

خطاهای آزمایشگاهی در هماتولوژی: سرنخی برای تشخیص

• رضا رنجبران

دانشجوی دکترای تخصصی خون شناسی، مرکز تحقیقات علوم و فن آوری تشخیص آزمایشگاهی دانشکده پیراپزشکی شیراز

• دکتر حبیب الله گل افشار

عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی شیراز

golafshanh@sums.ac.ir

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 سپتیسمی (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 فیرینی 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 خطای در شمارش سلول‌ها می‌تواند سرنخ‌های تشخیصی را ارائه دهد.

برای مثال شکنندگی 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 وارد بر خون در هنگام تهیه گستره محیطی موجب تولید سلول‌های اسماج می‌شود که در واقع یک آرتیفیکت یا خطای آزمایشگاهی می‌باشد و می‌توان با پایدار کردن غشا و افروden 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 (infectious Lymphocytosis) که نمای لنفوسیتوز دارند غالباً با اسماج سل همراه نیستند. گفتنی است که واکسن بیماری سیاه سرفه ایمنی دائمی 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)



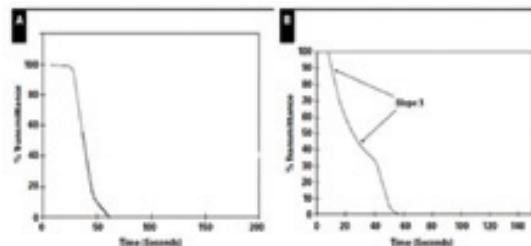
آگلوتیناسیون سرد قوی ممکن است ناشی از لنفوم سلول های B یا بیماری های عفونی مانند منونوکلئوز عفونی یا عفونت مایکوپلاسمایی باشد.

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 مرفوولوژی اسپرسیتوز، 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 پیش رفته 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 گردد، 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 کوآگلومتر 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 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.

کترل کیفی نمونه خون با خطای در پارامتر

(Mean cell hemoglobin concentration) MCHC

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

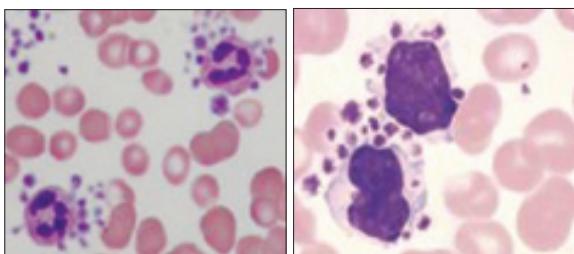
$$\frac{Hb}{MCV \times RBC}$$

ارزیابی پارامتر MCHC به عنوان کترول 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



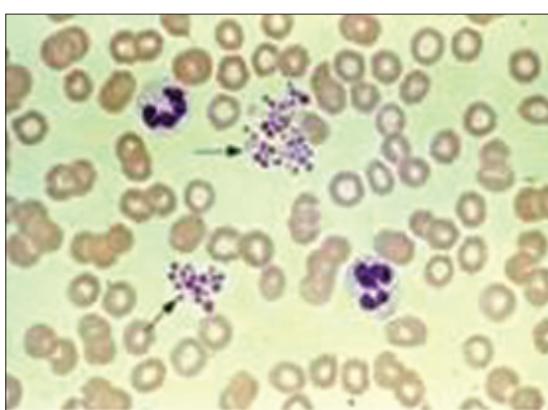


ایمنی جذب سطحی نوتروفیل، لنفوسیت و منوسیت از طریق گیرنده FC گشته و از اینرو پلاکت ها به صورت حلقه زده به دور نوتروفیل ها یا منوسیت در می آیند که به آن پدیده اقماری گویند. پدیده اقماری پلاکت ارزش گزارش برای پزشک ندارد و یکی از عوامل مهم کاهش کاذب پلاکت است. (۳)



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 تجمعات پلاکتی به عنوان گلبول قرمز یا سفید شمرده شده و موجب کاهش کاذب پلاکت ها و افزایش کاذب شمارش گلبول های سفید می گردد اخیرا در تعدادی از بیماران با پدیده اقماری و تجمع پلاکتی، آزمایش های مثبت سندروم ضد فسفو لیپید گزارش شده است.



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

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 D, S و O...) و نیز گلبول های قرمز با انباستگی غشا از چربی در محلول لیز آنالیزور پاره نشده و موجب لکوسیتوز کاذب و افزایش کاذب هموگلوبین گردد. گلبول های قرمز لیز نشده ممکن است به جای لنفوسیت شمرده شده و با شمارش افتراقی معکوس رو برو شوید، بدین مفهوم که درصد سلول های لنفوسیت بسیار بیشتر از نوتروفیل گزارش می شود. کرایو گلبولین 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 کرایو گلبولین یا کرایوفیرینوژن یاری کند. گلبول های قرمز تارگت در یرقان انسدادی به علت انباستگی 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.

سندروم ضد فسفولیپید و خطای شمارش پلاکت ها در پدیده اقماری پلاکت ها

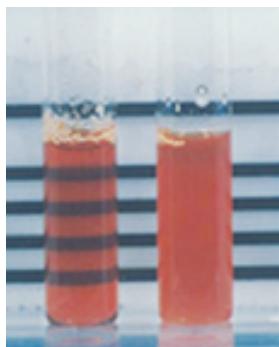
پدیده اقماری پلاکت ها و پدیده تجمع پلاکتی به صورت دستجات چند تایی در سرتاسر گستره محیطی در تعدادی از بیماران در ضد انعقادهای EDTA رخ می دهد. (۵ و ۷) برخی از افراد دارای آنتی بادی های ضد پلاکتی بوده که تنها در حرارت اتفاق و در حضور املاح EDTA فعل شده و با پلاکت ها کمپلکس ایمنی می دهن. این کمپلکس های



تشخیص همو گلوبینو پاتی با نتیجه کاذب مثبت در آزمایش حلالیت

اساس آزمایش:

هموگلوبین داسی (hemoglobin S) در حضور دی تیونیت سدیم که اکسیژن محیطی را به خود می گیرد به وضعیت داکسی (deoxy) در آمد 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 مشتبه شدن آزمایش حلالیت باید برای تایید حضور هموگلوبین S اقدام به آزمایش الکتروفورز کرد.

هموگلوبین های نایابدار، 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.

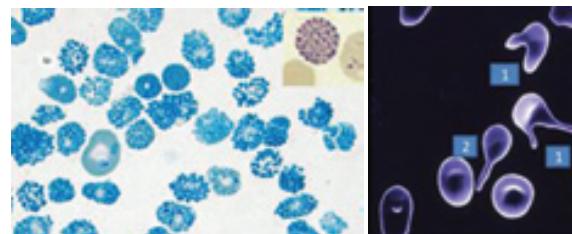
هموگلوبین های I و Setif که از واریان های زنجیره alfa هستند در محیط آزمایشگاه در محلول بافری آزمایش حلالیت پلیمری شده و ایجاد کدورت می کنند، از این رو در آزمایش حلالیت چنانچه خطای نمونه علت واکنش کاذب نباشد باید هموگلوبینوپاتی فوق را مدنظر قرار داد. (۸و۱)

خطای افتراق گلbul های سفید و احتمالات تشخیص

در آنالیزورها از خواص گوناگون سلول جهت افتراق آن ها از یکدیگر استفاده می شود. گلbul های سفید در تکنیکون H1 با به کارگیری کanal پراکسیداز و کanal بازوفیل لوبلواریتی،

تشخیص بیماری هموگلوبین اچ با خطای افزایش کاذب پلاکت

بیماری هموگلوبین اچ با مرفلوژی میکرو- هیپو و تارگت سل و گلبول های قطره اشکی کشیده شده نوک دار (tailed) و گلبول با دو زایده (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 مرفلوژی 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 مرفلوژی توب گلف کنید و یا باند آن را در الکتروفورز مشاهده کنید. پذیده 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)

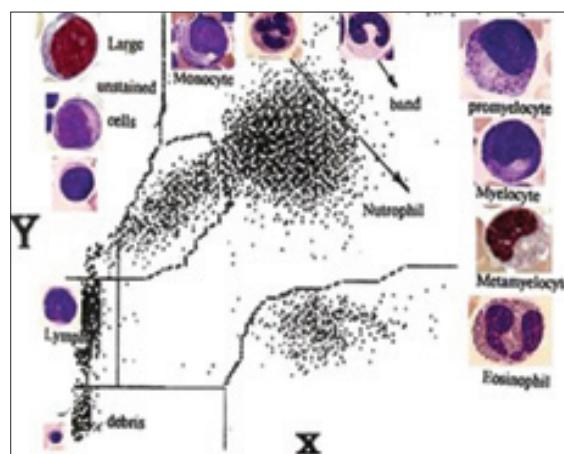


$0/15 \pm 2/5$ و برای تالاسمی هتروزیگوت بتا $0/27 \pm 4/8$ است. گستره هموگلوبین A2 در افراد مبتلا به تالاسمی مینور بتا از $3/5$ تا 8 درصد گزارش شده است. اندازه گیری هموگلوبین A2 بایستی با دقت فراوان انجام گیرد چون گاهی تشخیص تالاسمی مینور بتا با افزایش یک تا دو درصد بالاتر از سطح نرمال است. بهتر است که اندازه گیری ها به صورت دوبل انجام و میانگین جواب A2 گزارش شود. روش اندازه گیری هموگلوبین A2 دارای ضریب مغایرت (CV) روزانه $\leq 2\%$ و گاهی تا 5% 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 A2, C, E, O, S-G و هیبرید با این روش همراه با هموگلوبین A2 خارج می گردند. از این رو چنانچه مقدار هموگلوبین A2 بیشتر از 10% کل هموگلوبین شود بیانگر حضور یک مغایر یا واریانت هموگلوبین است. افزایش بیش از 8 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 مرغولوژی 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 $39-47$ فمتولیتر است و برابر با پهنای خطی است که از 20% فراوانی، هیستوگرام حجم را قطع می کند و بیانگر تفاوت حجم بزرگ ترین و کوچک ترین گلبول قرمز در 80 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 111 فمتولیتری و سمت چپ را در جایگاه 70 فمتولیتری قطع کند، $RDW-SD = 41 - 70 = 111 - 70 = 41$ فمتولیتر است. پارامتر RDW-CV حاصل تقسیم انحراف معیار بر میانگین حجم (MCV) است؛

از هم متمایز می شوند. ائوزینوفیل و نوتروفیل و منosit به ترتیب دارای بیشترین خاصیت پراکسیداز در سیتوپلاسم هستند. گفتنی است که بازوфیل ها در pH بسیار اسیدی و ائوزینوفیل در pH بسیار قلیابی 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 قلیابی این دو سلول در برخی از آنالیزورهای سیسمکس از هم جدا می شوند. گرانول های ائوزینوفیل و آلودگی گلبول های قرمز با انگل مالاریا موجب دپلاریزه کردن نور و راهی برای افتراق ائوزینوفیل و اعلام خطر برای انگل مالاریا باز می کند. فقطان یا کاهش شدید آنزیم پروکسیداز در کمبود ارثی یا سندروم های پیش سلطانی موجب می شود که نوتروفیل ها در کanal پروکسیداز به اشتباہ در گروه لنفوцит 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)



طبقه بندی سلول ها در کanal 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

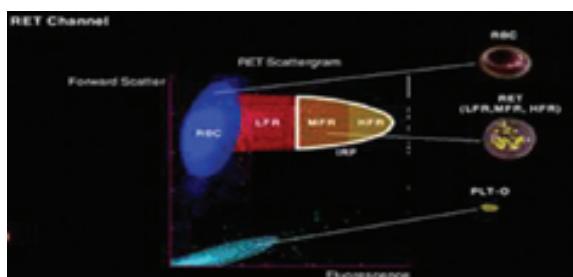
میانگین نرمال هموگلوبین A2 برای اشخاص سالم





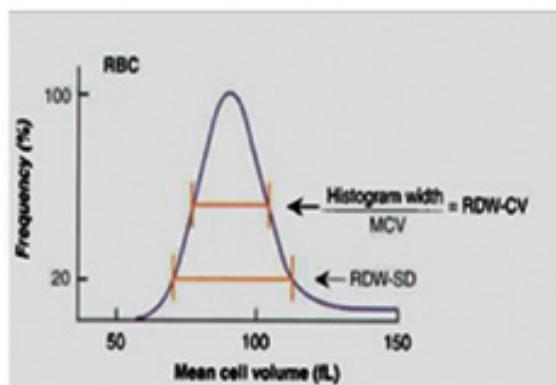
تشخیص سندروم های همراه با گلbul های شکسته با مغایرت شمارش پلاکت اپتیک و امپدانس

با به کارگیری رنگ فلورسانس تیازول نارنجی می توان رتیکولوسیت ها را برابر مبنای شدت فلورسانس در سه دسته جای داد. رتیکولوسیت بافلورسانس بالا (HFR) بینگر 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 گلbul های قرمز شکسته جدا کرد. چنانچه مغایرت چشمگیر بین شمارش امپدانسی و اپتیک باید گلbul های شکسته شده را مدنظر داشت. (۷)



اسکتر گرام رتیکولوسیت ها و پلاکت ها بر اساس اندازه و شدت فلورسانس

بنابراین در تفسیر آن باید دقیق باشد. اگر انحراف معیار RDW-SD به علت تنوع اندازه افزایش داشته باشد، هم زمان میانگین حجم هم افزایش داشته باشد، مقدار RDW-CV با وجود تغییرات اندازه (آنیزو سیتوzu) طبیعی می شود. یک پنهانی انحراف طبیعی با گلbul 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 حدوداً معادل سه انحراف معیار (3SD) است. (۷)



References

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

