

خطاهای آزمایشگاهی در هماتولوژی: سرنخی برای تشخیص

• دکتر حبیب اله گل افشان

عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی شیراز

golafshanh@sums.ac.ir

• رضا رنجبران

دانشجوی دکترای تخصصی خون شناسی، مرکز تحقیقات علوم و

فن آوری تشخیص آزمایشگاهی دانشکده پیراپزشکی شیراز

قرار گیرد نه تنها راهی برای تشخیص لوسمی CLL باز می‌کند، بلکه می‌تواند آن را از لنفوسیتوز واکنشی جدا کند. به مثال‌های دیگر تشخیص بیماری‌های خون با خطاهای آزمایشگاهی توجه کنید. (۷)

خطای قرائت نقطه پایان آزمایش PTT و تشخیص احتمالی انعقاد داخل عروقی منتشره (DIC)

در دستگاه‌های کوآگولومتر نوری سنجش زمان لخته شدن پلاسما (clot end point) در آزمایش PTT به محض ایجاد تغییر ناگهانی در عبور نور تابشی (transmittance) به صورت یک منحنی تک موج ثبت می‌گردد.

گزارش گردیده که الگوی موجی شکل دو فازه (biphasic wave form) در تست PTT ممکن است در تشخیص اولیه DIC و نیز در موارد سپتیمی (Septicemia) کمک کننده باشد.

بدین مفهوم که در مواردی قبل از لخته شدن پلاسما در تست PTT نخست ذرات رسوبی، شکل می‌گیرند به طوری که آزمایش کننده آن را به اشتباه نقطه پایان آزمایش قلمداد می‌کند. در دستگاه کوآگولومتر نوری این ذرات رسوبی باعث کاهش اولیه عبور نور تابشی (transmittance) شده و پس از آن ایجاد لخته فیبرینی موجب کاهش شدید نور از لوله می‌گردد که این مرحله به عنوان نقطه پایان تست (end point) در کوآگولومتر گزارش می‌گردد. بنابراین چنانچه گراف زمان لخته شدن پلاسما در ارتباط با عبور نور (transmittance) رسم شود یک منحنی دو فازه به دست می‌دهد. فاز اولیه کاهش عبور نور از لوله آزمایش در رابطه با ذرات رسوبی شکل یافته از کمپلکس‌های CRP (C-reactive protein) با

ممکن است با نگاه اول کمی تعجب کنید که چگونه با خطاهای آزمایشگاهی می‌توان به نکات تشخیصی برای برخی از بیماری‌های خون رسید. گفتنی است که گاهی خطاهای آنالیزور، خطای نمونه، خطای آنالیز با تغییرات درجه حرارت نمونه و خطا در شمارش سلول‌ها می‌تواند سرنخ‌های تشخیصی را ارائه دهد.

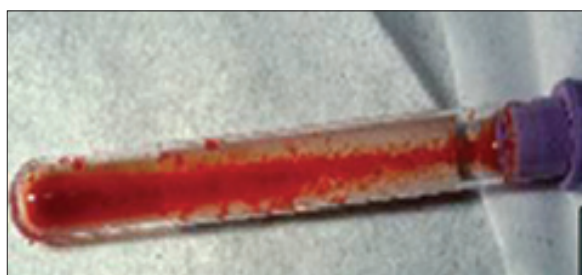
برای مثال شکندگی و ترد بودن سلول‌های لنفوسیت B سرطانی در بیمار مبتلا به لوسمی مزمن لنفوسیتیک تعداد زیادی سلول‌های اسماج در خون محیطی تولید می‌کند. سلول‌های اسماج در گردش خون این بیماران وجود ندارد، بلکه ضربه و فشار وارده بر خون در هنگام تهیه گستره محیطی موجب تولید سلول‌های اسماج می‌شود که در واقع یک آرتیفکت یا خطای آزمایشگاهی می‌باشد و می‌توان با پایدار کردن غشا و افزودن یک تا دو قطره آلبومین ۲۲٪ به خون که در بانک خون استفاده می‌شود از اسماج شدن سلول‌ها جلوگیری کرد.

گفتنی است که تعداد زیاد اسماج سل همراه با لکوسیتوز که نمای لنفوسیتوز داشته باشد. احتمال لوسمی مزمن لنفوسیتیک را در یک شخص بزرگسال مطرح می‌کند.

بیماری‌های دیگر مانند سیاه سرفه و لنفوسیتوز عفونی (infections Lymphocytosis) که نمای لنفوسیتوز دارند غالباً با اسماج سل همراه نیستند. گفتنی است که واکسن بیماری سیاه سرفه ایمنی دایمی نداده و در سال‌های اخیر تعداد قابل توجهی از بزرگسالان به این بیماری مبتلا شده‌اند. سرفه برای بیشتر از ۶ هفته و حضور لنفوسیتوز بدون اسماج سل ممکن است در تشخیص این بیماری عفونی کمک کننده باشد. بنابراین تولید اسماج سل که یک خطای آزمایشگاهی بود، چنانچه در کنار لنفوسیتوز

و همولیزه و حاوی آگلوتیناسیون سرد و کرایوگلوبولین افزایش کاذب دارد.

چربی در محلول اندازه گیری هموگلوبین آنالیزور حل نشده و از طریق ایجاد کدورت، موجب افزایش کاذب هموگلوبین و در نتیجه MCHC می شود. همولیز، موجب کاهش شمارش گلبول های قرمز و افزایش هموگلوبین به علت رها شدن هموگلوبین آزاد در پلاسما شده و از اینرو MCHC را افزایش می دهد. عبور همزمان گلبول های قرمز به هم چسبیده در آگلوتیناسیون سرد موجب افزایش MCV و کاهش تعداد گلبول های قرمز و افزایش پارامتر MCHC می گردد. (۵)



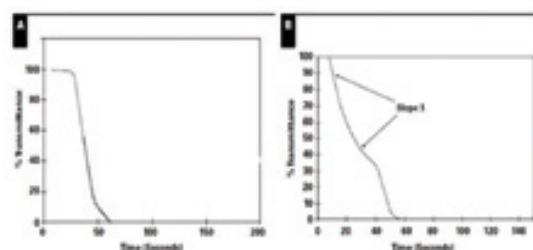
آگلوتیناسیون سرد قوی ممکن است ناشی از لنفوم سلول های B یا بیماری های عفونی مانند منونوکلئوز عفونی یا عفونت مایکوپلاسمایی باشد.

گرچه پارامتر MCH در موارد فوق هم افزایش می یابد ولی با توجه به این که در محاسبه MCHC از سه پارامتر استفاده می شود ارزیابی بهتری از وضعیت نمونه خون به دست می دهد.

افزایش واقعی پارامتر MCHC (بیش از ۳۵٪) در نمونه خون با مرفولوژی اسفروسیتوز، گلبول های داسی شده و گلبول های فشرده با لبه های نامنظم و بایت سل مشاهده می شود. در غیر این موارد افزایش آن کاذب بوده و نیاز به پیگیری دارد.

کاهش پارامتر MCHC در آنمی فقر آهن پیشرفته و استوماتوسیتوز مشاهده می شود. استوماتوسیتوز یا هیدروسیتوز به مفهوم گلبول های پر آب است. پدیده تورم حاد گلبول های قرمز در دیابت و اورمی که موجب افزایش MCV می گردند، با کاهش پارامتر MCHC همراه است. دیابت و اورمی موجب افزایش فشار اسمزی داخل گلبول

لیپوپروتئین های با دانسیته بسیار پایین (VLDL) هستند که در حضور کلسیم رسوب می کنند و فاز دوم کاهش عبور نور تابشی در رابطه با تولید لخته واقعی و زمان پایان آزمایش است. (۳)



منحنی آزمایش PTT در دستگاه کوآگولومتر روی محور مختصات که محور X بر حسب ثانیه و محور Y بر اساس عبور نور (transmittance) درجه بندی شده است، ترسیم می گردد. گراف A آزمایش نرمال PTT تک موج را نشان می دهد که زمان لخته با تغییر ناگهانی در کاهش نور تابشی همراه است. گراف B آزمایش دو فازی یا موج PTT را نشان می دهد که موج اول کاهش عبور نور تابشی ناشی از رسوب CRP-VLDL و موج دوم به علت تولید لخته نهایی است. الگوی دو فازی موجی شکل aPTT در عفونت های خونی، بیماران بد حال در بخش ICU و در بیماران مبتلا به انعقاد داخل عروقی منتشره مشاهده شده و ادعا گردیده که یک نشان اولیه برای تشخیص DIC می باشد.

کنترل کیفی نمونه خون با خطا در پارامتر

MCHC (Mean cell hemoglobin concentration)

در آنالیزورهای هماتولوژی پارامتر MCHC یا میانگین غلظت هموگلوبین در گلبول قرمز از رابطه زیر به دست می آید.

$$\frac{Hb}{MCV \times RBC}$$

ارزیابی پارامتر MCHC به عنوان کنترل کیفی نمونه خون دارای ارزش است. در آنالیزورهای خون شناسی مقدار هماتوکریت از حاصل ضرب MCV در تعداد گلبول های قرمز به دست می آید. پارامتر MCHC در نمونه های چرب

قرمز شده که نتیجه آن جذب آب از محلول های ایزوتون دستگاه آنالیزور بوده که افزایش کاذب MCV را به دنبال دارد ولی با کاهش MCHC می توان این پدیده را شناسایی کرد. چون کاهش این پارامتر بیانگر ورود آب یا آبکی شدن هموگلوبین در درون گلبول های قرمز است.

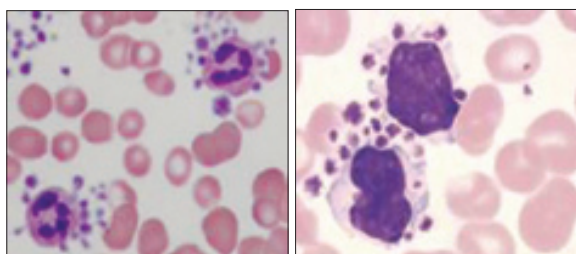
تشخیص هموگلوبینوپاتی با خطای افزایش کاذب هموگلوبین

ممکن است گلبول های قرمز جنین و نوزاد و نیز گلبول های قرمز حاوی هموگلوبین های غیر طبیعی (مانند هموگلوبین های S، D، E و O و ...) و نیز گلبول های قرمز با انباشتگی غشا از چربی در محلول لیز آنالیزور پاره نشده و موجب لکوسیتوز کاذب و افزایش کاذب هموگلوبین گردند. گلبول های قرمز لیز نشده ممکن است به جای لنفوسیت شمرده شده و با شمارش افتراقی معکوس روبرو شوید، بدین مفهوم که درصد سلول های لنفوسیت بسیار بیشتر از نوتروفیل گزارش می شود. کرایوگلوبین با ایجاد ذرات رسوبی که با گذشت زمان شکل می گیرند موجب لکوسیتوز کاذب می شود.

نکته مهم: گزارش افزایش کاذب لکوسیتوز و یا هموگلوبین توسط آنالیزور و مغایرت با مطالعه از روی تخمین گستره محیطی ممکن است که ما را در شناخت یک هموگلوبینوپاتی ناشناخته یا وجود کرایوگلوبولین یا کرایوفیبرینوزن یاری کند. گلبول های قرمز تارگت در یرقان انسدادی به علت انباشتگی غشا از چربی و گلبول های قرمز حاوی هموگلوبین های غیر طبیعی، در محلول اندازه گیری هموگلوبین آنالیزورها و محلول درابکین همولیز نگردیده و ایجاد کدورت می کنند.

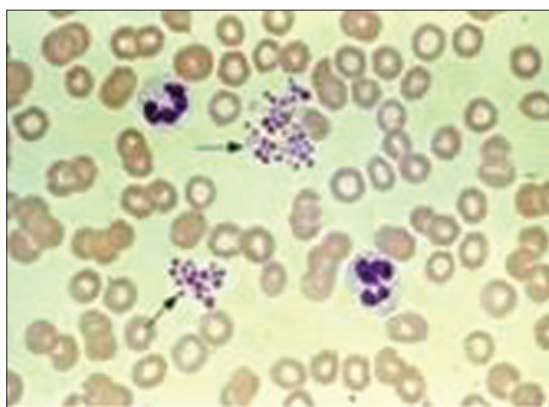
سندرم ضد فسفولیپید و خطای کاذب شمارش پلاکت ها در پدیده اقماری پلاکت ها

پدیده اقماری پلاکت ها و پدیده تجمع پلاکتی به صورت دستجات چند تایی در سرتاسر گستره محیطی در تعدادی از بیماران در ضد انعقادهای EDTA رخ می دهد. (۵ و ۷) برخی از افراد دارای آنتی بادی های ضد پلاکتی بوده که تنها در حرارت اتاق و در حضور املاح EDTA فعال شده و با پلاکت ها کمپلکس ایمنی می دهند. این کمپلکس های



پدیده اقماری پلاکتی

گاهی آنتی بادی های ضد پلاکتی موجب تجمع پلاکتی به صورت دستجات چند تایی در سرتاسر گستره محیطی در حضور نمک EDTA می شود. گفتنی است که این تجمععات پلاکتی به عنوان گلبول قرمز یا سفید شمرده شده و موجب کاهش کاذب پلاکت ها و افزایش کاذب شمارش گلبول های سفید می گردند اخیرا در تعدادی از بیماران با پدیده اقماری و تجمع پلاکتی، آزمایش های مثبت سندرم ضد فسفو لیپید گزارش شده است.

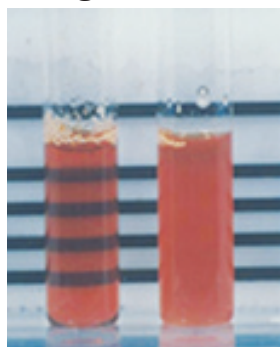


پدیده تجمع پلاکتی ناشی از فعال شدن آنتی بادی های پلاکتی در حضور EDTA

تشخیص همو گلوبینو پاتی با نتیجه کاذب مثبت در آزمایش حلالیت

اساس آزمایش:

هموگلوبین داسی (هموگلوبین S) در حضور دی تیونیت سدیم که اکسیژن محیطی را به خود می گیرد به وضعیت داکسی (deoxy) در آمده و پلیمری می شود. پلیمرهای هموگلوبین S در بافر فسفات ساپونین دار با مولاریته ۲/۳ نامحلول بوده و با ایجاد کدورت مانع از عبور نور می گردد.



لکوسیتوز شدید، افزایش پروتئین های خون (هیپرپروتئینمی)، پاراپروتئین ها و هیپر لیپمی موجب مثبت کاذب آزمایش حلالیت می گردند. استفاده از خون شسته و فشرده، خطاهای فوق را برطرف می سازد. با مثبت شدن آزمایش حلالیت باید برای تایید حضور هموگلوبین S اقدام به آزمایش الکتروفورز کرد.

هموگلوبین های ناپایدار، به ویژه بعد از برداشته شدن طحال می توانند موجب مثبت کاذب به علت کدر شدن معرف تست حلالیت به علت اجسام ها نیز گردد.

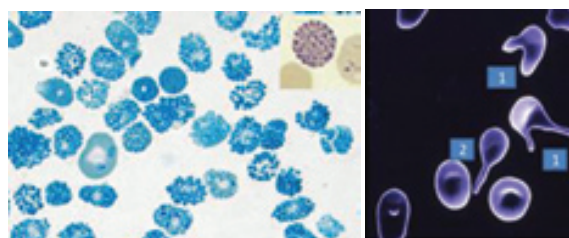
هموگلوبین های I و Setif که از واریان های زنجیره الفا هستند در محیط آزمایشگاه در محلول بافری آزمایش حلالیت پلیمری شده و ایجاد کدورت می کنند، از این رو در آزمایش حلالیت چنانچه خطای نمونه علت واکنش کاذب نباشد باید هموگلوبینوپاتی فوق را مد نظر قرار داد. (۸و۱)

خطای افتراق گلبول های سفید و احتمالات تشخیص

در آنالیزورها از خواص گوناگون سلول جهت افتراق آن ها از یکدیگر استفاده می شود. گلبول های سفید در تکنیکون HI با به کارگیری کانال پراکسیداز و کانال بازوفیل لوبولاریتی،

تشخیص بیماری هموگلوبین اچ با خطای افزایش کاذب پلاکت

بیماری هموگلوبین اچ با مرفولوژی میکرو-هیپو و تارگت سل و گلبول های قطره اشکی کشیده شده نوک دار (tailed) و گلبول با دو زائده (horn cell) همراه است. گفتنی است که بیشترین خطای افزایش کاذب پلاکت در بیماری هموگلوبین اچ رخ می دهد و این به علت آن است که میکروسیتوز شدید و گلبول های شکسته به جای پلاکت شمرده می شوند، جالب آن که با این خطای آزمایشگاهی می توان هموگلوبین اچ را تشخیص داد، بدین مفهوم که با مرفولوژی میکرو-هیپو و افزایش کاذب پلاکت گاهی به صورت +++ یا حتی بالغ بر میلیون توسط آنالیزور اقدام به انجام آزمایش تهیه اچ بادی یا تهیه مرفولوژی توپ گلف کنید و یا باند آن را در الکتروفورز مشاهده کنید. پدیده فوق ممکن است در الپتوسیتوز همولیتیک و پیرو پویی کیلوسیتوز نیز مشاهده شود. (۲)



تشخیص فاکتور هفت پادوا (Padua) با خطای غیر همخوانی در آزمایش PT

فاکتور هفت پادوا با معرف های بافتی تهیه شده از منابع غیر انسانی (Nonhuman) به خوبی واکنش نداده و منجر به طولانی شدن کاذب آزمایش PT می گردد، در حالی که عملکرد آن در بدن طبیعی بوده و بیمار میل به خون ریزی ندارد. فاکتور ۷ پادوا در نتیجه جایگزینی گلوتامین به جای آرژنین در موقعیت شماره ۳۰۴ فاکتور ۷ است. استفاده از معرف بافتی با منبع انسانی با نوآوری DNA جواب صحیح PT را به دست می دهد. از این رو سفارش می شود برای هر فردی که آزمایش PT طولانی دارد و سابقه خون ریزی و بیماری کبد ندارد، آزمایش PT با معرف بافتی انسانی که دارای ISI بین ۱/۲ تا ۱/۷ می باشد نیز انجام شود. (۵)

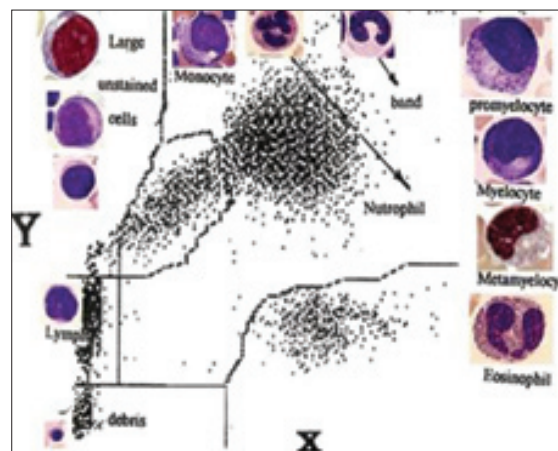


از هم متمایز می شوند. ائوزینوفیل و نوتروفیل و منوسیت به ترتیب دارای بیشترین خاصیت پراکسیداز در سیتوپلاسم هستند. گفتنی است که بازوفیل ها در PH بسیار اسیدی و ائوزینوفیل در PH بسیار قلیایی در مقابل لیز شدن بیشترین مقاومت را دارند، در حالی که بقیه سلول ها به سرعت لیز می شوند و از اینرو براساس حجم سنجی پس از مجاورت خون با PH اسیدی و یا قلیایی این دو سلول در برخی از آنالیزورهای سیستمکس از هم جدا می شوند. گرانول های ائوزینوفیل و آلودگی گلبول های قرمز با انگل مالاریا موجب دیپلاریزه کردن نور و راهی برای افتراق ائوزینوفیل و اعلام خطر برای انگل مالاریا باز می کند. فقدان یا کاهش شدید آنزیم پروکسیداز در کمبود ارثی یا سندرم های پیش سرطانی موجب می شود که نوتروفیل ها در کانال پروکسیداز به اشتباه در گروه لنفوسیت های بزرگ طبقه بندی گردند و از این رو شمارش نوتروفیل حتی نزدیک به صفر کاهش یابد، در حالی که گستره محیطی سلول های نوتروفیل را نشان داده و با این مغایرت می توان کاهش آنزیم را در نظر داشت. (۶)

۰/۱۵ ± ۲/۵ و برای تالاسمی هتروزیگوت بتا ۰/۲۷ ± ۴/۸ است. گستره هموگلوبین A2 در افراد مبتلا به تالاسمی مینور بتا از ۳/۵ تا ۸ درصد گزارش شده است. اندازه گیری هموگلوبین A2 بایستی با دقت فراوان انجام گیرد چون گاهی تشخیص تالاسمی مینور بتا با افزایش یک تا دو درصد بالاتر از سطح نرمال است. بهتر است که اندازه گیری ها به صورت دابل انجام و میانگین جواب ها گزارش شود. روش اندازه گیری هموگلوبین A2 دارای ضریب مغایرت (CV) روزانه ۲٪ و گاهی تا ۵٪ گزارش شده است. بایستی همیشه یک نمونه کنترل با مقدار نرمال هموگلوبین A2 و یک نمونه با افزایش هموگلوبین A2 با هر سری تست آزمایش شود. هموگلوبین های O, E, C و هیبرید S-G با این روش همراه با هموگلوبین A2 خارج می گردند. از این رو چنانچه مقدار هموگلوبین A2 بیشتر از ۱۰٪ کل هموگلوبین شود بیانگر حضور یک مغایر یا واریانت هموگلوبین است. افزایش بیش از ۸ درصدی هموگلوبین A2 در تالاسمی مینور بتا بسیار به ندرت رخ می دهد. هتروزیگوت داسی شکل ممکن است همراه با افزایش هموگلوبین A2 باشد. (۴)

مغایرت مرفولوژی گلبول های قرمز با پارامتر تغییرات اندازه گلبول های قرمز (Red cell distribution width)

پارامتر تغییرات اندازه بر حسب انحراف معیار (RDW-SD) و ضریب تغییرات (RDW-CV) گزارش می شود. دامنه مرجع RDW-SD بین ۳۹-۴۷ فمتولیتراست و برابر با پهنای خطی است که از ۲۰٪ فراوانی، هیستوگرام حجم را قطع می کند و بیانگر تفاوت حجم بزرگ ترین و کوچک ترین گلبول قرمز در ۸۰ درصد فراوانی است. هر چه این دامنه بیشتر باشد به مفهوم تنوع بیشتر اندازه گلبول قرمز است. این پارامتر مستقیماً از روی هیستوگرام حجم به دست می آید. برای مثال اگر این خط سمت راست منحنی را در جایگاه ۱۱۱ فمتولتری و سمت چپ را در جایگاه ۷۰ فمتولتری قطع کند، RDW-SD برابر با ۴۱ = ۷۰ - ۱۱۱ فمتولتر است. پارامتر RDW-CV حاصل تقسیم انحراف معیار بر میانگین حجم (MCV) است؛



طبقه بندی سلول ها در کانال پروکسیداز

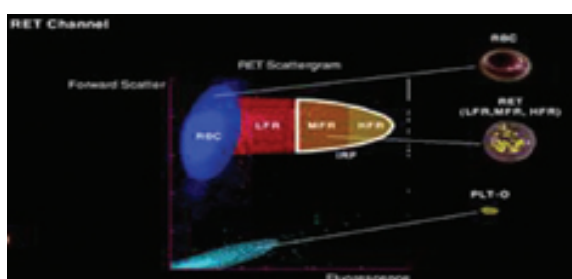
گرانول های بازوفیل دارای هپارین است و با این ویژگی پذیرای رنگ هایی مانند آلسین بلو و یا آسترا بلو می باشد که با سنجش جذب نور توسط سلول پس از رنگ آمیزی می توان آن را شناسایی کرد.

تشخیص هموگلوبینو پاتی با خطای اندازه گیری هموگلوبین A2

میانگین نرمال هموگلوبین A2 برای اشخاص سالم

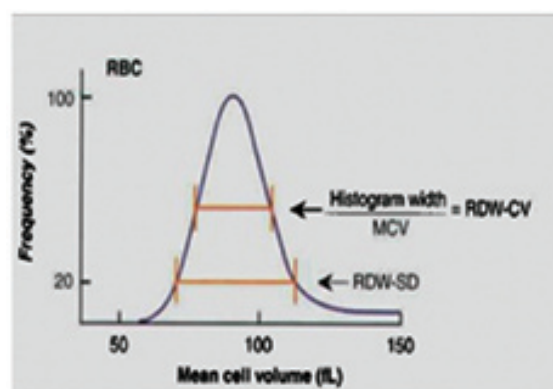
تشخیص سندرم های همراه با گلبول های شکسته با مغایرت شمارش پلاکت اپتیک و امپدانس

با به کارگیری رنگ فلورسانس تیازول نارنجی می توان رتیکولوسیت ها را بر مبنای شدت فلورسانس در سه دسته جای داد. رتیکولوسیت با فلورسانس بالا (HFR) بیانگر رتیکولوسیت های نارس و یا رتیکولوسیت های تحت استرس می باشد. با شمارش پلاکت ها به روش اپتیک (PLT-O) می توان پلاکت ها را از گلبول های قرمز شکسته جدا کرد. چنانچه مغایرت چشمگیر بین شمارش امپدانس و اپتیک باشد باید گلبول های شکسته شده را مد نظر داشت. (۷ و ۸)



اسکترگرام رتیکولوسیت ها و پلاکت ها بر اساس اندازه و شدت فلورسانس

بنابراین در تفسیر آن باید دقت کرد. اگر انحراف معیار RDW-SD به علت تنوع اندازه افزایش داشته باشد و هم زمان میانگین حجم هم افزایش داشته باشد، مقدار RDW-CV با وجود تغییرات اندازه (آنیزوسیتوز) طبیعی می شود. یک پهنای انحراف طبیعی با گلبول های یکدست ولی با کاهش میانگین حجم منجر به افزایش RDW-CV می گردد. در این موارد مشاهده هیستوگرام کمک کننده است. مقدار RDW-SD حدودا معادل سه انحراف معیار (3SD) است. (۷)



References

- 1- Barbara J. Bain: Hemoglobinopathy diagnosis, 2nd ed, 2006, Blackwell.
- 2- Ronald Hoffman: Hematology, 5th ed 2009, Churchill Livingstone.
- 3- John P. Greer: Wintrobe's Clinical Hematology, 12th ed, 2009, Lippincott.
- 4- Denis R Miller: Blood disease of infancy and childhood, 6th ed. Dacie and Lewis: Practical Hematology, 12ed, 2006, Churchill Livingstones.
- 5- Richard A. Mc Pherson: Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Method, 21& 22 ed, 2007-2012, Elsevier.
- 6- Rowan R.M. England J.M: Automation and Quality assurance in Hematology; 1986; Oxford Blackwell.
- 7- Shirlyn B. McKenzie; Clinical Laboratory Hematology 2006-2010 Pearson Education.
- 8- Rodak; Hematology Clinical Practice and application 2nd & 3th ed, 2002-2011, W.B Saunders Company.