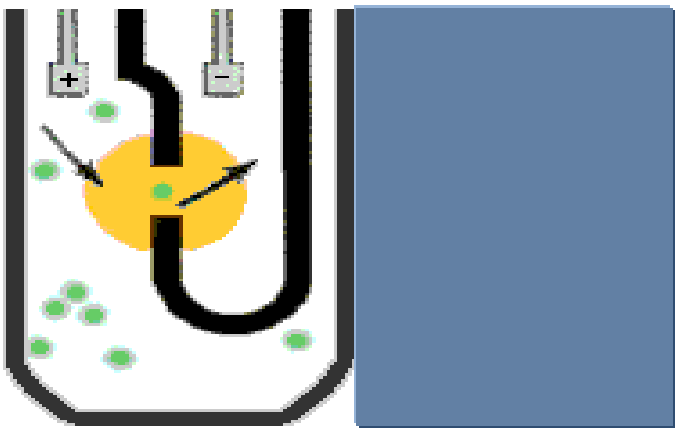
اساس کار، کنترل کیفی و کالیبراسیون آنالیزورهای خون شناسی

قسمت اول

دکتر حبیب‌اله گل‌افشان، عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی شیراز

آنالیزورهای آزمایشگاه خون شناسی دستگاه‌هایی هستند که دارای بخش‌های هیدرولیک و نوماتیک و الکترونیک می‌باشند. برداشتن محلول‌ها، برداشتن مقدار مشخص از نمونه، رقیق کردن نمونه و افزودن محلول‌های لیز کننده به خون توسط سیستم‌های هیدرولیک صورت می‌گیرد. ایجاد خلأ برای تولید فشار منفی برای باز و بسته کردن دریچه‌های دستگاه به عهده بخش نوماتیک (pneumatic) است. پردازش و تحلیل اطلاعات توسط سیستم الکترونیکی صورت گرفته و توسط کامپیوتر به داده‌های رایج هماتولوژی تبدیل می‌شود. آنالیزورهای نیمه اتوماتیک و تمام اتوماتیک قادر به اندازه‌گیری ۸ تا ۳۲ پارامتر هماتولوژی می‌باشند.

آنالیزورهای خون شناسی برای شمارش سلولی و افتراق سلول‌ها از روش‌های تغییر در هدایت الکتریکی یا امپدانس روزنه‌ای (aperture Impedance) و اصول نوری (اپتیک) بهره می‌برند. امپدانس روزنه‌ای از روش‌های بسیار رایج در شمارنده‌های سلولی است که نخستین بار در سال ۱۹۵۶ توسط والاش کولتر ابداع گردید. گفتنی است که سلول‌های خونی در برابر امواج مستقیم الکتریسیته (DC) به عنوان عایق بیولوژیک عمل می‌کنند. آنالیزور برای شمارش سلول‌های خون آن را در چامبر شمارش با محلول ایزوتون که هادی جریان الکتریسیته است رقیق می‌کند. در داخل چامبر شمارش، لوله‌ای استوانه‌ای قرار دارد که از طریق یک روزنه (aperture) با چامبر شمارش در رابطه است. بین الکترود خارجی در چامبر و الکترود داخلی که در لوله استوانه‌ای است یک جریان الکتریکی پیوسته با فرکانس پایین از طریق روزنه برقرار است. با نیروی مکش (خلأ) حجم خاصی از سوسپانسیون سلولی از چامبر شمارش به داخل لوله استوانه‌ای از طریق روزنه کشیده می‌شود. فکر می‌کنید با عبور هر سلول از روزنه چه اتفاقی رخ می‌دهد؟ هر سلول به تناسب حجم و اندازه خود در هنگام عبور از منطقه حساس شمارش (روزنه) ایجاد مقاومتی در هدایت جریان الکتریکی می‌کند و یا به عبارت دیگر ایجاد یک پالس یا نبض الکتریکی می‌کند.



در امپدانس روزنه‌ای هرسلول حین عبور از روزنه به تناسب حجم خود ایجاد مقاومت می‌کند.

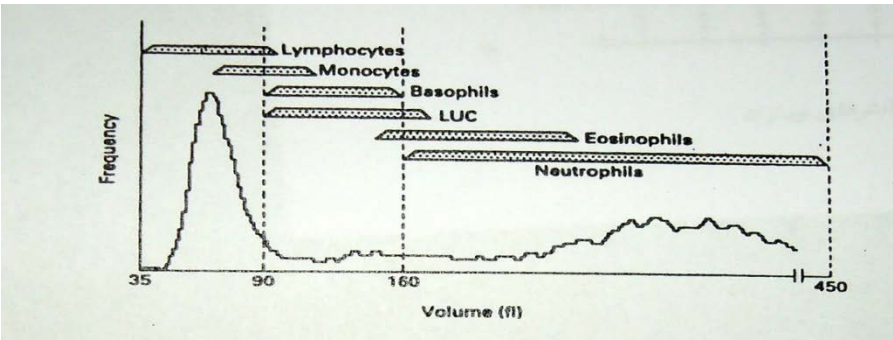
ارتفاع و دامنه این پالس الکتریکی یا تغییر ولتاژی متناسب با حجم سلول است. آنالیزور هر پالس را به عنوان یک ذره یا سلول قلمداد می‌کند و از این رو نه تنها سلول‌ها را شمارش کرده بلکه قادر است سلول‌های خون را بر اساس دامنه و ارتفاع پالس‌های الکتریکی طبقه بندی کند. آنالیزور برای شمارش گلبول‌های سفید همان کاری را می‌کند که ما برای شمارش گلبول‌های سفید در آزمایشگاه انجام می‌دهیم؛ بدین مفهوم که خون با روش دستی در ملانژور گلبول سفید با محلول تورک برای لیز کردن گلبول‌های قرمز رقیق می‌شود. آنالیزور برای شمارش گلبول‌های سفید، نخست نمونه خون را رقیق کرده و به آن معرف لایزینگ (lysing) اضافه می‌کند. معرف لایزینگ نه تنها گلبول‌های قرمز را لیز می‌کند بلکه با تبدیل هموگلوبین به سیانومت هموگلوبین اساس اندازه‌گیری اسپکتروفتومتری هموگلوبین را نیز فراهم می‌کند.

آنالیزور برای شمارش گلبول‌های قرمز و پلاکت از چامبر جداگانه استفاده می‌کند و تنها خون را مانند روش دستی با ایزوتون رقیق می‌کند ولی رقیق سازی خون در مقایسه با شمارش گلبول سفید بمراتب بیشتر است.

بیاد داشته باشید که در شرایط نرمال به ازای هر ۵۰۰ تا ۷۰۰ گلبول قرمز تنها یک عدد گلبول سفید در خون وجود دارد. این از یک طرف و رقیق سازی بیشتر خون از طرف دیگر موجب می‌شود که هر چند گلبول سفید در هنگام شمارش گلبول‌های قرمز لیز نشده باشد ولی خطای قابل ملاحظه در شمارش گلبول‌های قرمز ایجاد نمی‌گردد. البته لکوسیتوز با شمارش گلبول سفید بیشتر از ۳۰۰۰۰ یا ۵۰۰۰۰ نه تنها ایجاد خطا در شمارش گلبول‌های قرمز می‌کند، بلکه موجب افزایش حجم متوسط گلبول قرمز (MCV) می‌شود.

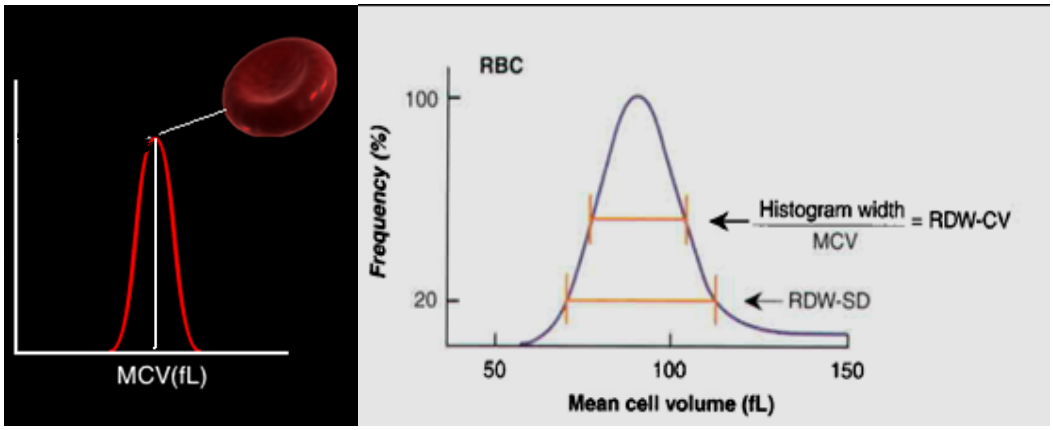
پالس‌های ایجاد شده از شمارش گلبول‌های قرمز و سفید و پلاکت بر مبنای ارتقاع و دامنه پالس دسته بندی شده و به صورت نمودار توزیع فراوانی یا هیستوگرام توزیع حجم ترسیم می‌شوند. در این نمودارها محور Y بیانگر تعداد نسبی سلول‌ها و محور X بر اساس حجم سلول درجه بندی می‌شود. در چامبر RBC/Plat پالس‌های زیر ۲ فمتولیتر (2fl) به عنوان آشغال و پالس‌های بین ۲ تا ۲۰ فمتولیتری به عنوان پلاکت و پالس‌های بین ۳۶ تا ۳۶۰ فمتولیتری به عنوان گلبول قرمز در نظر گرفته می‌شوند. در چامبر WBC/Hb پالس‌های ۹۰-۳۵ فمتولیتری به عنوان سلول‌های کوچک سفید یا لنفوسیت و پالس‌های بین ۹۰ تا ۱۶۰ فمتولیتر به عنوان سلول‌های مخلوط (Mixed cell) و پالس‌های بین ۴۵۰-۱۶۰ فمتولیتری به عنوان سلول‌های بزرگ یا نوتروفیل قلمداد می‌گردند. گفتنی است که سلول‌های منوسیت، بازوفیل، تعدادی از ائوزینوفیل‌ها و لنفوسیت‌های آتیپیک و سلول‌های بلاست از نظر الکتریکی هم پالس بوده و به عنوان سلول‌های مخلوط طبقه بندی می‌گردند. گفتنی است که گلبول‌های سفید در حجم واقعی خود مورد آنالیز قرار نمی‌گیرند. بلکه معرف لیز کننده در حالی که گلبول‌های قرمز را لیز کامل می‌کند قادر به ایجاد کردن منفذهایی در غشای گلبول‌های سفید است که موجب می‌شود غشای گلبول‌های سفید روی هسته سلول مچاله گردد و در این وضعیت آنها را مورد حجم سنجی قرار می‌دهد.

ضریب همخوانی در شمارش لنفوسیت‌ها به طریقه دستی و دستگاهی حدود ۸۵ درصد است که بیانگر دقت مناسب در تشخیص این سلول‌ها و تکرار پذیری در شمارش است. گر چه ضریب همخوانی برای گرانولوسیت‌ها نیز قابل قبول است ولی برای سلول‌های مخلوط از همخوانی قابل قبول برخوردار نیست. اینگونه آنالیزورها که گلبول‌های سفید را در سه دسته کلاسه بندی می‌کنند تحت عنوان آنالیزوهای 3diff یا سه قسمتی مشهورند.



در هیستوگرام سه قسمتی گلبول‌های سفید حجم‌های بین ۳۵ تا ۹۰ فمتولیتری به عنوان لنفوسیت و بین ۹۰ تا ۱۶۰ به عنوان سلول‌های حد واسط و بین ۱۶۰ تا ۴۵۰ به عنوان گرانولوسیت‌ها قلمداد می‌شود.

هیستوگرام گلبول قرمز در افراد سالم زنگوله‌ای شکل است و نقطه اوج آن بیانگر حجم متوسط سلولی است. رسم خط میانه در هیستوگرام گلبول‌های قرمز محور X را در عدد MCV یا حجم متوسط گلبول قرمز قطع می‌کند. توجه داشته باشید که با رسم خط میانه در هیستوگرام، کل گلبول‌های قرمز به دو نصف تقسیم می‌شود. پس گلبولی که در رأس منحنی زنگوله‌ای قرار می‌گیرد گلبول قرمز نماینده است که حجم آن برابر MCV است. در افراد نرمال مقدار MCV در محدوده ۹۵-۸۰ فمتولیتر قرار می‌گیرد. پهنای منحنی زنگوله‌ای شکل بیانگر پراکندگی گلبول قرمز است و هر چه پهن‌تر باشد گلبول‌های قرمز دارای اختلاف اندازه بیشتری هستند. پهنای خطی که از ۲۰٪ فراوانی هیستوگرام گلبول قرمز را قطع کند به عنوان شاخص RDW (Red cell distribution width) بر حسب SD (انحراف معیار) است که در افراد نرمال ۴۲â۳ فمتولیتر است. بدین مفهوم که این مقدار از پهنا برحسب فمتولیتر که تقاطع این خط با هیستوگرام ایجاد کرده معادل تغییرات اندازه در 3SD یا سه انحراف معیار است.



رسم خط میانه محور X را در هیستوگرام حجم در مقدار MCV قطع می‌کند. پهنای خطی که از ۲۰٪ فراوانی هیستوگرام حجم را قطع می‌کند به عنوان پارامتر RDW در نظر گرفته می‌شود که معادل (3SD) یا انحراف معیار می‌باشد. برای محاسبه RDW بر حسبCV مقدار 1SD بر MCV تقسیم شده و حاصل آن در عدد ۱۰۰ ضرب می‌شود.

چنانچه مقدار یک انحراف معیار (یک SD) بر میانگین حجم سلولی (MCV) تقسیم و حاصل در عدد ۱۰۰ ضرب شود، مقدار RDW برحسب CV محاسبه می‌گردد که مقدار طبیعی آن ۱۴/۵- ۱۱ درصد است. پارامتر RDW یا دامنه توزیع حجم بیانگر پراکندگی حجم گلبول‌های قرمز است که شاخصی برای انیزوسیتوز یا تغییرات اندازه است. پارامتر RDW بر حسب SD تفاوت حجم بزرگترین از کوچک‌ترین گلبول قرمز را بر حسب فمتولیتر نشان می‌دهد.

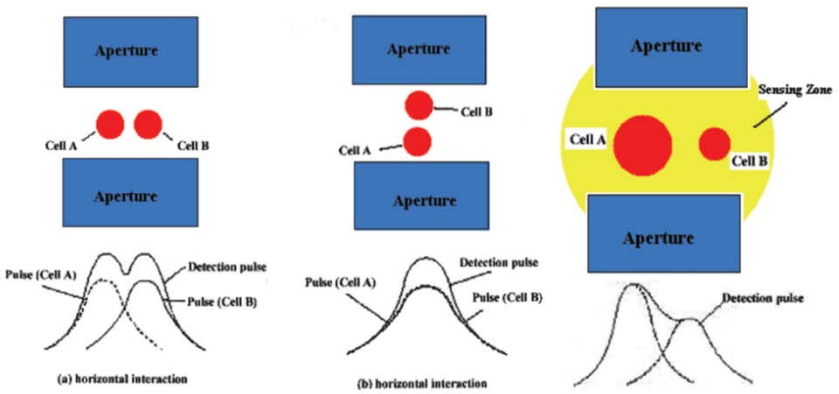
از حاصل ضرب حجم متوسط سلولی (MCV) در شمارش گلبول‌های قرمز، حجم فشرده گلبول‌های قرمز(PCV) یا هماتوکریت بدست می‌آید. پارامتر (MCH) یا میانگین وزن هموگلوبین در گلبول قرمز از تقسیم میزان هموگلوبین (gr%) بر تعداد گلبول‌های قرمز بر حسب میلیون و پارامتر MCHC از حاصل تقسیم هموگلوبین بر هماتوکریت بدست می‌آید.

عوامل مداخل کننده در آنالیزورهای امپدانسی

ابعاد روزنه برای شمارش گلبول‌های سفید معمولاً دارای قطر ۱۰۰ و طول ۵۰ میکرون و مربوط به شمارش گلبول‌های قرمز و پلاکت دارای قطر ۵۰ و طول ۷۰ میکرون است. طول بلندتر باعث کمک به تمرکز جریان سلولی در وسط روزنه جهت دستیابی بهتر برای شمارش و تحلیل دقیق‌تر از حجم سلولی جهت ترسیم هیستوگرام است. مهم‌ترین عوامل مداخله‌گر در آنالیزورها عبارتند از :

۱- پدیده عبور همزمانی (Coincidence error):

عبور همزمان چند سلول از روزنه ایجاد یک نبض الکتریکی پهن می‌کند که به عنوان یک سلول بزرگ شمرده می‌شود. خطای عبور همزمان در آگلوتیناسیون سرد و لکوسیتوز و پرخونی افزایش می‌یابد که نتیجه آن کاهش کاذب شمارش سلولی است. عبور همزمان دو سلول در یک ستون افقی از روزنه ایجاد نبض M شکل و عبور در ستون عمودی ایجاد نبض تک موج پهن می‌کند. در برخی از آنالیزورها یک فرمول تصحیح برای عبور همزمانی با توجه به رقت نمونه و قطر روزنه تعبیه شده است.



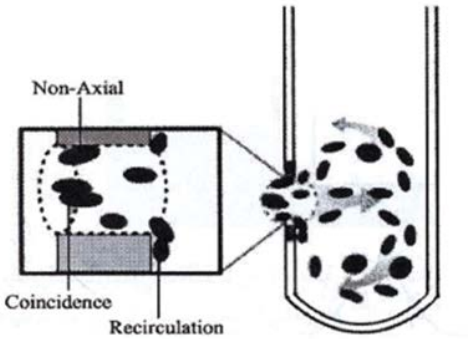
عبور همزمان سلول‌ها از روزنه شمارش موجب تولید موج M شکل یا موج ناهنجار بزرگ و پهن می‌گردد.

۲- عبور غیر مرکزی سلول‌ها از روزنه (aperture off):

حجم سنجی دقیق یک سلول زمانی صورت می‌گیرد که سلول، درست از مرکز روزنه عبور کند. عبور سلول از کناره‌های روزنه و یا حرکت غیر محوری ایجاد پالس‌های ناهنجار می‌کند.

۳- پدیده گردابی یا بازگردشی (pulse recirculation):

امکان دارد که خروج سلول از روزنه با حرکت گردابی و نزدیک شدن دوباره سلول به روزنه همراه شود که فرایند آن تولید پالس‌هایی با دامنه کوتاه شبیه پالس‌های پلاکتی و در نتیجه افزایش کاذب پلاکت‌ها خواهد بود. برخی از آنالیزورها با استفاده از جریان جاروب کننده که در پشت ناحیه حساس روزنه قرار دارد سلول‌های شمرده شده را از ناحیه روزنه دور می‌کنند.



پدیده گردابی یا بازگردشی

برای کاهش پدیده عبور همزمانی و بازگردشـــی از تکنولوژی تمرکز هیدرودینامیک یا از مایع غلاف (sheath fluid) استفاده می‌شود. مایع شیت دارای دانستیه بالا بوده و مانند غلافی مسیر عبور سوسپانسیون را از روزنه احاطه می‌کند و از این رو موجب می‌شود که سلول‌ها در یک حرکت خطی (Laminar flow) از مرکز روزنه عبور کنند.

منابع خطا در شمارش گلبول‌های سفید

الف- لکوسیتوز کاذب

گلبول‌های قرمز مقاوم در برابر محلول لایزینگ دستگاه موجب افزایش کاذب شمارش گلبول‌های سفید هم به روش دستی و هم دستگاهی می‌گردند. چنانچه گلبول قرمز لیز نگردد در آنالیزور به عنوان لنفوسیت

قلمداد می‌گردند و از این رو با شمارش افتراقی معکوس که درصد لنفوسیت بسیار بیشتر از نوتروفیل است همراه می‌گردد. لیز نشدن کامل RBC در موارد گوناگونی رخ می‌دهد که مهم‌ترین آنها عبارتند از: حضور گلبول‌های قرمز هسته‌دار، تجمع پلاکت‌ها که در آنالیزور به عنوان یک گلبول سفید تلقی می‌گردد، گلبول‌های F دوران جنینی- نوزادی، پلاکت‌های ژیانت، هموگلوبینوپاتی‌ها، تارگت سل در بیماری‌های کبدی که سطحی آغشته از چربی دارند، کرایوگلوبولین و پاراپروتئین‌ها، هیپرلیپیدمی و حضور شیلومیکرون، شیزونت و گامت مالاریا.

کرایوگلوبولین‌ها در سرما یا حرارت اتاق رسوب کرده و ممکن است به صورت ساختارهای کریستالی، ژله‌ای، آمورف، ذرات کروی آزاد و فاگوسیت شده در گستره محیطی مشاهده شوند. این پروتئین‌ها در بیماری‌های خود ایمن و اختلالات لنفوپرولیفراتیو و بیماری‌های ویروسی بویژه هپاتیت C مشاهده می‌گردند.

واکنش رولکس به علت اینکه در رقیق کننده‌های آنالیزور از هم باز می‌شود معمولاً موجب خطا نمی‌گردد، ولی بندرت آگلوتینین‌های سرد قوی ممکن است لیز نشده و با لکوسیتوز کاذب همراه باشند. گفتنی است که اکثر مواردی که با لکوسیتوز کاذب همراهی دارند موجب افزایش کاذب هموگلوبین و کدورت محلول درابکین هم می‌گردند و جالب است که با این پدیده‌ها و خطاهای آزمایشگاهی ممکن است گاهی بتوان یک هموگلوبیتوپاتی ناشناخته را تشخیص داد.

خطای انتقال (carry – over) نیز امکان لکوسیتوز کاذب یا نرمال شدن سطح لکوسیت در بیمار مبتلا به لکوپنی را بدنبال دارد. در این حالت چنانچه نمونه یک بیمار مبتلا به لکوسیتوز به آنالیزور داده شود و بعد یک نمونه لکوپنی مورد آنالیز قرار گیرد آلودگی چامبر شمارش با گلبول‌های سفید نمونه قبلی به علت شستشوی ناکافی دستگاه موجب انتقال گلبول‌های سفید به نمونه بیمار مبتلا به لکوپنی می‌گردد. توجه داشته باشید که عمل شستشوی دستگاه‌ها برای تمام نمونه‌ها یکسان است.

در حالتی که نمونه دارای لکوسیتوز شدید است بایستی دستگاه را چندین بار شستشو داد و سپس نمونه بعدی را مورد آزمایش قرار داد.

لکوپنی کاذب

۱- از مهم‌ترین علت‌های لکوپنی کاذب می‌توان به خطای خطی بودن (Linearity) اشاره کرد. بدین مفهوم که گاهی شمارش زیاد گلبول‌های سفید خارج از محدوده خطی بودن آنالیزور است که در این حالت بایستی نمونه را یک به دو یا یک به سه با سالین رقیق کرد و به دستگاه داد.

۲- سلول‌های اسماج و ائوزینوفیل‌های ترد و شکسته شده به عنوان سلول شمرده نمی‌شوند.

۳- مانده شدن خون و از هم پاشیده شدن گلبول‌های سفید
۴- اورمی ممکن است موجب افزایش یا کاهش کاذب گلبول‌های سفید شود.
۵- لکوآگلوتینین یا تجمع گلبول‌های سفید به واسطه آتو آنتی‌بادی‌ها

منابع خطا در شمارش گلبول‌های قرمز

۱- پلاکت‌های ژیانت در آستانه شمارش RBC قرار می‌گیرند.
۲- لکوسیتوز شدید باعث افزایش شمارش RBC وافزایش کاذب MCV می‌شود، توجه داشته باشید که گلبول‌های سفید در هنگام شمارش گلبول‌های قرمز لایز نمی‌شوند.
۳- کرایوگلوبین و هیپرلیپیدمی به صورت ذرات سلولی شمرده می‌شوند.
۴- میکروسیتوز شدید موجب کاهش شمارش گلبول قرمز و شمرده شدن آنها بجای پلاکت می‌گردد.
۵- پدیده آگلوتیناسیون سرد موجب کاهش کاذب شمارش گلبول‌های قرمز به علت عبور همزمانی می‌شود.
۶- همولیز با کاهش چشمگیر گلبول‌های قرمز همراهی دارد.

منابع خطا در شمارش پلاکت‌ها

شمارش پلاکتی آنالیزور بایستی با تخمین شمارش پلاکتی از روی گستره محیطی همراه شود و این ناشی از منابع خطای جدی در شمارش پلاکتی آنالیزور می‌باشد. ذرات غیر سلولی از قبیل اجسام هاول‌ژولی، شیلومیکرون، کرایوگلوبولین و اجسام هاینز در آستانه شمارش پلاکتی آنالیزور قرار می‌گیرند. توجه داشته باشید که ذرات بین ۲ تا ۲۰ فمتولیتری به عنوان پلاکت قلمداد می‌گردند.

میکروسیتوز شدید و حضور گلبول‌های شکسته با افزایش کاذب شمارش پلاکت همراه است. بیشترین افزایش کاذب پلاکتی در بیماری هموگلوبین اچ رخ می‌دهد. هر وقت مرفولوژی میکروسیت هیپوکروم با افزایش کاذب شمارش پلاکتی در حدود میلیون همراه بود ولی گستره محیطی تعداد نرمال پلاکت را نشان دهد اقدام به تست توپ گلف برای هموگلوبین اچ کنید و چه جالب که با یک خطای آزمایشگاهی در شمارش پلاکت یک هموگلوبینوپاتی مهم تشخیص داده می‌شود.

حضور قطعات سیتوپلاسمی گلبول‌های سفید به ویژه در شیمی درمانی موجب افزایش کاذب پلاکت می‌گردد. ممکن است در کم‌خونی‌های الیپتوسیتوز همولیتیک و پیروپویی کیلوسیتوز ارثی و سوختگی حجم

متوسط سلولی برخی از گلبول‌های قرمز در آستانه ۳۰ تا ۵۰ فمتولیتر قرار گیرد و هم بجای پلاکت شمرده شوند.

گلبول‌های شکسته همراه با کاهش پلاکت علامت چند بیماری مهم از قبیل انعقاد داخل عروقی منتشره (DIC)، ترومبوسیتوپنی ترومبوتیک (TTP) و سندرم همولیتیک اورمیک (HUS) است. اگر تصحیح شمارش پلاکتی آنالیزور که به علت گلبول‌های شکسته افزایش کاذب دارد با گستره محیطی چک نشود تمام موارد اورژانس فوق که در صورت عدم تشخیص تهدید مرگ دارند ممکن است تشخیص داده نشوند.

برخی از آنالیزورهای پیشرفته براساس RNA و گرانول که در پلاکت وجود دارد آنها را از گلبول‌های شکسته جدا می‌کنند؛ برای مثال در برخی آنالیزورها پارامتری بنام PLT-O گزارش می‌شود که شمارش واقعی پلاکت‌ها را با سیستم نوری و براساس گرانول‌های موجود انجام داده و آنرا از شیزتوسیت بدون گرانول جدا می‌کند.

افزایش نامتناسب ضد انعقاد به نمونه خون موجب تورم پلاکتی می‌گردد، پلاکت متورم شده با ترکیدن و تولید پاره‌های پلاکتی موجب می‌شود که هر پاره پلاکت بجای پلاکت شمرده شده و موجب افزایش کاذب آن گردد.

ترومبوسیتوپنی کاذب شایع‌تر از ترومبوسیتوز کاذب است و از مهم‌ترین علت‌های آن حضور ذرات ریز لخته در خون، پدیده اقماری پلاکت‌ها و تجمع خوشه‌ای شکل پلاکت‌ها ناشی از فعال شدن آتوآنتی‌بادی‌های پلاکتی در حضور ضد انعقاد EDTA است.

پلاکت‌ها در پدیده اقماری به دور یک نوتروفیل یا منوسیت یا لنفوسیت به واسطه آنتی‌بادی حلقه زده و توسط آنالیزور مورد شمارش قرار نمی‌گیرند. پلاکت‌ها در پدیده تجمعی به صورت دستجات چند تایی در سراسر گستره محیطی مشاهده می‌شوند. هر تجمع توسط آنالیزور به عنوان یک گلبول سفید شمرده می‌شود و از این رو موجب افزایش کاذب گلبول‌های سفید و کاهش شمارش پلاکت می‌گردد.

پلاکت‌های درشت و ژیانت مانند در ابتلا به ترومبوسیتوپنی ایمونولوژیک یا سندرم برنارد، آنومالی مای‌هگلین و اختلالات لنفوپرولیفرایتو ممکن است در آستانه شمارش گلبول قرمز قرار گرفته و به عنوان پلاکت شمرده نشوند.

میزان حجم متوسط پلاکتی(MPV) تا یک ساعت بعد از نمونه‌گیری در ضد انعقاد EDTA افزایش یافته و پس از آن بین یک تا سه ساعت پایدار بوده و دوباره با گذشت زمان افزایش می‌یابد. آنالیزورهای امپدانس مقدار MPV را بیشتر از آنالیزورهای اپتیک گزارش می‌کند. تورم پلاکت در EDTA موجب بزرگ شدن

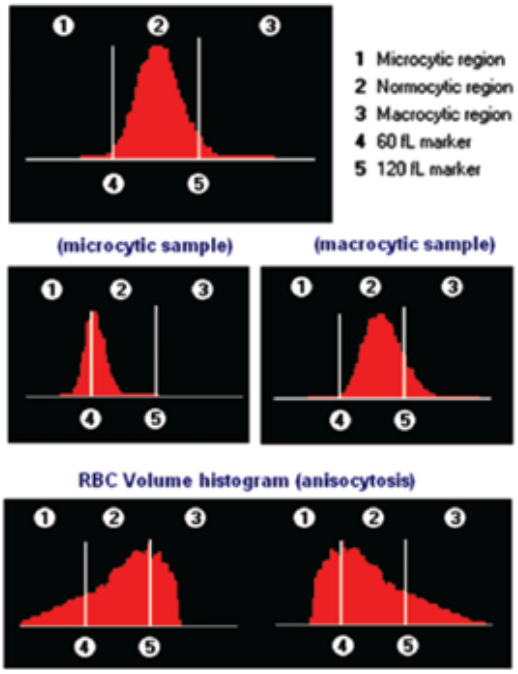
اندازه در سیستم‌های امپدانس شده در حالی که شفاف شدن سلول بر اثر تورم موجب کاهش پراکنش نور و گزارش حجم کمتر آن در سیستم‌های اپتیک می‌شود. رسم خط میانه هیستوگرام حجم پلاکتی را روی محور X در عدد MPV یا حجم متوسط پلاکتی قطع می‌کند.

میانگین حجم گلبول قرمز (Mean cell volume)

چنانچه یک گلبول قرمز را از میان گلبول‌های قرمز بدن به عنوان نماینده گلبول‌ها انتخاب کنید و آنرا مورد حجم سنجی قرار دهید به پارامتر حجم متوسط گلبول قرمز یا MCV دست یافته‌اید.

در آنالیزورهای خون شناسی مقدار MCV از روی هیستوگرام حجم گلبول‌های قرمز بدست می‌آید. هیستوگرام حجم یک منحنی زنگوله‌ای شکل است که در آن محور y بر حسب فراوانی و محور X بر حسب حجم بر مبنای فمتولیتر تقسیم بندی شده است. رسم خط میانه در هیستوگرام حجم محور X را در مقدار MCV قطع می‌کند. آنالیز حجم گلبول‌های قرمز توسط ۲۵۶ کانال صورت می‌گیرد؛ بدین مفهوم که اطلاعات دیجیتالی عبور هر سلول از روزنه توسط تحلیلگرهای ارتفاع پالس پردازش می‌شود و بدین ترتیب هیستوگرام‌های توزیع حجمی گلبول‌های قرمز و سفید و پلاکت ترسیم می‌گردد. (۲۵۶ کانال تحلیلگر پالس جهت آنالیز و رسم هیستوگرام RBC و WBC و ۶۵ کانال تحلیل پالس جهت آنالیز پلاکت‌ها و رسم هیستوگرام آن است).

دامنه پالس‌های RBC در محور X از حجم ۳۵ فمتولیتر تا ۲۰۰ فمتولیتر قرار می‌گیرد. ذرات ۲۰-۲ فمتولیتری به عنوان پلاکت و بزرگتر از ۳۶ فمتولیتر به عنوان گلبول قرمز شمارش می‌شوند. توجه داشته باشید که دامنه و ارتفاع پالس‌های الکتریکی توسط تحلیلگرها و تبدیل کننده‌های آنالیزور بر حسب حجم (فمتولیتر) تفسیر شده و هیستوگرام توزیع حجمی ترسیم می‌گردد. در هر کانال محدوده مشخصی از ارتفاع و دامنه مورد پردازش قرار گرفته و اطلاعات بدست آمده از مجموع ۲۵۶ کانال به صورت هیستوگرام ترسیم می‌شود.



با هیستوگرام حجم می‌توان جمعیت گلبول‌های میکروسیت و ماکروسیت و یا جمعیت دو شکلی را در میان گلبول‌های قرمز مشاهده کرد.

برای محاسبه دامنه پراکندگی گلبول‌های قرمز خطی که هیستوگرام حجم را در ۲۰٪ فراوانی (Frequency) قطع کند معادل 3SD (سه انحراف معیار) در نظر گرفته می‌شود. پهنای هیستوگرام با رسم این خط برابر RDW یا دامنه تغییرات حجم بر مبنای انحراف معیار یا SD (standard deviation) می‌باشد، سپس مقدار یک SD بر MCV تقسیم شده و حاصل در عدد ۱۰۰ ضرب می‌شود که نتیجه آن پارامتر RDW بر حسب CV یا ضریب تغییرات دامنه حجم است که مقدار نرمال آن ۱۴/۵-۱۱/۵ درصد است و بیشتر از ۱۴/۵ درصد بیانگر تغییرات اندازه (anisocytosis) است.

علل افزایش کاذب MCV در آنالیزورها

۱- مانده شدن خون EDTAدار در حرارت اتاق موجب تورم و افزایش ۶FL حجم متوسط سلولی در ۲۴ ساعت می‌گردد.

۲- پدیده آگلوتیناسیون سرد با چسباندن گلبول‌های قرمز به یکدیگر موجب افزایشMCV و MCH و MCHC می‌گردد.

۳- میکروسیتوز شدید با قرار دادن گلبول‌های قرمز بسیار کوچک در آستانه شمارش پلاکتی موجب افزایش پلاکت و افزایش MCV به علت حذف گلبول‌های کوچک از جمعیت گلبول‌های قرمز و شمارش آنها بجای پلاکت می‌شود.

۴- لکوسیتوز شدید (بیشتر از ۳۰ تا ۵۰ هزار) موجب خطا در اندازه‌گیری MCV می‌شود. گفتنی است که در حالت نرمال نسبت گلبول‌های قرمز به سفید ۵۰۰ تا ۷۰۰ به یک است و از طرف دیگر به علت رقیق‌تر شدن سوسپانسیون گلبول‌های قرمز، شمارش گلبول‌های قرمز تحت اثر تعداد گلبول‌های سفید قرار نمی‌گیرد.

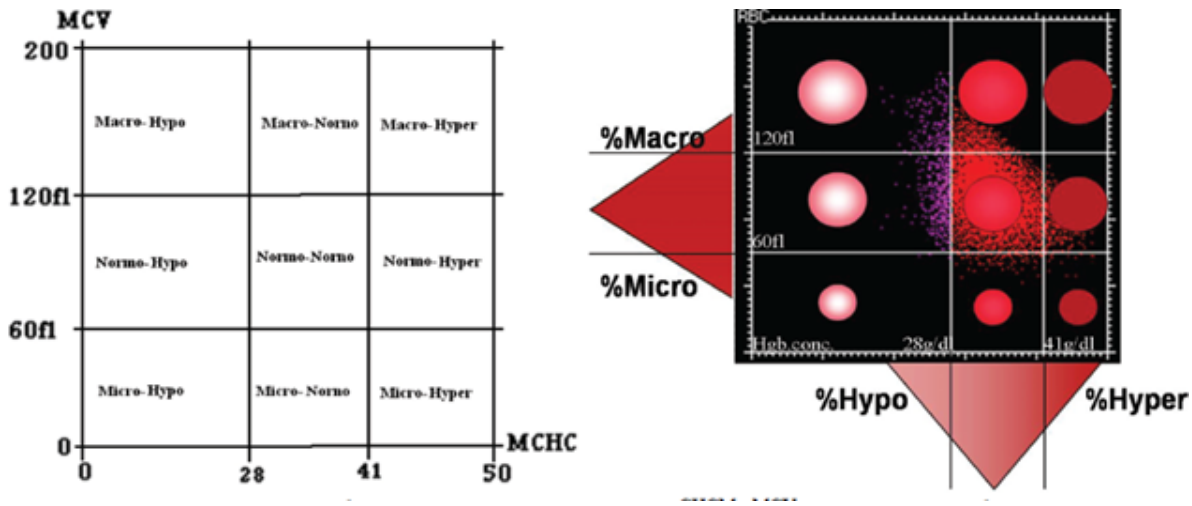
توجه داشته باشید که شمارش گلبول‌های قرمز و پلاکت در محلول ایزوتونیک بدون اضافه کردن محلول لایزینگ صورت می‌گیرد و افزایش گلبول‌های سفید موجب می‌شود که دستگاه در کانال RBC/PIT با شمارش گلبول‌های سفید بجای RBC موجب افزایش کاذب حجم متوسط سلول (MCV) گردد.

۵- کاهش انعطاف پذیری گلبول‌های قرمز موجب افزایش MCV می‌شود. یکی از پارامترهای مهم در محاسبه حجم متوسط گلبول در حین عبور از روزنه، فاکتور شکل و مقدار هموگلوبین گلبول است. گلبول‌های غیر سیال مثل اسفروسیت انعطاف پذیر نبوده و با ایجاد مقاومت بیشتر مورد حجم سنجی بیشتری قرار می‌گیرند. گلبول‌های قرمز بسیار هایپوکروم به علت کشیده شدن بیشتر در حین عبور از روزنه مورد حجم سنجی کمتری قرار می‌گیرند.

۶- پدیده تورم حاد با افزایش MCV و کاهش MCHC همراه است. این حالت در موارد هیپراسمولاریتی از قبیل دیابت، اورمی و هیپرناترمی رخ می‌دهد. برای مثال قند خون بیشتر از ۴۰۰ یا ۵۰۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر با نفوذ به درون گلبول‌های قرمز موجب هیپراسمولار شدن محیط داخل گلبول می‌شود. وقتی این گلبول‌ها در محیط ایزوتونیک دستگاه رقیق می شوند، عبور ناگهانی آب به درون گلبول‌ها موجب تورم حاد و افزایش MCV می‌گردد.

۷- رسوب تدریجی پروتئین در اطراف روزنه دستگاه موجب تنگ شدن دریچه و افزایش مقاومت بیشتر با عبور سلول از روزنه تنگ شده می‌گردد، از این رو شستشوی روزانه دستگاه با شوینده دستگاه (Cell cleaner) که دارای ترکیبات هیپوکلریت سدیم است ضروری است.

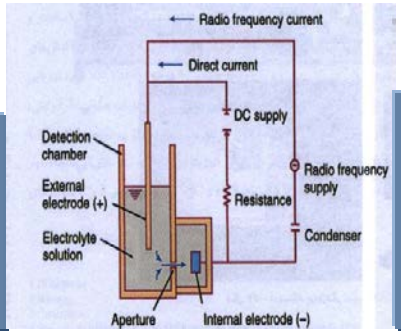
۸- افزایش املاح ضد انعقاد با ایجاد محیط هیپراسمولار و یا با چروکیده کردن و بی‌آب کردن گلبول موجب تغییرات ناگهانی حجم سلول در آنالیزورها می‌گردند.



در سایتوگرام آنالیزورهای اپتیک سایتوگرام اریتروسیتی که بر اساس MCV و MCHC به ۹ مربع تقسیم شده است. در شرایط نرمال، سایتوگرام اریتروسیت‌ها فقط در مربع وسط قرار گرفته و از روی سایتوگرام پارامترهای توزیع حجم محاسبه می‌شود.

افتراق سلول‌ها در آنالیزورهای خون شناسی

روش امپدانس الکتریکی قادر به طبقه بندی سلول‌ها براساس تغییرات هدایت در جریان مستقیم الکتریسیته (DC) است و سلول‌های خون در برابر این امواج مانند عایق بیولوژیک عمل می‌کنند. در حالیکه جریان الکترومغناطیس یا رادیوفرکانس(RF) از سلول عبور کرده و تحت اثر محتویات داخل سلول مانند هسته و گرانول‌ها قرار می‌گیرد، با برقراری امواج DC و RF (جریان مستقیم و امواج رادیو فرکانس) بین الکترودهای داخل و خارج در چامبر شمارش می‌توان به اطلاعات درونی سلول و حجم آن در حین عبور از ناحیه حساس روزنه پی برد. سلول‌ها حین عبور از روزنه موجب تغییـــر ظرفیت (کاپاسیتانس) الکتریکی شده (Electrical capacitance) که متناسب با محتویات درون سلولی است. با بکارگیری همزمان تکنولوژی امپدانس و ظرفیت الکتریکی به طور همزمان می‌توان طبقه بندی ۵ قسمتی از لکوسیت‌ها را داشت.

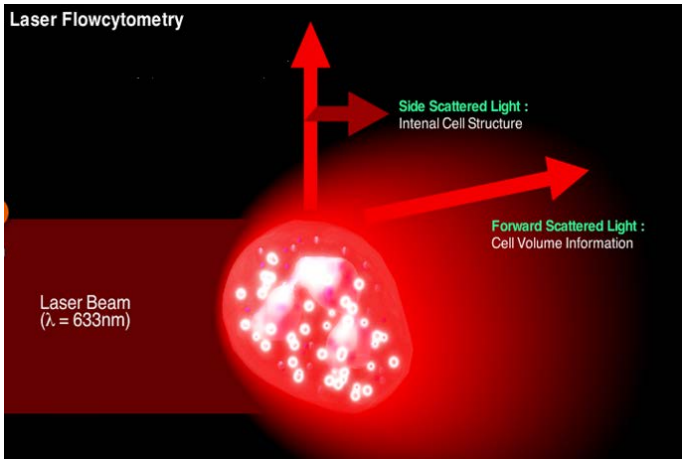


با بکار گیری همزمان امواج الکتریسیته مستقیم و امواج رادیو فرکانس می‌توان سلول‌ها را حین عبور از روزنه برای حجم و محتویات درون سلولی آنالیز و طبقه بندی کرد.

تکنولوژی الکترواپتیک (electro – optic) بر اساس واکنش متقابل نور و ماده استوار است. هنگامی که یک پرتو نور به سلولی برخورد کند. پدیده‌های زیر که هرکدام در رابطه با یک ویژگی از سلول است رخ می‌دهد.

- ✓ بازتابش نور در زاویه تابش (Reflection) یا پراکنش نور در زاویه صفر درجه نسبت به نور تابشی در رابطه با حجم و اندازه سلول است.
- ✓ تغییر جهت و شکست نور در ارتباط با محتویات درون سلولی بوده که با سنجش پراکنش نور در زوایای دیگر صورت می‌گیرد. (Refraction and diffraction)
- ✓ نور جذب شده توسط سلول تابع محتویات و یا رنگ پذیری سلول برای یک رنگ مخصوص است.
- ✓ بازتابش نور تابشی با طول موج متفاوت (فلوئورسانس)

در آنالیزورهای بر پایه‌ی اصول اپتیک از پرتو نور لامپ تنگستن° هالوژن و یا یک لیزر مانند لیزر نئون هلیوم استفاده می‌شود. با توجه به اینکه نور لیزر مونوکروماتیک (تک رنگ) و دارای حداقل واگرایی است در افتراق سلول‌ها بسیار مناسب است.

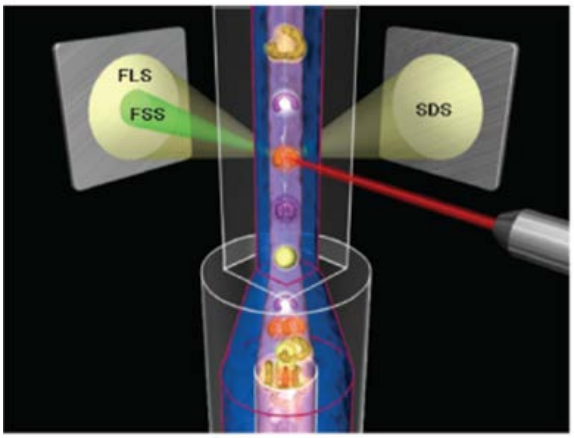


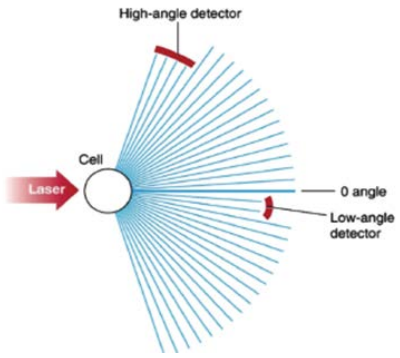
با استفاده از تکنولوژی اپتیک، اطلاعات هر سلول هنگام عبور از مقابل پرتو نوری از نظر اندازه، وضعیت هسته و گرانول‌ها مورد پردازش قرار می‌گیرد. با انتقال داده‌ها روی محور x و y و یا انتقال سه بعدی داده‌ها می‌توان پراکنش نگار سلول‌ها را ترسیم کرد. در واقع هر سلول مانند یک نقطه با توجه به پردازش داده‌ها دارای ویژگی‌های مختلف روی محورهای مختصات X و Y می‌گردد.

در تکنولوژی اپتیک سلول‌های خونی در مراحل گوناگون با رقیق کننده‌ها، معرف‌های لایزینگ، معرف‌های رنگ آمیزی، سورفکتانت‌ها و شوینده‌ها و رنگ‌های فلورکروم مجاور شده و سپس به صورت سوسپانسیون سلولی در می‌آید. سوسپانسیون سلولی به صورت تک ردیف و جریان پیوسته از لوله باریک شیشه‌ای کوارتز یا کانال فلوسل عبور می‌کند و هر سلول حین عبور با پرتو لیزری یا غیر لیزری برخورد می‌کـــــــــند. آشکارسازهای ویژه جهت اندازه‌گیری بازتابش نور در زوایای گوناگون تعبیه شده است. تحلیل اطلاعات آشکارسازها به صورت پراکنش نگار (Scatter gram) روی صفحه مانیتور ظاهر می‌شود. پراکنش نور در زاویه صفر درجه یا پراکنش در زاویه تابش (Forward scatter) متناسب با اندازه سلول و پراکنش در زاویه ۱۰ درجه با ساختار و پیچیدگی سلول، پراکنش در زاویه ۹۰ درجه (Side scatter) با لوبولاریتی سلول و پراکنش نور دپلاریزه در زاویه ۹۰ درجه با تعداد ائوزینوفیل‌های خون در رابطه است. با تکنولوژی پراکنش نور در زوایای مختلف برای جداسازی سلول‌ها (MAPSS) می‌توان به افتراق ۵ قسمتی لکوسیت‌ها دست یافت. در این تکنولوژی اطلاعات هر سلول هنگام عبور از مقابل پرتو نوری از نظر اندازه، وضعیت هسته و گرانول‌ها مورد پردازش قرار می‌گیرد. با انتقال داده‌ها روی محور x و y و یا انتقال سه بعدی داده‌ها می‌توان پراکنش نگار سلول‌ها را ترسیم کرد. در واقع هر سلول مانند یک نقطه با توجه به پردازش داده‌ها دارای ویژگی‌های مختلف روی محورهای مختصات X و Y می‌گردد.

آنالیزورهای مبتنی بر تکنولوژی VCS به صورت همزمان هر سه تکنولوژی امپدانس یا حجم سنجی (V)، ظرفیت الکتریکی (C) و تکنولوژی پراکنش نور (S) را بکار می‌برند. پرتو نور لیزر به گلبول‌های قرمز نه تنها

حجم‌سنجی را انجام می‌دهد بلکه با سنجش شکست نور در زاویه ۱۵-۵ درجه تراکم درون سلولی هموگلوبین (MCHC) را مستقیماً بدست می‌آورد.

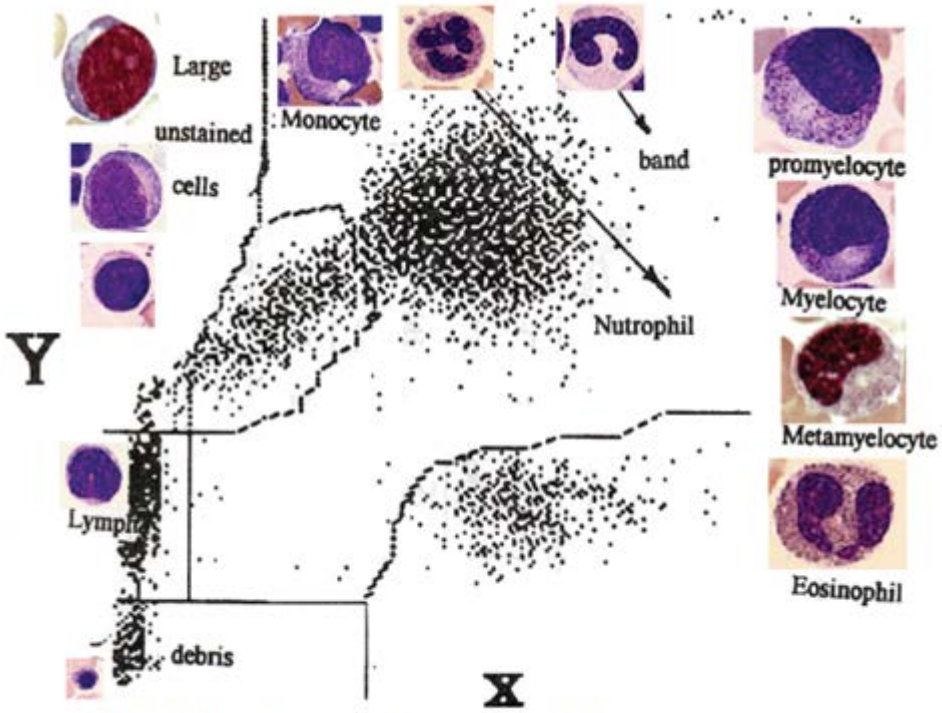




سوسپانسیون سلولی به صورت تک ردیف و جریان پیوسته از لوله باریک شیشه‌ای کوارتز یا کانال فلوسل عبور می‌کند و هر سلول حین عبور با پرتو لیزری یا غیر لیزری برخورد می‌کند.

سنجش مستقیم MCHC را به صورت حروف معکوس CHCM نشان می‌دهند و مفهوم آن این است که برخلاف سایر آنالیزورها که از طریق فرمول محاسبه می‌شود در اینجا به طور مستقیم بدست آمده است. البته آنالیزور، پارامتر MCHC را با فرمول هم محاسبه کرده و با CHCM برای کنترل کیفی مقایسه می‌کند.

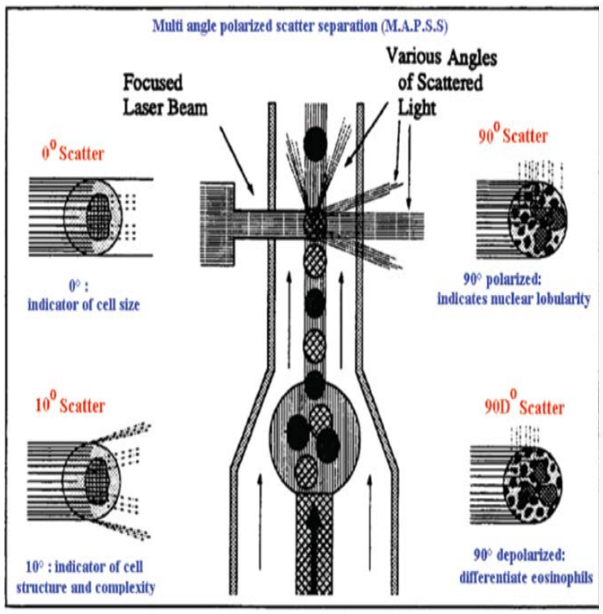
در آنالیزورهای تکنیکون با بکارگیری کانال پراکسیداز و کانال بازوفیل، لوبولاریتی گلبول‌های سفید از هم متمایز می‌شوند. ائوزینوفیل و نوتروفیل و منوسیت به ترتیب دارای بیشترین خاصیت پراکسیداز در سیتوپلاسم هستند. گفتنی است که بازوفیل‌ها در PH بسیار اسیدی و ائوزینوفیل در pH بسیار قلیایی در مقابل لیز شدن بیشترین مقاومت را دارند، در حالی که بقیه سلول‌ها بسرعت لیز می‌شوند و از این رو براساس حجم سنجی پس از مجاورت خون با PH اسیدی و یا قلیایی می‌توان این دو سلول را از هم جدا کرد. گرانول‌های ائوزینوفیل و آلودگی گلبول‌های قرمز با انگل مالاریا موجب دپلاریزه کردن نور شده و راهی برای افتراق ائوزینوفیل و اعلام خطر برای انگل مالاریا باز می‌کند.

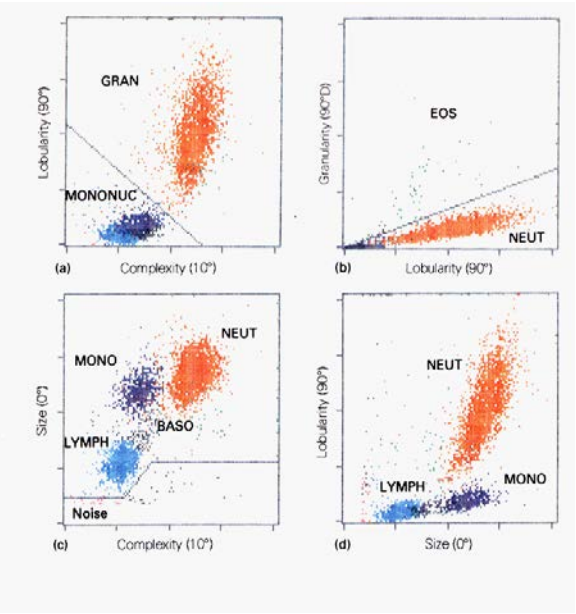


موقعیت انواع لکوسیت‌های رسیده و نارس در کانال پراکسیداز Hemalog-D

گرانول‌های بازوفیل دارای هپارین هستند و با این ویژگی پذیرای رنگ‌هایی مانند آلسین‌بلو و یا آسترابلو می‌باشند که با سنجش جذب نور توسط سلول پس از رنگ آمیزی می‌توان آنها را شناسایی کرد.

هنگام کار با آنالیزورها هیچگاه ته‌مانده‌های محلول‌های قبلی را به محلول جدید اضافه نکنید. معرف‌ها بایستی دارای سریال ساخت بوده و از شرکت‌های معتبر تهیه شوند.





در تکنولوژی MAPSS یا سنجش پراکنش نور پلاریزه در زوایای مختلف می‌توان سلول‌های خونی را طبقه بندی کرد. گفتی است که پراکنش نور دپلاریزه در زاویه ۹۰ درجه با تعداد ائوزینوفیل‌ها در رابطه است.