anisocytosis) در آنالیزورها با پارامتر RDW-SD (دامنه توزیع حجم) و RDW-CV(دامنه توزیع حجم حول حجم میانگین) گزارش می‌شود.

سفارش می‌شود که درجه تغییرات اندازه براساس گزارش آنالیزور گزارش گردد و در صورت فراهم نبودن آنالیزور با مشاهده گستره اقدام به گزارش درجه آن گردد. مقدار نرمال RDW-CV بین 11 تا 14/5 درصد و مقدار طبیعی RDW-SD بین 3±42fl است.



پهنای خطی که از 20 درصد فراوانی هیستوگرام حجم را قطع می‌کند برابر با دامنه پراکندگی حجم برحسب SD می‌باشد. (RDW-SD)

برای محاسبه‌ی RDW-CV، یک SD از پراکندگی حجم که 68 درصد از گلبول‌ها را دربر می‌گیرد بر MCV تقسیم شده و حاصل در عدد 100 ضرب می‌شود و مقدار طبیعی آن 11 تا 14/5 درصد است

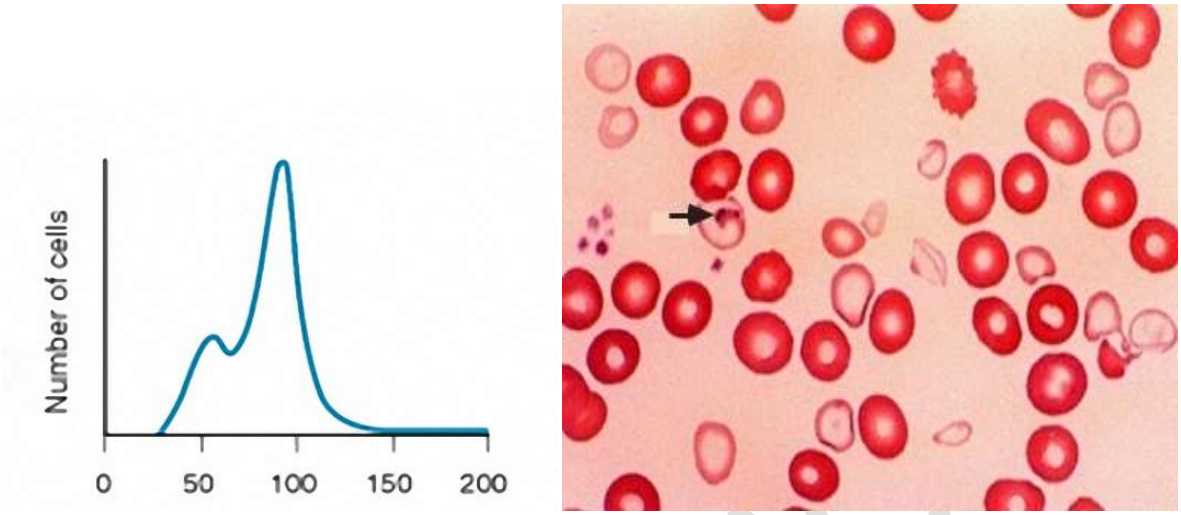


دای‌مرفیسم (Dimorphism)

دای‌مرفیسم اشاره به حضور دو جمعیت جداگانه از گلبول‌های قرمز دارد که به‌آسانی از روی هیستوگرام گلبول‌های قرمز مشاهده شده و موجب افزایش پارامتر RDW می‌گردد. اصطلاح دای‌مرفیسم در بیشتر اوقات با مشاهده گلبول‌های میکروسیت هایپوکروم با جمعیت نرموکروم یا جمعیت ماکروسیت بکار می‌رود. مرفولوژی دای‌مرف ممکن است با همراهی گلبول‌های ماکروسیت و نرموسیت باشد. سفارش می‌شود که در گزارش مرفولوژی دای‌مرفیسم به دو جمعیت مختلف گلبول‌های قرمز اشاره شود.

مرفولوژی دای‌مرفیسم در کم‌خونی سیدروبلاستیک، آنمی فقر آهن در پاسخ به آهن‌درمانی و تزریق خون به بیماری که مرفولوژی میکرو یا ماکرو دارد مشاهده می‌شود.

دایمرف با مخلوط گلبول‌های ماکروسیت و مشاهده تغییرات شبه پلگر در گلبول‌های سفید ممکن است زنگ خطر یا نشانه‌ای از سندرم‌های پیش‌سرطانی باشد.



تصویر دای‌مورفیسم در هیستوگرام و تصویر لام خون محیطی

هایپوکروم

هایپوکروم یا کم‌رنگ شدن گلبول‌های قرمز به حالتی اشاره دارد که قطر هاله‌ی مرکزی بیش از 1:3 قطر گلبول گردد. همگام با افزایش قطر هاله‌ی مرکزی، پارامتر MCH و در موارد شدید پارامتر MCHC نیز کاهش می‌یابد.

غالب موارد بالینی هایپو کروم با میکروسیت شدن گلبول‌های قرمز نیز همراه است. سفارش می‌شود که درجه هایپوکروم با پارامتر MCH هماهنگ باشد. در مواردی که آنالیزور در دسترس نباشد می‌توان با مشاهده گستره محیطی آن را طبق جدول گزارش کرد.

ماکروسیت

گلبول‌های قرمز با قطر بیشتر از 8/5 میکرومتر و MCV بیشتر از 100 فمتولیتر در گروه ماکروسیت جای می‌گیرند. گزارش مرفولوژی ماکروسیت از روی‌داده‌های آنالیزور دقیق‌تر است. گلبول‌های ماکروسیت ممکن است تخم‌مرغی (ماکرواوالوسیت) یا گرد باشند. شکل تخم‌مرغی آن با MCV و MCH بالا و MCHC طبیعی از ویژگی کم‌خونی مگالوبلاستیک است. با دقت در هیستوگرام گلبول‌های قرمز می‌توان گلبول‌های ماکروسیت را از آگلوتیناسیون سرد که هر دو MCV بالای نرمال دارند، تشخیص داد. در آگلوتیناسیون سرد افزایش همزمان MCV و MCH و MCHC مشاهده می‌شود. رتیکولوسیتوز نیز موجب افزایش MCV و مرفولوژی ماکروسیت می‌گردد. توجه به هیستوگرام برای گزارش ماکروسیت گاهی باارزش‌تر از MCV است چون حتی ممکن است در حضور تعدادی از گلبول‌های ماکرواوالوسیت مقدار MCV نرمال گردد. نوزادان در بدو تولد تا حدود یک یا دو هفته دارای مرفولوژی ماکروسیت فیزیولوژیک هستند. برای شیوه‌ی گزارش و درجه‌بندی ماکروسیت و گلبول‌های تخم‌مرغی به جدول توجه کنید.

توجه داشته باشید که در اکثر موارد، حضور ماکروسیت پهنای توزیع حجم (RDW-SD) را افزایش می‌دهد، ولی گاهی ممکن است در این موارد RDW-CV نرمال گزارش گردد. یادآوری می‌شود که در محاسبه‌ی RDW-CV دامنه‌ی

medlabnews

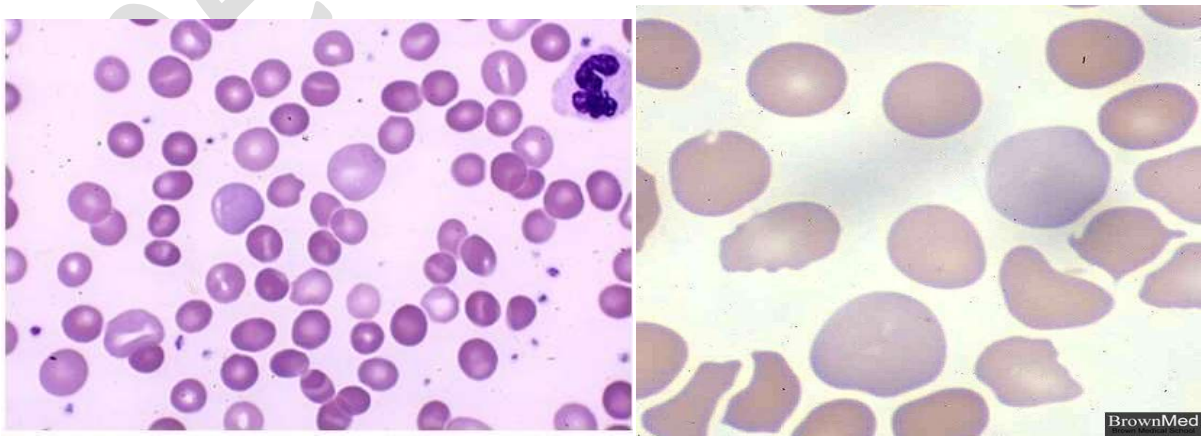
توزیع در یک انحراف معیار بر MCV تقسیم می‌شود و چنانچه همزمان پهنای دامنه‌ی حجم و MCV افزایش یافته باشد، مقدارRDW-CV نرمال می‌شود، درحالی‌که مشاهده‌ی گستره‌ی محیطی تغییرات اندازه را به‌وضوح نشان می‌دهد.

میکروسیت

گلبول‌های قرمز میکروسیت دارای قطر کمتر از 7 میکرومتر و MCV کمتر از 80 فمتولیتر می‌باشند و در اکثر موارد هایپوکروم نیز می‌باشند. پارامتر MCV را بایستی با توجه به سن تفسیر کرد. نوزادان دارای MCV بالا و بچه‌ها دارای MCV کمتر از نرمال هستند. توجه به هیستوگرام حجم برای گزارش درجه‌ی میکروسیت اهمیت دارد، زیرا گاهی در حضور جمعیت میکروسیت ممکن است MCV نرمال گزارش شده باشد. برخی از آنالیزورها درصد گلبول‌های میکرو (کمتر از 60 فمتولیتر) و درصد گلبول‌های هایپو (MCH) کمتر از 17 پیکوگرم را گزارش کرده و فرمول‌هایی برای افتراق آنمی فقر آهن از سندرم‌های تالاسمی ماینور که هر دو نمای میکروسیت و هایپوکروم دارند، ارائه نموده‌اند. گفتنی است که فرمول‌های یادشده تنها جنبه‌ی آکادمیک داشته و برای تشخیص‌های افتراقی نیاز به آزمایش‌های اختصاصی‌تر است. پارامترهای RDW-CV با توجه به اینکه حاصل تقسیم انحراف حجم بر MCV است، ممکن است در شخصی که دامنه توزیع نرمال با کاهش MCV دارد به دلیل کاهش مخرج کسر، به‌طور کاذب افزایش یابد.

گلبول‌های قرمز پلی‌کروماژی

رتیکولوسیت پس از اقامت 72-48 ساعته در مغز استخوان بخشی از رشته‌های خود را از دست داده و از آن پس وارد خون محیطی می‌شود که پس از 24 ساعت با از دست دادن تمام رشته‌ها و ریبوزوم‌ها و میتوکندری به گلبول قرمز مقعرالطرفین با عمر 120 روز تبدیل می‌شود. به رتیکولوسیت‌های نارس که با رنگ‌های رومانوفسکی به رنگ مخلوط قرمز و آبی درمی‌آیند، پلی‌کروماژی گفته می‌شود. حضور این گلبول‌ها بیانگر خونریزی و یا همولیز حاد و مزمن است که نیاز به مطالعه گستره را الزامی می‌کند. گلبول‌های پلی‌کروماژی بزرگ‌تر از گلبول قرمز بوده و فاقد هاله مرکزی هستند. گفتنی است که انکلوزیون حلقه کابوت در این نوع گلبول‌ها را می‌توان به‌راحتی جستجو کرد. سفارش می‌شود که با مشاهده پلی‌کروماژی آن را درجه‌بندی کرده و شمارش رتیکولوسیت را انجام دهیم و در ضمن برای تصحیح شمارش رتیکولوسیت از فرمول RPI (اندکس تولید روزانه رتیکولوسیت) استفاده گردد که زمان بلوغ رتیکولوسیت‌ها را دربر می‌گیرد.



گلبول‌های پلی‌کروماژی در میان جمعیت اسفروسیت در سمت راست و در سمت چپ دو عدد گلبول پلی‌کروماژی واضح دیده می‌شود

medlabnews.ir

۲. کالیبراسیون دستگاه‌های خودکار شمارندهٔ سلولی

کالیبراسیون به مجموعه فعالیت‌هایی اطلاق می‌شود که ارتباط میان مقادیر اندازه‌گیری‌شدهٔ یک کمیت توسط یک دستگاه یا روش آزمایشگاهی را با مقادیر واقعی آن ماده، که با روش‌های مرجع اندازه‌گیری شده‌است، مشخص می‌نماید. کالیبراتور ماده‌ای است که برای کالیبراسیون روش آزمایشگاهی به‌کار می‌رود و مقدار مشخصی دارد، درحالی که مواد کنترلی باید برای کنترل کیفیت روش آزمایشگاهی به‌کار رود و اغلب محدودهٔ غلظتی دارند؛ بنابراین، مواد کنترلی هیچ‌گاه نمی‌توانند به‌عنوان جایگزین کالیبراتور استفاده‌شوند.

تمام دستگاه‌ها باید پس از نصب و پیش از شروع کار کالیبرشده و میزان عدم دقت آنها نیز بررسی‌شود. سوابق اجرایی این امر باید در آزمایشگاه نگهداری‌گردد.

کالیبراسیون باید به‌طور کل سالی یک یا دو بار و نیز در موارد زیر انجام‌شود:

- هنگام نصب و راه‌اندازی،
- پس از هر بار تعمیر یا سرویس،
- قابل قبول نبودن نتایج کنترل کیفی روزانه(درصورت اطمینان از خراب‌نبودن نمونهٔ کنترل)،
- تعویض محلول‌ها(درصورت تغییر مشخص در نتایج خون کنترل یا نمونهٔ بیماران).

برای بررسی میزان عدم دقت(CV) پارامترهای مختلف اندازه‌گیری‌شونده توسط دستگاه، می‌توان از نمونه‌های کنترل یا خون تازه در دامنه‌های طبیعی و غیرطبیعی مطابق توضیحات بند **۳** مبحث «کنترل کیفیت دستگاه‌های خودکار شمارندهٔ سلولی» استفاده‌کرد که مقادیر به‌دست آمده باید مطابق ادعای کارخانهٔ سازنده باشد که در دستورالعمل دستگاه درج شده‌است.

برای کالیبراسیون دستگاه، کالیبراتورهای تجاری وجوددارد که مقادیر مورد نظر در آنها با روش‌های مرجع اندازه‌گیری شده‌است. این سوسپانسیون‌های سلول‌های خونی، درصورت داشتن تاریخ انقضای معتبر و تأییدیه‌های لازم و به شرط رعایت

دستورالعمل‌های کارخانهٔ سازنده، برای کالیبراسیون دستگاه‌ها مناسب هستند. می‌توان موفقیت روند کالیبراسیون را به‌وسیلهٔ آزمایش نمونهٔ کنترل، مقایسهٔ نتایج دستگاه با نتایج آزمایش‌شده روی چند نمونه خون با روش‌های مرجع و یا کنترل دقیق میانگین‌های متحرک دربارهٔ شاخص‌های گلبول‌های قرمز[1] تأییدکرد.

درصورت دسترسی نداشتن به کالیبراتورهای تجاری یا داشتن تردید نسبت به اعتبار آن، استفاده از خون کامل برای کالیبراسیون ضروری است. برای کالیبراسیون باید از خون طبیعی و تازه استفاده‌کرد. برای این کار، پارامترهای حداقل سه نمونهٔ خون کامل طبیعی، دو بار با روش‌های مرجع دستی و دو بار با دستگاه شمارندهٔ سلولی اندازه‌گیری‌می‌شود و پس از محاسبهٔ میانگین نتایج هر پارامتر با روش دستی و دستگاهی، ضریب کالیبراسیون جدید با استفاده از فرمول زیر تعیین‌می‌شود. با افزایش تعداد نمونه‌ها، دقت کالیبراسیون بیشتر می‌شود.

$$\text{ضریب کالیبراسیون} = \frac{\text{میانگین روش دستگاهی} - \text{میانگین روش دستی}}{\text{میانگین روش دستگاهی}} \times ۱۰۰$$

روش‌های مرجع اندازه‌گیری هموگلوبین، هماتوکریت و شمارش گلبول‌های سفید به‌ترتیب سیان‌مت‌هموگلوبین، میکروهماتوکریت و استفاده از هماسیتومتر(با درجه‌بندی نئوبار اصلاح‌شده) هستند. در کتاب‌های مرجع، روش مرجع شمارش گلبول‌های سفید، گلبول‌های قرمز و پلاکت‌ها، شمارنده‌های سلولی تک‌کاناله عنوان‌شده‌اند که در ایران، به‌علت دردسترس نبودن این تجهیزات، همچنان از هماسیتومتر استفاده‌می‌شود. به‌علت احتمال وجود خطای زیاد در شمارش سلولی با این روش، به‌ویژه در گلبول‌های قرمز و پلاکت‌ها، توصیه‌می‌شود که کالیبراسیون این پارامترها به‌وسیلهٔ شرکت پشتیبان صورت‌گیرد.

1. Moving Average

مثال

محاسبهٔ ضریب کالیبراسیون: اگر میانگین اندازه‌گیری هموگلوبین به روش دستی ۱۴۰g/L و با دستگاه خودکار شمارندهٔ سلولی ۱۴۵g/L باشد، عامل تصحیح کالیبراسیون دستگاه با استفاده از فرمول زیر محاسبه‌می‌شود:

$$\text{ضریب کالیبراسیون} = \frac{۱۴۰ - ۱۴۵}{۱۴۵} \times ۱۰۰ = -۳/۴۴$$

طبق محاسبهٔ بالا، ضریب کالیبراسیون دستگاه برای هموگلوبین باید به مقدار ۳/۴۴ کاهش‌یابد. به‌عنوان مثال، اگر ضریب کالیبراسیون دستگاه پیش از این ۱۰۰ بوده‌است، باید ۳/۴۴٪ کاهش‌یابد و روی ۹۶/۵۶ تنظیم‌شود.

در بعضی از انواع دستگاه‌های شمارنده مثل گروه سیسمکس، ضریب کالیبراسیون جدید با استفاده از فرمول کالیبراسیون که در دستورالعمل درج گردیده‌است، به‌ترتیب زیر محاسبه‌می‌شود:

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

نکته

کالیبراسیون دستگاه باید در موارد خاصی که در بالا به آنها اشاره‌شد و با استفاده از روش ذکرشده، صورت‌گیرد، درغیر این صورت، تغییر مکرر ضریب کالیبراسیون به دنبال مشاهدهٔ هرگونه اختلال در نتایج، به‌هیچ وجه توصیه‌نمی‌شود.

۳. کنترل کیفیت دستگاه‌های خودکار شمارندهٔ سلولی

آزمایشگاه برای کنترل کیفیت دستگاه‌های شمارندهٔ سلولی در بخش هماتولوژی باید دستورالعمل مکتوبی داشته‌باشد و سوابق انجام برنامه‌های کنترل کیفی نیز به‌نحو مقتضی نگهداری‌شود. توصیهٔ مراجع معتبر بین‌المللی برای انجام این امر، استفاده از خون کنترل است که بسیاری از آزمایشگاه‌های کشور به دلایل مختلف ازجمله دسترسی‌نداشتن به این نمونه، از روش‌های دیگری برای کنترل کیفیت دستگاه شمارنده استفاده‌می‌کنند. درهر صورت، هر آزمایشگاه ملزم به استفاده از روش‌های کنترل کیفی بوده که انواع خطاهای سیستماتیک و تصادفی را مشخص‌نماید.

در ادامهٔ این مبحث، علاوه‌بر نحوهٔ استفاده از خون کنترل، دربارهٔ روش‌های مختلف کنترل کیفیت که برای بررسی عملکرد دستگاه نیز کاربرد دارند، توضیح‌داده خواهدشد.

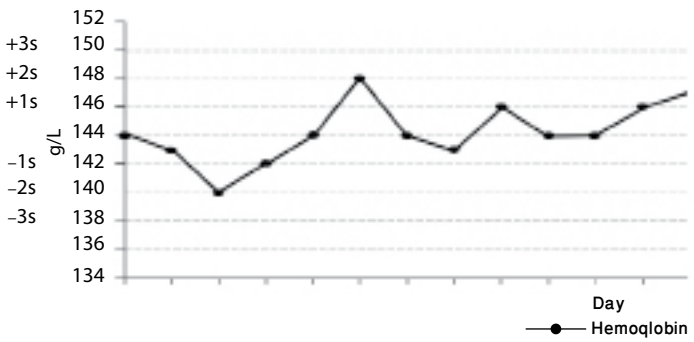
۳ـ۱ـ خون کنترل

طبق توصیه‌های منابع معتبر بین‌المللی خون‌شناسی، برای کنترل کیفیت دستگاه‌های شمارندهٔ سلولی، باید در هر سری کاری، دست‌کم از دو نمونه خون کنترل در دامنهٔ طبیعی و غیرطبیعی استفاده‌کرد. به‌این ترتیب، در ابتدای هر سری کاری، نمونهٔ کنترل طبیعی و غیرطبیعی و در پایان، نمونهٔ طبیعی با دستگاه شمارنده آزمایش و نتایج ثبت‌می‌شود. در ایران، دسترسی به خون کنترل در دامنه‌های مختلف برای تمام آزمایشگاه‌ها به‌راحتی امکان‌پذیر نیست؛ به‌همین دلیل، به‌طور معمول از خون کنترل در یک دامنه استفاده‌می‌شود.

نمونه خون کنترل هر روز صبح پیش از آزمایش نمونه‌های بیماران و درصورت نیاز، به فواصل در طی روز آزمایش و نتایج روی نمودار ثبت‌می‌شود. برای رسم نمودار، نمونهٔ کنترل باید به دفعات و در فواصل زمانی مختلف با دستگاه آزمایش‌شود تا دست‌کم برای هر پارامتر ۲۰ خوانده حاصل‌شود. پس از محاسبهٔ میانگین و انحراف معیارهای ±۱SD، ±۲SD و ±۳SD برای هر پارامتر، مقادیر آنها روی محور عمودی و روزها روی محور افقی ثبت‌می‌شود.

کنترل کیفیت دستگاه صرفاً با منطبق‌بودن نتایج خون کنترل با دامنهٔ ذکرشده در بروشور مربوطه قابل قبول نیست و همچنین استفاده از میانگین و دامنهٔ مندرج در بروشور برای رسم نمودار توصیه‌نمی‌شود. هر آزمایشگاه باید خود با استفاده از روش ذکرشده در بالا، نسبت به تعیین میانگین و دامنه برای رسم نمودار اقدام‌نماید.

در زیر نمودار کنترل کیفیت هموگلوبین، با میانگین ۱۴۴g/L و انحراف معیارهای ±۱SD، ±۲SD و ±۳SD به‌ترتیب ۲g/L، ۴ و ۶ مشاهده‌می‌شود. نقاط ثبت‌شده در نمودار نمایانگر میزان هموگلوبین خون کنترل در روزهای متوالی است. می‌توان نمودار کنترل کیفیت را با استفاده از قوانین لوی‌جنینگ[1]، وستگارد[2] یا سازمان جهانی بهداشت تفسیرکرد. هر آزمایشگاه می‌تواند براساس اهداف کیفیتی که برای نتایج آزمایش‌های خود درنظر دارد، از یکی از این قوانین استفاده‌کند. با استفاده از نمودار کنترل کیفیت می‌توان خطاهای تصادفی و سیستماتیک را درصورت بروز مشخص‌کرد.



تصویر شمارهٔ ۴: نمودار کنترل کیفی هموگلوبین

1. Levyjening
2. Westgard

جدول شمارهٔ ۱: تفسیر نمودار کنترل کیفیت براساس قوانین سازمان جهانی بهداشت

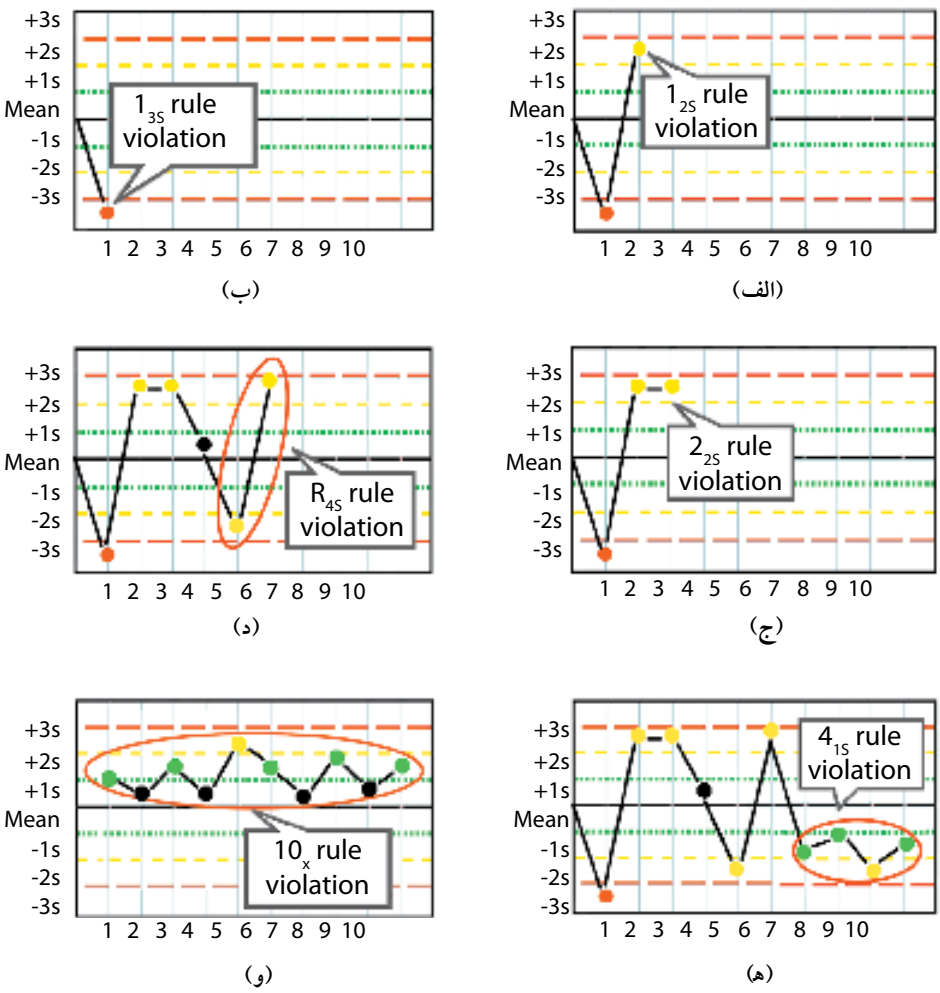
نتیجهٔ خون کنترل	تفسیر
یک کنترل خارج از محدودهٔ ۲SD±	هشدار، نشان‌دهندهٔ خطای تصادفی یا سیستماتیک
یک کنترل خارج از محدودهٔ ۳SD±	رد نتایج، نشان‌دهندهٔ خطای تصادفی یا سیستماتیک
دو خواندهٔ متوالی هم‌سو و خارج از محدودهٔ ۲SD±	رد نتایج، نشان‌دهندهٔ خطای سیستماتیک
چهار خواندهٔ متوالی و هم‌سو و خارج از محدودهٔ ۱SD+ یا ۱SD−	رد نتایج، نشان‌دهندهٔ خطای سیستماتیک
شش خواندهٔ متوالی در یک طرف میانگین	هشدار، نشان‌دهندهٔ خطای سیستماتیک

جدول شمارهٔ ۲: تفسیر نمودار کنترل کیفیت براساس قوانین وستگارد

نتایج خون کنترل	تفسیر
1_{2s} یک کنترل خارج از محدودهٔ ۲SD± (نمودار الف)	هشدار، لزوم بررسی سایر قوانین
1_{3s} یک کنترل خارج از محدودهٔ ۳SD± (نمودار ب)	رد نتایج، نشان‌دهندهٔ خطای تصادفی یا سیستماتیک
2_{2s} دو خواندهٔ متوالی و هم‌سو، خارج از محدودهٔ ۲SD± (نمودار ج)	رد نتایج، نشان‌دهندهٔ خطای سیستماتیک
R_{4s} یک خوانده خارج از محدودهٔ ۲SD+ و دیگری خارج از محدودهٔ ۲SD− (نمودار د)	رد نتایج، نشان‌دهندهٔ خطای تصادفی
4_{1s} چهار خواندهٔ متوالی و هم‌سو، خارج از محدودهٔ ۱SD+ یا ۱SD− (نمودار ه)	رد نتایج، نشان‌دهندهٔ خطای سیستماتیک
10_{x} ده خواندهٔ متوالی در یک طرف میانگین(بالا یا پایین میانگین و بدون توجه به اندازهٔ انحراف) (نمودار و)	رد نتایج، نشان‌دهندهٔ خطای سیستماتیک

نکته

قوانین چندگانهٔ وستگارد بین مجموعه‌های کاری مختلف و نیز بین دو غلظت نمونهٔ کنترلی قابل استفاده هستند.



تصویر شمارهٔ ۵: نمودارهای کنترل کیفی با قوانین وستگارد

نکته

درصورت یافتن هرگونه خطا با استفاده از نمودار، ابتدا، باید از آلوده یا خراب نبودن نمونهٔ کنترل اطمینان حاصل‌نمود. با مطمئن‌شدن از این امر پیش از برنامه‌ریزی برای کالیبراسیون دستگاه، باید اقدام‌های دیگری مانند شست‌وشوی دستگاه، آزمایش مجدد نمونه، آزمایش روی نمونهٔ خون کنترل دیگر با همان سری ساخت، بررسی وضعیت محلول‌های دستگاه و... را مدنظر قرارداد.

۳ـ۲ـ آزمون پایداری کالیبراسیون[1]

به‌منظور کامل‌شدن روند کنترل کیفیت دستگاه، علاوه بر استفاده از خون کنترل، می‌توان از نمونه‌های خون تازه استفاده‌کرد. با توجه به پایداری پارامترهایی نظیر WBC، RBC، Hb، HCT و اندکس‌های خونی در نمونهٔ خون حاوی ضدانعقاد، به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای C°۴، می‌توان در روز اول حداقل ۵ و ترجیحاً ۱۰ نمونه که دارای مقادیر طبیعی هستند را پس از آزمایش در یخچال نگهداری‌کرد و روز بعد، مجدداً مورد آزمایش قرارداد و وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر نمونه‌های جفت را با استفاده از آزمون آماری پایداری کالیبراسیون محاسبه‌کرد.

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

n: تعداد جفت‌های مورد بررسی

d: اختلاف بین دو خوانده(روزبه‌روز)

SD: انحراف معیار اختلافات

$\bar{d}$: میانگین اختلافات

مقدار tباید برای هر متغیر محاسبه‌شود. اگر مقدار آن برای ۵ نمونه از ۲/۷۸ و برای ۱۰ نمونه از ۲/۲۶ بیشتر باشد، با اطمینان ۹۵٪ می‌توان گفت که بین مقادیر شمارش‌شده در دو روز، اختلاف معنی‌دار وجوددارد. وجود اختلاف معنی‌دار برای یک متغیر، بیان‌کنندهٔ اشکال احتمالی است که درصورت تداوم، برای رفع آن باید اقدام مناسب صورت‌گیرد.

1. T-Brittin

مثال

درصورتی که نتایج اندازه‌گیری هموگلوبین ۵ نمونهٔ خون با استفاده از یک دستگاه شمارندهٔ سلولی در دو روز متوالی مطابق جدول زیر باشد، عملکرد دستگاه با کمک فرمول پایداری کالیبراسیون به‌صورت زیر بررسی‌می‌شود.

مقدار هموگلوبین روز اول(g/L)	مقدار هموگلوبین روز دوم(g/L)	d	d^2
۱۲۳	۱۲۰	۳	۹
۱۳۵	۱۳۳	۲	۴
۱۷۱	۱۷۰	۱	۱
۱۵۵	۱۵۰	۵	۲۵
۱۴۲	۱۳۸	۴	۱۶

$\sum d = ۱۵$

$(\sum d)^2 = ۲۲۵$

$\sum d^2 = ۵۵$

$$\bar{d} = \frac{\sum d}{۵} = \frac{۱۵}{۵} = ۳$$

$$SD = \sqrt{\frac{۵۵ - \frac{۲۲۵}{۵}}{۴}} = ۲/۵$$

$$tn = \frac{۳\sqrt{۵}}{۲/۵} = ۲/۶۷$$

چون عدد t به‌دست آمده از ۲/۷۸(مقدار t برای ۵ نمونه) کمتر است، نتایج هموگلوبین دستگاه قابل قبول است.

۳ـ۳ـ آزمایش دوتایی[1]

درصورت نبود امکان انجام تمام آزمایش‌ها به‌صورت دوتایی، باید در هر سری کاری، حداقل ۲ تا ۳ نمونه به‌صورت دوتایی آزمایش‌شوند تا با بررسی اختلاف خوانده‌ها ازطریق محاسبات آماری، از وجود خطاهای تصادفی آگاه‌شد. افزایش اختلاف بین دو خواندهٔ بیش از ۲SD محاسبه‌شده، احتمال وجود خطای تصادفی را مطرح‌می‌کند. فرمول زیر طریقهٔ محاسبهٔ SD نمونه‌های دوتایی را نشان‌می‌دهد:

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

مثال

مقدار هموگلوبین ۵ نمونه در دو بار اندازه‌گیری به شرح زیر است:

مقدار هموگلوبین (g/L)	مقدار هموگلوبین (g/L)	d	d^2
۱۲۰	۱۲۲	−۲	۴
۱۶۱	۱۶۳	−۲	۴
۱۱۰	۱۰۰	۱۰	۱۰۰
۱۴۰	۱۴۰	۰	۰
۱۳۴	۱۳۲	۲	۴
			۱۱۲

$$SD = \sqrt{\frac{\sum d^2}{2n}} = \sqrt{\frac{۱۱۲}{۱۰}} = ۳/۳۴$$

$$SD = ۶/۷$$

تفاوت بیشتر از ۲SD بین دو نتیجهٔ آزمایش در نمونهٔ سوم(d = ۱۰)، نمایانگر بروز خطای تصادفی و لزوم تکرار آزمایش روی همان نمونه است.

1. Duplicate Test

۳ـ۴ـ آزمایش بازبینی[1]

یکی دیگر از روش‌های کنترل کیفیت، آزمایش بازبینی است که درصورت نگهداری نمونه‌ها در دمای مناسب(یخچال) اجراشدنی است. برای این کار باید ابتدای سری کاری یا صبح دو تا سه نمونه را پس از آزمایش بلافاصله با در بسته در یخچال قرارداد و در انتهای سری کاری یا بعد از ظهر یا روز بعد، آنها را مجدداً مورد آزمایش قرارداد. پیش از آزمایش، نمونه‌ها باید به دمای اتاق رسیده و کاملاً مخلوط‌شوند. نتایج این دو آزمایش را می‌توان با استفاده از فرمول آزمایش دوتایی مقایسه‌نمود که اختلاف نتایج در محدودهٔ ۲SD قابل قبول است. درصورت نگهداری نمونه‌ها در شرایط مناسب، هرگونه تغییر در نتایج خارج از این محدوده، نشان‌دهندهٔ اشکال در عملکرد دستگاه یا معرف‌ها است. این آزمایش برای بررسی تغییرات هموگلوبین و گلبول‌های قرمز مناسب است و به میزان کمتر برای گلبول‌های سفید و پلاکت‌ها کاربرددارد؛ ولی برای هماتوکریت، به‌ویژه اگر فاصلهٔ زمانی بین دو آزمایش ۶ ساعت یا بیشتر باشد، کارایی ندارد.

نکته

بهتر است نمونه‌هایی که برای آزمایش بازبینی و دوتایی آزمایش‌می‌شوند، یکسان باشند.

مثال

نتایج اندازه‌گیری هموگلوبین ۵ نمونه توسط دستگاه شمارنده در صبح و بعد از ظهر به شرح زیر است:

مقدار هموگلوبین صبح(g/L)	مقدار هموگلوبین بعد از ظهر(g/L)	d	d^2
۱۲۰	۱۲۱	−۱	۱
۱۶۱	۱۵۹	۲	۴
۱۱۰	۱۱۲	−۲	۴
۱۴۰	۱۴۰	۰	۰
۱۳۴	۱۳۵	−۱	۱
			۱۰

1. Check Test

$$SD = \sqrt{\frac{\sum d^2}{2n}} = \sqrt{\frac{10}{10}} = 1$$

$$2SD = 2$$

با توجه به آنکه هیچ‌یک از اختلافات نتایج دو بار آزمایش روی یک نمونه، از 2SD بیشتر نیست، عملکرد دستگاه قابل قبول است.

۳ـ۵ـ آزمایش دلتا[1]

مقایسهٔ مقادیر به‌دست آمده از یک نمونه با نتایج قبلی نمونهٔ همان فرد به‌عنوان روشی برای کنترل کیفیت به‌کار می‌رود؛ با درنظر گرفتن این نکته که فاصلهٔ زمان بین دو آزمایش بیش از دو تا سه هفته نباشد. درصورت استفاده از این روش، باید به نکاتی نظیر تغییرات فیزیولوژیک طبیعی و روزانهٔ پارامترهای خونی و همچنین، مواردی نظیر ابتلای فرد به بیماری و یا استفاده از دارو به دلایل مختلف که باعث تغییر شمارش سلول‌ها می‌شوند، توجه داشت. با توجه به تغییرات روزانهٔ طبیعی پارامترهای خونی در یک فرد، تنها وجود اختلافات واضح بین مقادیر به‌دست آمده، نشان‌دهندهٔ بروز خطا است.

پارامتر مورد نظر	تفاوت بین دو نتیجه که می‌تواند نمایانگر خطا باشد
Hb	2g/dL
PCV	۰/۰۵ L/L
MCV	> 6fL
MCH	> 5pg
WBC	از تعداد طبیعی به غیرطبیعی
Platelets	افزایش یا کاهش تعداد، بیش از ۵۰٪

1. Delta Test

۳ـ۶ـ استفاده از نتایج بیماران

به‌دلیل ثابت‌بودن مقادیر میانگین شاخص‌های گلبولی(MCV، MCH و MCHC) در فواصل روزها و هفته‌ها، می‌توان از این شاخص‌ها به‌منظور ارزیابی کیفیت عملکرد دستگاه شمارنده در آزمایشگاه‌هایی که حداقل روزی ۱۰۰ نمونه CBC پذیرش می‌کنند، استفاده‌نمود. بررسی‌ها نشان‌می‌دهند، درصورتی که نمونه‌های CBC مورد آزمایش در روزهای مختلف ازنظر میزان اندکس‌های خونی تفاوت مشخصی با یکدیگر نداشته‌باشند که به تأثیر بارز بر میانگین‌ها منجرشود، مانند پذیرش نمونه‌های افراد مبتلا به فقر آهن یا تالاسمی در یک روز خاص در هفته که باعث کاهش شاخص‌های گلبولی می‌شوند، هرگونه تغییر مشخص در میانگین اندکس‌ها نشان‌دهندهٔ تغییر در کالیبراسیون یا اختلال عملکرد دستگاه است. برای استفاده از این روش، ابتدا باید میانگین و ۲SD± اندکس‌های MCV، MCH و MCHC حداقل ۳۰۰ تا ۵۰۰ نمونه را محاسبه و سپس، نمودار کنترل کیفیت را رسم‌نمود.

در صورت مراجعهٔ بیمارانی که اندکس‌های خونی طبیعی ندارند، مانند مبتلایان به بیماری‌های ذکرشده، نتایج اندکس‌های گلبولی آنها نباید در محاسبهٔ میانگین لحاظ‌شود. پس از رسم نمودار، نمونه‌های بیماران را روزانه به گروه‌های بیست‌تایی تقسیم‌کرده و پس از محاسبهٔ میانگین شاخص‌های گلبولی آنها و ثبت این میانگین روی نمودار، هرگونه انحراف از مقادیر مجاز را می‌توان نمایانگر عملکرد نامناسب دستگاه دانست. برای اطمینان از درست‌بودن این روش، انتخاب گروه‌های بیست‌تایی نمونه‌ها، باید به‌صورت تصادفی باشد و در هر دسته نیز بیش از ۷ نمونه دارای شرایط بالینی یکسان نباشند. این روش کنترل کیفی به‌صورت برنامه‌های نرم‌افزاری روی بعضی دستگاه‌ها نصب شده‌است.

۳ـ۷ـ بررسی عدم دقت(CV)

این بررسی به دو شکل انجام‌پذیر است. درصورت استفاده از خون کنترل، می‌توان با استفاده از نتایج نمونهٔ کنترل که طی روزهای متوالی با دستگاه آزمایش‌شده، عدم دقت هر پارامتر را محاسبه‌کرد و درصورت دسترسی نداشتن به خون کنترل، باید از نمونه‌های روزانه برای این امر استفاده‌کرد. به‌این ترتیب، هر ماه دو نمونه یا بیشتر را حداقل ۱۰ بار به‌صورت متوالی با دستگاه آزمایش کرده و از نتایج به‌دست آمده، عدم دقت هر پارامتر

را محاسبه‌کرد. توصیه‌می‌شود که عدم دقت دستگاه به‌ویژه هنگام نصب و راه‌اندازی، با استفاده از نمونه‌هایی با دامنه‌های طبیعی و غیرطبیعی بررسی‌شود. برای تهیهٔ نمونهٔ غیرطبیعی پایین، می‌توان از نمونهٔ رقیق‌شده استفاده‌کرد، به‌این ترتیب که پلاسمای نمونه را جداکرده و سپس حجمی از نمونه را با این پلاسمای به‌دست آمده مخلوط‌کرد. نمونهٔ خون با دامنهٔ غیرطبیعی بالا را نیز می‌توان با غلیظ‌کردن نمونه تهیه‌نمود. برای این کار باید ظرف نمونه را به‌مدت ۲ ساعت با زاویهٔ ۴۵° نگهداری‌کرد و سپس با برداشتن نیمی از پلاسمای ایجادشده و مخلوط‌کردن کامل، از آن به‌عنوان نمونهٔ غیرطبیعی بالا استفاده‌نمود. درصورت مطابقت نداشتن عدم دقت هر پارامتر با ادعای سازنده که در بروشور درج شده‌است، ضروری است با شرکت پشتیبان تماس گرفته‌شود.

مثال

میزان عدم دقت دستگاه برای شمارش گلبول‌های سفید به روش زیر محاسبه‌می‌شود:

شمارش WBC	$x-\bar{x}$	$(x-\bar{x})^2$
۷/۶	−۰/۰۳	۰/۰۰۰۹
۷/۵	−۰/۱۳	۰/۰۱۷
۷/۸	۰/۱۷	۰/۰۲۹
۷/۶	−۰/۰۳	۰/۰۰۰۹
۷/۵	−۰/۱۳	۰/۰۱۷
۷/۹	۰/۲۷	۰/۰۷۳
۷/۵	−۰/۱۳	۰/۰۱۷
۷/۶	−۰/۰۳	۰/۰۰۰۹
۷/۵	−۰/۱۳	۰/۰۱۷
۷/۸	۰/۱۷	۰/۰۲۹
$\sum x = ۷۶/۳$ $\bar{x} = ۷/۶۳$		$\sum(x-\bar{x})^2 = ۰/۲۰۱$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x-\bar{x})^2}{n-1}} \qquad CV\% = \frac{SD \times ۱۰۰}{\bar{x}}$$

$$SD = \sqrt{\frac{۰/۲۰۱}{۹}} = ۰/۱۴۸ \qquad CV\% = \frac{۰/۱۴۸ \times ۱۰۰}{۷/۶۳} \qquad CV\% = ٪۱/۹$$

۳ـ۸ـ بررسی صحت

روش‌های ذکرشده جزئی از برنامه‌های کنترل داخلی کیفیت هستند و به‌منظور بررسی تکرارپذیری مناسب آزمایش‌ها انجام‌می‌شوند، ولی تکرارپذیری مناسب همواره نشان‌دهندهٔ صحت نتایج نیست. برای ارزیابی صحت عملکرد تجهیزات و روش‌های آزمایش، باید از روش‌های دیگری نظیر استفاده از استاندارد، کالیبراتور و یا شرکت در برنامه‌های کنترل خارجی کیفیت استفاده‌کرد. هدف برنامهٔ کنترل خارجی کیفیت، ایجاد هماهنگی بین نتایج آزمایشگاه‌ها است.

در این برنامه، نمونه‌های مجهول از مرکز اجرای برنامه به آزمایشگاه‌های شرکت‌کننده فرستاده‌می‌شود. آزمایشگاه‌ها پس از انجام آزمایش‌های لازم روی نمونه‌ها، نتایج را جهت پردازش به مرکز اجرای برنامه ارسال‌می‌نمایند. نتایج در مرکز ذکرشده به روش‌های مختلف بررسی‌می‌شود که یکی از آنها مقایسهٔ نتایج هر آزمایشگاه با میانگین نتایج کل آزمایشگاه‌ها است که نتیجهٔ آن به‌صورت(DI)[1] به اطلاع آزمایشگاه رسانده‌می‌شود.

$$DI = \frac{x - \bar{x}}{SD}$$

$\bar{x}$: میانگین گروه

x: نتیجهٔ هر آزمایشگاه

SD: نحراف معیار مجاز هر پارامتر

نحوهٔ تفسیر:

DI < ۱ = نتیجهٔ مناسب

DI ۱-۲ = قابل قبول اما بینابینی

DI ۲-۳ = نیاز به بررسی روش آزمایش و یا کالیبراسیون

DI > ۳ = نیاز به اقدام فوری

۳ـ۹ـ تطابق نتایج دستگاه با یافته‌های میکروسکوپی یا بالینی

به توصیهٔ سازمان جهانی بهداشت، بررسی نتایج آزمایش‌های حاصل از دستگاه و مقایسه و مطابقت آنها با مشاهدهٔ میکروسکوپی گسترش‌های خونی مربوطه و یافته‌های بالینی بیمار، باید از برنامه‌های دائمی کنترل کیفیت آزمایشگاه باشد. به‌این ترتیب، هرگونه نتیجهٔ

1. Deviation Index

غیرقابل انتظار حاصل از دستگاه نظیر لکوسیتوز، لکوپنی، ترومبوسیتوپنی، هموگلوبین خیلی پایین یا بالا و اندکس‌های غیرطبیعی باید پیش از گزارش با مشاهدهٔ گسترش خون محیطی یا بررسی وضعیت بالینی و یا سابقهٔ بیمار تأییدشود.

نکته

اگر چه مقایسهٔ روش دستی(مرجع) و دستگاهی در مراجع معتبر روش روزمره برای کنترل کیفیت عنوان نشده‌است، ولی در بسیاری از آزمایشگاه‌های کشور از این روش به‌عنوان یکی از راه‌های کنترل کیفیت استفاده‌می‌شود. درصورت استفاده از این روش، توجه به نکته‌های زیر الزامی است:

۱. آزمایش دست‌کم روی ۳ نمونه(بدیهی است آزمایش روی تعداد نمونه‌های بیشتر امکان دستیابی به نتایج صحیح‌تر را فراهم می نماید)؛
۲. انجام آزمایش دوتایی به روش دستی و دستگاهی روی هر نمونه و محاسبهٔ میانگین نتایج برای هر پارامتر با هر دو روش؛
۳. استفاده از آزمون آماری Paired t test برای مقایسهٔ هم‌خوانی نتایج.

فرمول‌های محاسبهٔ t با استفاده از آزمون آماری Paired t test به روش زیر است:

$$\text{Variance}(SD^2) = \frac{\sum(d-\bar{d})^2}{n-1}$$

$$\text{Standard error of difference in mean (SEdiff)} = \frac{\sqrt{SD^2}}{n}$$

$$t = \frac{\bar{d}}{SEdiff}$$

n: تعداد نمونه‌ها
d: اختلاف نتایج روش دستی و دستگاهی برای هر نمونه
$\bar{d}$: میانگین اختلاف نتایج
SD^2: واریانس[1] اختلاف بین نتایج
SE diff: تفاوت استاندارد میانگین دو گروه داده

مقادیر مجاز t با توجه به ضرایب اطمینان مختلف در جدول t test درج شده‌است. با استفاده از این جدول براساس تعداد نمونه‌ها(n) و درجهٔ آزادی(n−۱) و درنظر داشتن ضریب اطمینان ۹۵٪، می‌توان عدد t مجاز را مشخص‌کرد.

1. Variance

جدول شمارهٔ ۳: جدول مقادیر t براساس ضرایب اطمینان مختلف

سطح درصد اطمینان							
df	۵۰	۴۰	۳۰	۲۰	۱۰	۵	۱
۱	۱	۱/۳۷۶	۱/۹۶۳	۳/۰۷۸	۶/۳۱۴	۱۲/۷۰۶	۶۳/۶۵۷
۲	۰/۸۱۶	۱/۰۶۱	۱/۳۸۶	۱/۸۸۶	۲/۹۲۰	۴/۳۰۳	۹/۹۲۵
۳	۰/۷۶۵	۰/۹۷۸	۱/۲۵۰	۱/۶۳۸	۲/۳۵۳	۳/۱۸۲	۵/۸۴۱
۴	۰/۷۴۱	۰/۹۴۱	۱/۱۹۰	۱/۵۳۳	۲/۱۳۲	۲/۷۷۶	۴/۶۰۴
۵	۰/۷۲۷	۰/۹۲۰	۱/۱۵۶	۱/۴۷۶	۲/۰۱۵	۲/۵۷۱	۴/۰۳۲
۶	۰/۷۱۸	۰/۹۰۶	۱/۱۳۴	۱/۴۴۰	۱/۹۴۳	۲/۴۴۷	۳/۷۰۷
۷	۰/۷۱۱	۰/۸۹۶	۱/۱۱۹	۱/۴۱۵	۱/۸۹۵	۲/۳۶۵	۳/۴۹۹
۸	۰/۷۰۶	۰/۸۸۹	۱/۱۰۸	۱/۳۹۷	۱/۸۶۰	۲/۳۰۶	۳/۳۵۵
۹	۰/۷۰۳	۰/۸۸۳	۱/۱۰۰	۱/۳۸۳	۱/۸۳۳	۲/۲۶۲	۳/۲۵۰
۱۰	۰/۷	۰/۸۷۹	۱/۰۹۳	۱/۳۷۲	۱/۸۱۲	۲/۲۲۸	۳/۱۶۹
۱۱	۰/۶۹۷	۰/۸۷۶	۱/۰۸۸	۱/۳۶۳	۱/۷۹۶	۲/۲۰۱	۳/۱۰۶
۱۲	۰/۶۹۵	۰/۸۷۳	۱/۰۸۳	۱/۳۵۶	۱/۷۸۲	۲/۱۷۹	۳/۰۵۵
۱۳	۰/۶۹۴	۰/۸۷۰	۱/۰۷۹	۱/۳۵۰	۱/۷۷۱	۲/۱۶۰	۳/۰۱۲
۱۴	۰/۶۹۲	۰/۸۶۸	۱/۰۷۶	۱/۳۴۵	۱/۷۶۱	۲/۱۴۵	۲/۹۷۷
۱۵	۰/۶۹۱	۰/۸۶۶	۱/۰۷۴	۱/۳۴۱	۱/۷۵۳	۲/۱۳۱	۲/۹۴۷
۱۶	۰/۶۹۰	۰/۸۶۵	۱/۰۷۱	۱/۳۳۷	۱/۷۴۶	۲/۱۲۰	۲/۹۲۱
۱۷	۰/۶۸۹	۰/۸۶۳	۱/۰۶۹	۱/۳۳۳	۱/۷۴۰	۲/۱۱۰	۲/۹۸۹
۱۸	۰/۶۸۸	۰/۸۶۲	۱/۰۶۷	۱/۳۳۰	۱/۷۳۴	۲/۱۰۱	۲/۸۷۸
۱۹	۰/۶۸۸	۰/۸۶۱	۱/۰۶۶	۱/۳۲۸	۱/۷۲۹	۲/۰۹۳	۲/۸۶۱
۲۰	۰/۶۸۷	۰/۸۶۰	۱/۰۶۴	۱/۳۲۵	۱/۷۲۵	۲/۰۸۶	۲/۸۴۵
۲۱	۰/۶۸۶	۰/۸۵۹	۱/۰۶۳	۱/۳۲۳	۱/۷۲۱	۲/۰۸۰	۲/۸۳۱
۲۲	۰/۶۸۶	۰/۸۵۸	۱/۰۶۱	۱/۳۲۱	۱/۷۱۷	۲/۰۷۴	۲/۸۱۹
۲۳	۰/۶۸۵	۰/۸۵۸	۱/۰۶۱	۱/۳۲۱	۱/۷۱۷	۲/۰۷۴	۲/۸۱۹
۲۴	۰/۶۸۵	۰/۸۵۷	۱/۰۵۹	۱/۳۱۸	۱/۷۱۱	۲/۰۶۴	۲/۷۹۷
۲۵	۰/۶۸۴	۰/۸۵۶	۱/۰۵۸	۱/۳۱۶	۱/۷۰۸	۲/۰۶۰	۲/۷۸۷
۲۶	۰/۶۸۴	۰/۸۵۶	۱/۰۵۸	۱/۳۱۵	۱/۷۰۶	۲/۰۵۶	۲/۷۷۹
۲۷	۰/۶۸۴	۰/۸۵۵	۱/۰۵۷	۱/۳۱۴	۱/۷۰۳	۲/۰۵۲	۲/۷۷۱
۲۸	۰/۶۸۳	۰/۸۵۵	۱/۰۵۶	۱/۳۱۳	۱/۷۰۱	۲/۰۴۸	۲/۷۶۳
۲۹	۰/۶۸۳	۰/۸۵۴	۱/۰۵۵	۱/۳۱۱	۱/۶۹۹	۲/۰۴۵	۲/۷۵۶
۳۰	۰/۶۸۳	۰/۸۵۴	۱/۰۵۵	۱/۳۱۰	۱/۶۹۷	۲/۰۴۲	۲/۷۵۰
۴۰	۰/۶۸۱	۰/۸۵۱	۱/۰۵۰	۱/۳۰۳	۱/۶۸۴	۲/۰۲۱	۲/۷۰۴
۵۰	۰/۶۸۰	۰/۸۴۹	۱/۰۴۸	۱/۲۹۹	۱/۶۷۶	۲/۰۰۸	۲/۶۷۸
۶۰	۰/۶۷۹	۰/۸۴۸	۱/۰۴۶	۱/۲۹۶	۱/۶۷۱	۲	۲/۶۶۰
۱۲۰	۰/۶۷۷	۰/۸۴۵	۱/۰۴۱	۱/۲۸۹	۱/۶۵۸	۱/۹۸۰	۲/۶۱۷
∞	۰/۶۷۴	۰/۸۴۲	۱/۰۳۶	۱/۲۸۲	۱/۶۴۵	۱/۹۶۰	۲/۵۷۶

مثال

میانگین هماتوکریت به روش دستی	میانگین هماتوکریت به روش دستگاهی	d	$d-\bar{d}$	$(d-\bar{d})^2$
٪۴۵/۵	٪۴۵	۰/۵	۰/۴۳۷	۰/۱۹
۳۹	٪۳۸/۳	۰/۷	۰/۶۳۷	۰/۴
٪۴۱/۷	٪۴۱	۰/۷	۰/۶۳۷	۰/۴
		$\bar{d}$ = ۰/۰۶۳		$\sum(d-\bar{d})^2$ = ۰/۹۹

$$\text{واریانس } (SD^2) = \frac{\sum(d-\bar{d})^2}{n-1} = \frac{۰/۹۹}{۲} = ۰/۵$$

$$SE\ diff = \frac{\sqrt{SD^2}}{n} = \frac{\sqrt{۵}}{۳} = ۰/۴$$

$$t = \frac{\bar{d}}{SE\ diff} = \frac{۰/۰۶۳}{۰/۴} = ۰/۱۵$$

براساس جدول t با توجه به تعداد نمونه‌های مورد آزمایش(۳ نمونه) و درجهٔ آزادی ۲(۱–n)، مقدار t مورد قبول بـا ضریب اطمینان ۹۵٪ برابر ۴/۳ است. کمتربـودن مقدار t محاسبه‌شده در این آزمایش(۰/۱۵) از مقدار t مجاز(۴/۳) نشان‌دهندهٔ هم‌خوانی و قابل قبول بودن نتایج است.