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

ممکن است با نگاه اول کمی تعجب کنید که چگونه با خطاهای آزمایشگاهی می‌توان به نکات تشخیصی برای برخی از بیماری های خون رسید. گفتنی است که گاهی خطاهای آنالیزور، خطای نمونه، خطای آنالیز با تغییرات درجه حرارت نمونه و خطا در شمارش سلول ها می تواند سر نخ های تشخیصی را ارائه دهد.

برای مثال شکنندگی و ترد بودن سلول های لنفوسیت B سرطانی در بیمار مبتلا به لوسمی مزمن لنفوسیتیک تعداد زیادی سلول های اسماج در خون محیطی تولید می کند. سلول های اسماج در گردش خون این بیماران وجود ندارد، بلکه ضربه و فشار وارده بر خون در هنگام تهیه گستره محیطی موجب تولید سلول های اسماج می شود که در واقع یک آرتیفکت یا خطای آزمایشگاهی می باشد و می توان با پایدار کردن غشا و افزودن یک تا دو قطره آلبومین ۲۲٪ به خون که در بانک خون استفاده می شود از اسماج شدن سلول ها 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.

بیماری های دیگر مانند سیاه سرفه و لنفوسیتوز عفونی (infections Lymphocytosis) که نمای لنفوسیتوز دارند غالبا 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 شده اند. سرفه برای بیشتر از ٦ 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 قرار گیرد نه تنها راهی برای تشخیص لوسمی CLL باز می‌کند، بلکه می تواند آن را از لنفوسیتوز واکنشی جدا کند. به مثال های دیگر تشخیص بیماری های خون با خطاهای آزمایشگاهی توجه کنید. (۷)

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

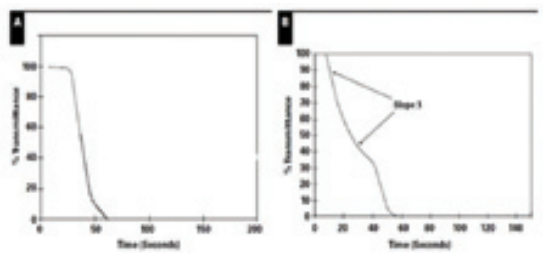
در دستگاه های کوآگولومتر نوری سنجش زمان لخته شدن پلاسما (clot end point) در آزمایش PTT به محض ایجاد تغییر ناگهانی در عبور نور تابشی (transmittance) به صورت یک منحنی تک موج ثبت می گردد.

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

بدین مفهوم که در مواردی قبل از لخته شدن پلاسما در تست PTT نخست ذرات رسوبی، شکل می گیرند به طوری که آزمایش کننده آن را به اشتباه نقطه پایان آزمایش قلمداد می کند. 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 می گردد که این مرحله به عنوان نقطه پایان تست (end point) در کوآگولومتر گزارش می گردد. بنابراین چنانچه گراف زمان لخته شدن پلاسما در ارتباط با عبور نور (transmittance) رسم شود یک منحنی دو فازه به دست می دهد. فاز اولیه کاهش عبور نور از لوله آزمایش در رابطه با ذرات رسوبی شکل یافته از کمپلکس های CRP (C-reactive protein) با

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-02-23]

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 مواج 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 عفونت‌های 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.

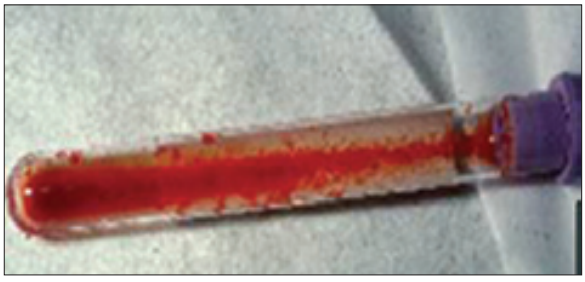
کنترل کیفی نمونه خون با خطا در پارامتر MCHC (Mean cell hemoglobin concentration)

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

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

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 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 سلول‌های B یا بیماری های عفونی مانند منونوکلئوز عفونی یا عفونت مایکوپلاسمایی باشد.

گرچه پارامتر MCH درموارد 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 پرآب 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

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-02-23]

قرمز شـده که نتیجه آن جـذب آب از محلول های ایزوتون دسـتگاه آنالیزور بوده که افزایـش 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 شـدن هموگلوبین در درون گلبول های قرمز است.

تشخیص هموگلوبینوپاتی با خطای افزایش کاذب هموگلوبین

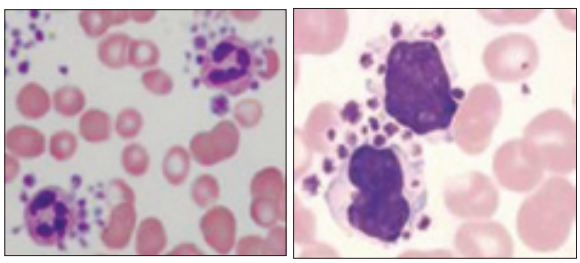
ممکـن اسـت گلبول هـای قرمز جنیـن و نـوزاد و نیز گلبول‌های قرمز حاوی هموگلوبیـن های غیر طبیعی (مانند هموگلوبین‌های D، S و E و O و ...) و نیز گلبول های قرمز با انباشتگی غشا از چربی در محلول لیز آنالیزور پاره نشده و موجب لکوسیتوز کاذب و افزایش کاذب هموگلوبین گردند. گلبول های قرمز لیز نشـده ممکن اسـت به جای لنفوسیت شـمرده شـده و با شـمارش افتراقی معکوس روبرو شوید، بدین مفهوم که درصد سـلول های لنفوسـیت بسـیار بیشتر از نوتروفیـل گزارش می شـود. 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 توسـط آنالیزور و مغایرت با مطالعه از روی تخمین گسـتره محیطی ممکن است که ما را در شناخت یک هموگلوبینوپاتی ناشناخته یا وجود کرایوگلوبولین یا کرایوفیبرینوژن یاری کند. گلبول های قرمز تارگت در یرقان انسدادی به علت انباشتگی غشـا از چربی و گلبول های قرمز حـاوی 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

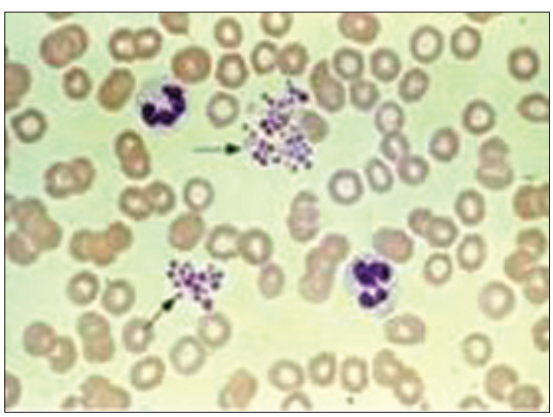
پدیده اقماری پلاکت ها و پدیده تجمع پلاکتی به صورت دستجات چند تایی در سرتاسر گستره محیطی در تعدادی از بیماران در ضد انعقادهای EDTA رخ می دهد. (۵ و ۷)

برخی از افـراد دارای آنتی بادی های ضد پلاکتی بوده که تنها در حرارت اتاق و در حضور املاح EDTA فعال شـده و با پلاکت هـا کمپلکس ایمنی می دهند. این کمپلکس‌های ایمنی جذب سطحی نوتروفیل، لنفوسیت و منوسیت از طریق گیرنده FC گشـته و از اینرو پلاکت ها به صورت حلقه زده به دور نوتروفیل ها یا منوسـیت در می آیند که به آن پدیده اقمـاری گویند. پدیده اقماری پلاکـت ارزش گزارش برای پزشـک ندارد و یکـی از عوامل مهم کاهـش کاذب پلاکت است. (۳)



پدیده اقماری پلاکتی

گاهـی آنتی بادی های ضـد پلاکتی موجب تجمع پلاکتی به صورت دسـتجات چند تایی در سرتاسـر گستره محیطی در حضـور نمک EDTA می شـود. گفتنی اسـت که این تجمعات پلاکتی به عنوان گلبول قرمز یا سـفید شمرده شده و موجب کاهش کاذب پلاکت ها و افزایش کاذب شـمارش گلبول های سـفید می گردند اخیـرا در تعدادی از بیماران با پدیـده اقماری و تجمع پلاکتی، آزمایش های مثبت سـندرم ضد فسفو لیپید گزارش شده است.

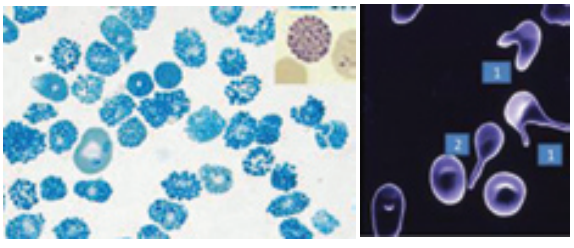


پدیده تجمع پلاکتی ناشی از فعال شدن آنتی بادی های پلاکتی در حضور EDTA

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-02-23]

تشخیص بیماری هموگلوبین اچ با خطای افزایش کاذب پلاکت

بیمـاری هموگلوبیـن اچ بـا مرفولوژی میکـرو- هیپو و تارگت سـل و گلبول های قطره اشکی کشیده شده نوک دار (tailed) و گلبـول با دو زایده (horn cell) همراه اسـت. گفتنی اسـت که بیشـترین خطای افزایش کاذب پلاکت در بیماری هموگلوبین اچ رخ می دهد و این به علت آن اسـت که میکروسیتوز شدید و گلبول های شکسته به جای پلاکت شـمرده می شـوند، جالب آن که با این خطای آزمایشگاهی می توان هموگلوبین اچ را تشـخیص داد، بدین مفهوم که با مرفولـوژی میکرو- هیپو و افزایـش کاذب پلاکت گاهی به صـورت ++++ یا حتی بالغ بر میلیون توسـط آنالیزور اقدام بـه 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 الیپتوسیتوز همولیتیک و پیرو پویی کیلوسیتوز نیز مشاهده شود. (۲)



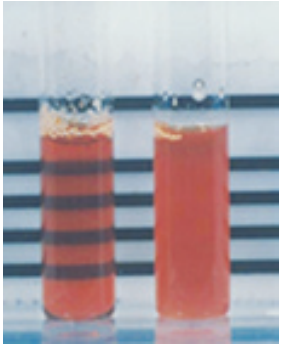
تشخیص فاکتور هفت پادوآ (Padua) با خطای غیر همخوانی درآزمایش PT

فاکتور هفت پادوا با معرف های بافتی تهیه شـده از منابع غیر انسانی (Nonhuman) به خوبی واکنش نداده و منجر بـه طولانی شـدن کاذب آزمایش PT می گـردد، در حالی کـه عملکرد آن در بـدن طبیعی بوده و بیمـار میل به خون ریزی ندارد. فاکتور ۷ پادوآ در نتیجه جایگزینی گلوتامین به جای آرژنین در موقعیت شماره ۳۰۴ فاکتور ۷ است. استفاده از معـرف بافتی با منبع انسـانی با نـوآوری DNA جواب صحیـح PT را به دسـت می دهد. از این رو سـفارش می شـود برای هر فردی که آزمایش PT طولانی دارد و سـابقه خـون ریزی و بیمـاری کبد ندارد، آزمایـش PT با معرف بافتی انسـانی کـه دارای ISI بین ۱/۲ تا ۱/۷ می باشـد نیز انجام شود. (۵)

تشـخیص هموگلوبینو پاتی بـا نتیجه کاذب مثبت در آزمایش حلالیت

اساس آزمایش:

هموگلوبین داسی (هموگلوبین S) در حضور دی تیونیت سـدیم که اکسـیژن محیطی را به خود می گیرد به وضعیت داکسـی (deoxy) در آمده و پلیمری می شـود. پلیمرهای هموگلوبین S در بافر فسـفات سـاپونین دار با مولاریته ۲/۳ نامحلول بوده و با ایجاد کدورت مانع از عبور نور می‌گردد.



لکوسـیتوز شـدید، افزایـش پروتئیـن هـای خـون (هیپرپروتئینمـی)، پاراپروتئین ها و هیپر لیپمی موجب مثبت کاذب آزمایش حلالیت می گردند. اسـتفاده از خون شسته و فشـرده، خطاهای فوق را برطرف می سـازد. با مثبت شدن آزمایش حلالیت باید برای تایید حضور هموگلوبین S اقدام به آزمایش الکتروفورز کرد.

هموگلوبیـن های ناپایدار، به ویژه بعد از برداشـته شـدن طحـال می تواننـد موجب مثبت کاذب به علت کدر شـدن معرف تست حلالیت به علت اجسام ها نیز گردد.

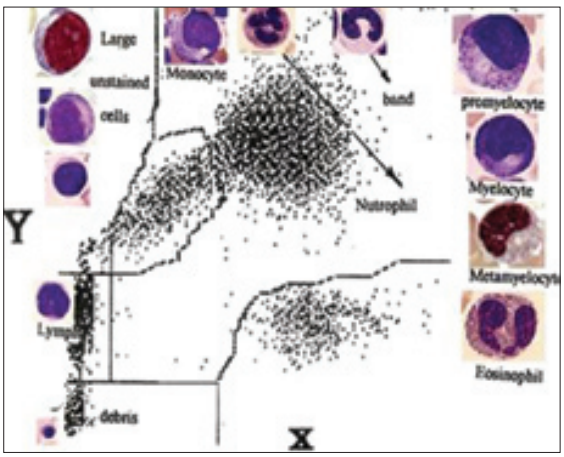
هموگلوبیـن هـای I و Setif که از واریـان های زنجیره الفا هسـتند در محیط آزمایشـگاه در محلول بافری آزمایش حلالیت پلیمری شده و ایجاد کدورت می کنند، از این رو در آزمایش حلالیت چنانچه خطـای نمونه علت واکنش کاذب نباشد باید هموگلوبینوپاتی فوق را مد نظر قرار داد. (۱و۸)

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 H1 با به کارگیری کانال پراکسـیداز و کانـال بازوفیل لوبولاریتی،

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-02-23]

از هم متمایز می شـوند. ائوزینوفیل و نوتروفیل و منوسـیت به ترتیب دارای بیشـترین خاصیت پراکسیداز در سیتوپلاسم هسـتند. گفتنی اسـت که بازوفیل ها در PH بسیار اسیدی و ائوزینوفیل در pH بسـیار قلیایی در مقابل لیز شدن بیشترین مقاومت را دارند، در حالی که بقیه سـلول ها به سـرعت لیز می شـوند و از اینرو براسـاس حجم سنجی پس از مجاورت خون با PH اسـیدی و یا قلیایی این دو سـلول در برخی از آنالیزورهای سیسـمکس از هم جدا می شـوند. گرانول های ائوزینوفیل و آلودگی گلبول های قرمز با انگل مالاریا موجب دپلاریـزه کردن نور و راهی برای افتـراق ائوزینوفیل و اعلام خطر بـرای انگل مالاریا باز می کند. فقدان یا کاهش شـدید آنزیم پروکسیداز در کمبود ارثی یا سندرم های پیش سرطانی موجب می شود که نوتروفیل ها در کانال پروکسیداز به اشتباه در گروه لنفوسـیت‌های بزرگ طبقه بندی گردند و از این رو شمارش نوتروفیل حتی نزدیک به صفر کاهش یابد، در حالی که گسـتره محیطی سلول های نوتروفیل را نشان داده و با این مغایرت می توان کاهش آنزیم را در نظر داشت. (٦)



طبقه بندی سلول ها در کانال پروکسیداز

گرانول های بازوفیل دارای هپارین اسـت و با این ویژگی پذیرای رنگ هایی مانند آلسـین بلو و یا آسـترا بلو می باشد که با سـنجش جذب نور توسط سـلول پس از رنگ آمیزی می‌توان آن را شناسایی کرد.

تشخیص هموگلوبینو پاتی با خطای اندازه گیری هموگلوبین A2

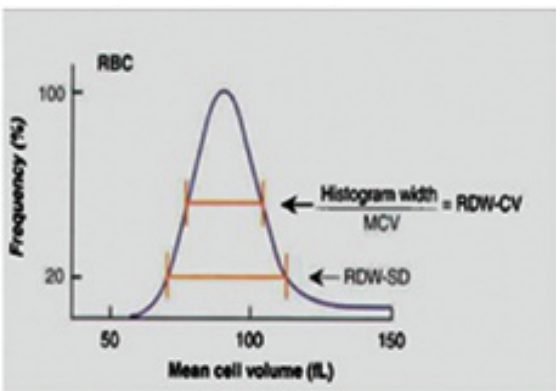
میانگیـن نرمـال هموگلوبین A2 برای اشـخاص سـالم ۰/۱۵ ± ۲/۵ و بـرای تالاسـمی هتروزیگـوت بتـا ۰/۲۷ ± ٤/۸ اسـت. گسـتره هموگلوبین A2 در افراد مبتلا به تالاسـمی مینور بتا از ۳/۵ تا ۸ درصد گزارش شده است. انـدازه گیری هموگلوبین A2 بایسـتی با دقت فراوان انجام گیرد چون گاهی تشـخیص تالاسـمی مینور بتـا با افزایش یک تا دو درصد بالاتر از سـطح نرمال اسـت. بهتر است که انـدازه گیری ها بـه صورت دوبل انجـام و میانگین جواب هـا گـزارش شـود. روش انـدازه گیـری هموگلوبین A2 دارای ضریـب مغایـرت (CV) روزانـه ۲٪ و گاهی تا ۵٪ گزارش شده است. بایستی همیشه یک نمونه کنترل با مقدار نرمـال هموگلوبین A2 و یک نمونـه با افزایش هموگلوبین A2 با هر سـری تسـت آزمایـش شـود. هموگلوبین های O, E, C و هیبرید S-G با این روش همراه با هموگلوبین A2 خارج مـی گردند. از این رو چنانچه مقدار هموگلوبین A2 بیشـتر 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. (٤)

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

پارامتـر تغییـرات انـدازه بـر حسـب انحـراف معیـار (RDW-SD) و ضریب تغییرات (RDW-CV) گزارش می شود. دامنه مرجع RDW-SD بین ٤٧-۳۹ فمتولیتر است و برابر با پهنای خطی اسـت که از ۲۰٪ فراوانی، هیستوگرام حجـم را قطع می کنـد و بیانگر تفاوت حجـم بزرگ ترین و کوچـک ترین گلبـول قرمز در ۸۰ درصد فراوانی اسـت. هر چه این دامنه بیشـتر باشـد به مفهوم تنوع بیشـتر اندازه گلبول قرمز اسـت. این پارامتر مسـتقیما از روی هیستوگرام حجم به دست می آید. برای مثال اگر این خط سمت راست منحنـی را در جایـگاه ۱۱۱ فمتولیتری و سـمت چپ را در جایـگاه ۷۰ فمتولیتری قطع کنـد، RDW-SD برابر با ٤۱ = ۷۰ - ۱۱۱ فمتولیتـر اسـت. پارامتر RDW-CV حاصل تقسـیم انحراف معیار بـر میانگین حجم (MCV) اسـت؛

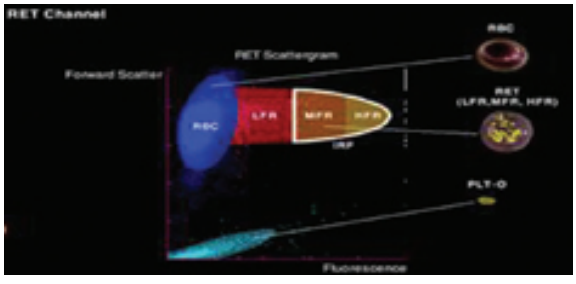
[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-02-23]

بنابرایــن در تفســیر آن بایــد دقت کرد. اگر انحــراف معیار RDW-SD به علت تنوع اندازه افزایش داشــته باشد و هم زمان میانگین حجم هم افزایش داشته باشد، مقدار RDW-CV با وجود تغییرات اندازه (آنیزوســیتوز) طبیعی می شود. یــک پهنای انحــراف طبیعی با گلبول های یکدســت ولی با کاهش میانگیــن حجم منجر به افزایــش RDW-CV می گردد. در این موارد مشــاهده هیستوگرام کمک کننده است. مقدار RDW-SD حدودا معادل سه انحراف معیار (3SD) است. (۷)



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

با بــه کارگیــری رنــگ فلورســانس تیــازول نارنجی مــی توان رتیکولوســیت‌ها 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 امپدانسی و اپتیک باشد باید گلبول های شکسته شده را مد نظر داشت. (۷و۸)



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

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.

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-02-23]