آزمایش شمارش دستی گلبولهای قرمز خون RBC count

هدف:

۱- تعیین تعداد گلبولهای قرمز در یک میلیمتر مکعب (میکرولیتر) خون و مقایسه آن با میزان طبیعی.
۲- آشنایی با شمارش گلبولها به طریقه هموسیتومتر برای کالیبراسیون آنالیزورها و نیز شمارش سلولی مایعات بدن.
شمارش دستی در موارد خطای آنالیزور به عنوان یک روش جایگزین به کار میرود .

مقدمه: خون، مایع قرمز رنگی است که در داخل قلب و رگ‌ها جریان دارد و تقریباً $\frac{1}{13}$ وزن بدن را تشکیل می‌دهد. وزن مخصوص خون ۱/۰۵- ۱/۰۳ و ویسکوزیته آن حدود چهار برابر آب است. خون شامل دو قسمت پلاسما و سلول‌های خونی می‌باشد.

الف- پلاسما:

پلاسما که ۵۵٪ حجم کل خون را تشکیل می‌دهد، شامل آب، املاح، مواد غذایی (قندها، چربی‌ها، پروتئین‌ها)، مواد زائد (اوره، اسیداوریک، کراتین، کراتینین)، آنزیم‌ها، هورمون‌ها و آنتی کورها می‌باشد. پروتئین‌های خون که عمدتاً شامل آلبومین، گلوبولین و فیبرینوژن هستند، اعمال خاص خود را انجام می‌دهند و برای سوخت متابولیکی مورد استفاده قرار نمی‌گیرند.

ب- سلول‌های خونی:

سلول‌های خونی که ۴۵٪ حجم کل خون را تشکیل می‌دهند عبارتند از: گلبول‌های قرمز، گلبول‌های سفید و پلاکت‌ها.

کار اصلی گلبول‌های قرمز رساندن اکسیژن به بافتهای بدن است. بنابراین هیپوکسی به هر علتی که باشد؛ آنمی، ارتفاع بالا، بیماری‌های ریوی، گردش خون کند و غیره، ترشح اریتروپویتین را تحریک می‌کند که تولید RBC ها را کنترل می‌نماید. در واقع اریتروپویتین محرک فیزیولوژیک برای تولید RBC است.
عمر متوسط RBCها ۱۲۰ روز است که در طول این مدت ۳۰۰۰۰ بار در خون گردش می‌کنند.

اساس آزمایش :

شمارش سلولها به روش دستی سه مرحله دارد :

۱- رقیق کردن

۲- انتقال قسمتی از خون رقیق شده به لام هموسیتومتر

۳- شمارش در حجم معین و تبدیل به واحد رایج هماتولوژی (واحد حجم میلی متر مکعب mm^3 یا میکرولیتر است .)

وسایل و مواد مورد نیاز:

۱- لام هموسیتومتر (لام مخصوص شمارش سلول‌های خون).

۲- محلول نرمال سالین۰/۹ گرم درصد که برای رقیق کردن خون بکار می‌رود.

۳- خون مخلوط شده با ماده ضدانعقاد اتیلن دی آمین ترا استیک اسید
(Ethylene diamine tetra-acetic .Acid) *EDTA*

۴- سمپلر ۵۰ میکرولیتر

۵-پیپت ملانژور رقیق کننده مخصوص شمارش گلبول قرمز (در موارد عدم استفاده از سمپلر)

۶- تورنیکت دهانی یا لوله لاستیکی که به انتهای پیپت برای کشیدن خون متصل می‌گردد.

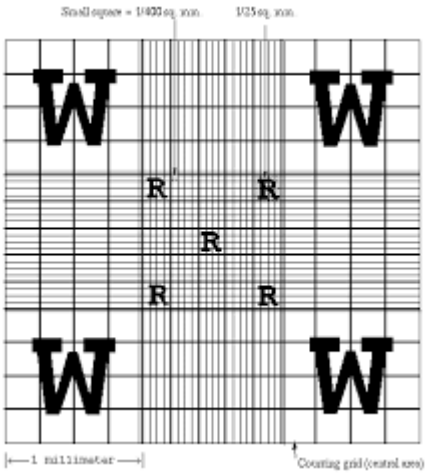
۷- میکروسکوپ.

مشخصات لام مخصوص شمارش سلول‌های خونی (هموسیتومتر):

یکی از ارزان‌ترین و راحت‌ترین راه‌ها برای شمارش گلبول‌های قرمز استفاده از هموسیتومتر است. لام‌های مخصوص شمارش سلول‌های خونی، انواع مختلف دارند و از طریق کارخانجات متفاوتی به نام‌های توما، اسپنسر، نئوبار، تورک و غیره عرضه می‌شوند. لام نئوبار از همه دقیقتر و بهتر است. در اینجا به شرح ساختمان آن می‌پردازیم.

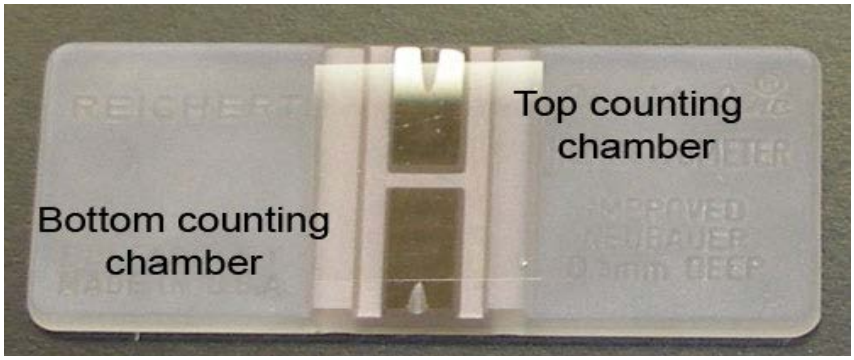
لام هموسیتومتر شیشه ضخیمی است که دارای سه برجستگی (Plate Form) است که برجستگی میانی به اندازه ۰/۱ ملیمتر از برجستگی طرفین کوتاه تر است. چنانچه یک لامل روی لام قرار گیرد، فاصله بین لام هموسیتومتر و لامل برابر ۰/۱ میلیمتر خواهد بود.

سطح لام توسط دو شیار عرضی به سه مستطیل تقسیم شده و مستطیل وسط توسط دو شیار طولی به دو مستطیل تقسیم شده است. بر روی مستطیل وسط، در هر طرف، یک مربع به اضلاع 3mm×3mm وجود دارد که با چشم غیر مسلح به صورت علامت صلیب دیده می شود ولی با استفاده از میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴ این خطوط دیده می شوند. در هر طرف مربعی بزرگ به ابعاد 3mm×3mm وجود دارد که به ۹ مربع به ابعاد 1mm×1mm تقسیم شده است . از مربعهای چهارگوشه (مربعهای مشخص شده با حرف Wدر شکل روبرو) برای شمارش گلبولهای سفید استفاده می شود . برای سهولت شمارش مربعهای هر گوشه به ۱۶ مربع کوچکتر تقسیم شده تا بتوان روند شمارش را با حرکت زیکزاکی منظم انجام داد.



مربع مرکزی که به ۲۵ مربع متوسط و هرکدام از این مربعات خود نیز به ۱۶ مربع کوچک تقسیم شده است، مخصوص شمارش RBC می باشد و شمارش گلبول قرمزدر ۵ مربع متوسط از این ۲۵ مربع صورت می‌گیرد. (مربع‌های مشخص شده با حرف Rدر شکل روبرو)

شکل ۱- شکل لام نئوبار



روش انجام آزمایش:

جهت شمارش گلبول قرمز باید به نکات زیر توجه داشت:

۱- با توجه به زیاد بودن تعداد RBC جهت جلوگیری از روی هم افتادن گلبول‌ها، بایستی خون تهیه شده رقیق شود.

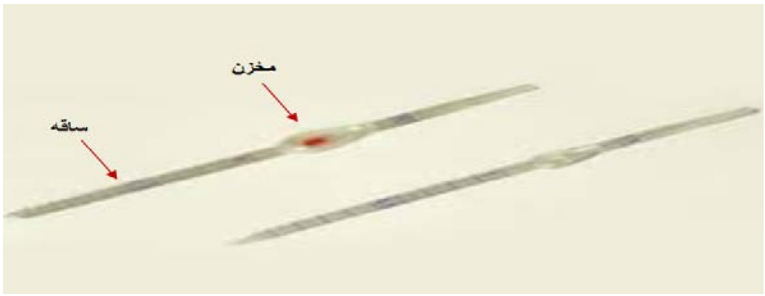
۲- جهت رقیق کردن خون از محلولی باید استفاده شود که ایزوتونیک بوده و باعث لایزگلبول قرمز نشود.

با توجه به رنگی بودن گلبول قرمز، نیازی به رنگ کردن نمی‌باشد. لذا جهت رقیق کردن خون از نرمال سالین استفاده می‌شود.

جهت رقیق کردن خون به دو روش میتوان عمل کرد .

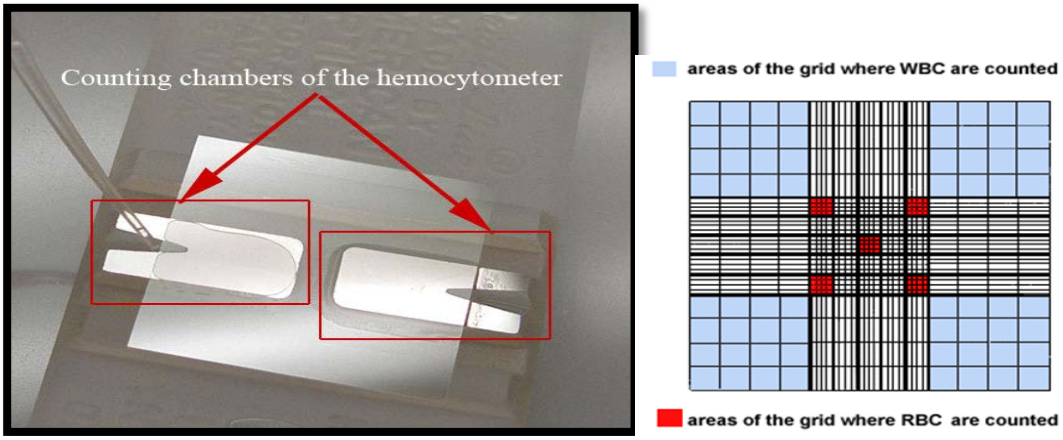
۱- استفاده از پیپت ملانژور : ملانژور گلبول قرمز یک ساقه و یک مخزن دارد . درجه بندی از ساقه شروع می شود و تا انتهای مخزن ، ادامه دارد. درجه بندی نسبی است و در محلهای ۵/. و ۱و ۱۰۱ با خط پر رنگ مشخص شده است. حجم ساقه ۱ و حجم مخزن ۱۰۰ برابر ساقه است . ملانژور گلبول قرمز ، مهره قرمزی در مخزن دارد . نسبت حجم ساقه به حجم مخزن برابر رقت خون است. برای مثال چنانچه خون تا درجه ۵/. ساقه کشیده شود و در مخزن با محلول رقیق کننده (نرمال سالین) رقیق شود خون ۲۰۰ برابر رقیق می شود . چنانچه خون تا درجه ۱ ساقه کشیده و در مخزن با نرمال سالین رقیق شود ، خون ۱۰۰ برابر رقیق می شود .

سپس دو انتهای ملانژوررا بطور افقی بین دو انگشت شست و اشاره گرفته و به مدت ۳ دقیقه تکان می‌دهیم یا می‌توان از دستگاه شیکر (Shaker) نیز استفاده نمود.



۲- استفاده از سمپلر و لوله آزمایش : در یک لوله آزمایش ۱۰ میلی‌لیتر محلول نرمال سالین ریخته و ۵۰ میکرولیتر آن را بوسیله سمپلر برداشته و بجای آن ۵۰ میکرولیتر خون اضافه می‌کنیم. که نسبت رقت در اینجا نیز ۱ به ۲۰۰ می شود (در آزمایشگاه از این روش جهت رقیق سازی استفاده می شود).

بعد از آشنایی کامل با لام نئوبار و شناخت محل شمارش گلبول‌ها، لامل را بر روی لام نئوبار قرار دهید. یک قطره را بر روی برجستگی میانی، حدفاصل لام و لامل تماس دهید. طبق خاصیت موئینگی خون رقیق شده به زیر لامل کشیده خواهد شد (در هنگام انتقال دقت کنید تا محلول وارد شیارها نشود).



سپس میکروسکوپ را تنظیم کرده و محل شمارش را بر روی لام پیدا می‌کنیم. شمارش گلبولها ی قرمز در ۵ خانه از مربع وسط 1mm×1mmکه به ۲۵ مربع کوچکتر تقسیم شده است، انجام می گیرد. توجه داشته باشید که رقیق کردن خون با محلول ایزوتون، موجب همولیز گلبولهای سفید نمی گردد، ولی چون در حالت عادی نسبت گلبولهای قرمز به سفید ۵۰۰ تا ۷۰۰ به ۱ می باشد، خطای چشمگیری در شمارش گلبول قرمز ایجاد نمی کند همچنین از طرف دیگر گلبول های سفید چون رنگ نشده اند، بنابراین قابل رویت نمی باشند.

جهت شمارش سلول های خونی دو قانون وجود دارد . قانون اول اینکه سلول ها بطور قراردادی بر روی دو ضلع از مربع به شکل L شمارش می گردند و روی دو ضلع دیگر شمرده نمی شوند. بهتر است که انتخاب ضلعهای L برای مربعها یکسان باشد. و قانون دوم مربوط به نحوه شمارش گلبولهای واقع در داخل مربعهای مخصوص شمارش می باشد که همگی به شکل زیکزاک شمرده می شوند.

در پایان و پس از اینکه گلبول های قرمز را در مربع های مخصوص شمارش کردیم مجموع گلبول های شمارش شده را در عدد ۱۰۰۰۰ ضرب کرده تا تعداد گلبول های قرمز در یک میلی متر مکعب از خون بدست آید.

برای مثال چنانچه در ۵ خانه شمارش گلبولهای قرمز، ۵۰۰ عدد گلبول قرمز وجود داشته باشد :

شمارش گلبول قرمز در یک میلی متر مکعب = ۵۰۰×۵×۲۰۰×۱۰ = ۵۰۰۰۰۰۰

در فرمول بالا، عدد ۲۰۰، ضریب رقت و عدد ۱۰ضریبی برای تبدیل عمق لامل به ۱ میلی متر (ضریب ارتفاع) و عدد ۵ برای محاسبه شمارش گلبولهای قرمز در ۲۵ خانه متوسط استکه معادل سطح یک میلی متر مربع است (ضریب سطح).

مقادیر طبیعی:

میزان نرمال RBCها در بدن مردان ۳۰۰۰۰۰±۵۲۰۰۰۰۰ و در زنان ۳۰۰۰۰۰±۴۷۰۰۰۰۰

کاهش میزان RBCها در موارد آنمی دیده می‌شود مثل آنمی در اثر خونریزی، آنمی به علت بیماری‌های مزمن، آنمی ارثی و آنمی کمبود آهن.

افزایش میزان RBCها که همان پلی سیتمی نامیده می‌شود در مواردی مثل پلی سیتمی ارثی، پلی سیتمی به علت بیماری‌های قلبی- ریوی، پلی سیتمی به علت اسهال، استفراغ، سوختگی، پلی سیتمی فیزیولوژیک مثل رفتن به ارتفاعات بالا، در نوزادان، استرس‌های روحی و ورزش شدید دیده می‌شود.

پرسش :

۱ -اگر فاصله بین لام ولامل ۱ میلیمتر بود، در محاسبه بجای عدد ۱۰۰۰۰ چه عددی داشتید؟

۲ -اگر شمارش گلبولهای قرمز در یک مربع بزرگ 1mm×1mmصورت می‌گرفت، بجای عدد ۱۰۰۰۰ چه عددی داشتید؟

۳ -آیا در این آزمایش گلبولهای سفید وجود دارند و مشاهده می‌شوند؟

آزمایش تعیین هموگلوبین (Hb)

هدف: اندازه گیری هموگلوبین خون بر حسب گرم در صد میلی لیتر (دسی لیتر) .
اهمیت این آزمایش در این است که گاهی اوقات ممکن است تعداد گلبولها نرمال بوده ولی مقدار هموگلوبین کاهش یافته باشد. اندازه گیری هموگلوبین در غربالگری کم خونی، تعیین شدت کم خونی و ارزیابی پاسخ به درمان کم خونی مورد کمک کننده است.

مقدمه:

هموگلوبین Hb که جزء اصلی گلبول قرمز را تشکیل می‌دهد، ترکیبی است پروتئینی که حمل O2 و CO2 را در خون به عهده دارد. هر ۱۰۰ml خون تقریباً ۱۵ گرم هموگلوبین دارد و هر گرم هموگلوبین میتواند ۱/۳۴ml اکسیژن را جابجا کند. بنابراین هر ۱۰۰ml خون توانایی حمل ۲۰ml اکسیژن را دارد. هر مولکول هموگلوبین از دو جفت زنجیره پلی‌پپتیدی (گلوبین) و ۴ گروه هم تشکیل شده است. هر گروه هم می‌تواند بطور برگشت‌پذیر با یک مولکول اکسیژن یا با دی اکسید کربن ترکیب شود. مهمترین عملکرد هموگلوبین حمل اکسیژن از ششها (جایی که فشار اکسیژن بالاست) به بافت‌ها (جایی که فشار اکسیژن کم است) می‌باشد. در مویرگ‌های ریوی با فشار اکسیژن ۱۰۰ میلیمتر جیوه ٪ ۹۸-۹۵ هموگلوبین با اکسیژن ترکیب می‌شود ودر بافتها به راحتی اکسیژن از هموگلوبین رها می‌شود (احیا می‌شود). هموگلوبین احیا شده هموگلوبینی است که آهن آن به اکسیژن متصل نیست. هنگامی که هر یک از گروه‌های هم یک هموگلوبین با یک مولکول اکسیژن همراه باشد به آن اکسی هموگلوبین (HbO_2) گویند. یک فرد طبیعی تا ۱/۵ درصد مت‌هموگلوبین دارد(مت هموگلوبین نوعی از هموگلوبین است که آهن اکسید شده به شکل فریک Fe^{3+} دارد) میزان مت هموگلوبین بیش از ۱/۵ درصد طبیعی محسوب نمی‌شود و در غلظت‌های بیش از ۱۰ درصد آن سیانوز ظاهر می‌شود. لازم به ذکر است که مت‌هموگلوبین تمایل شدیدی برای باندشدن با سیانیدها دارد و به همین دلیل در درمان مسمومیت با سیانید از ترکیبات نیتریت‌ها برای تشکیل مت‌هموگلوبین و سپس ترکیب آن با سیانید استفاده می‌شود.

روش اسپکتروفتومتری (طیف سنجی) یا روش هموگلوبین سیانید:

کمیته بین المللی استاندارد سازی در هماتولوژی (ICSH) ، اندازه گیری هموگلوبین به روش سیانومت هموگلوبین را روش مرجع قرار داده است . این روش اندازه گیری سه مزیت دارد :

۱- تمام انواع هموگلوبینها (مت هموگلوبین ، کربوکسی هموگلوبین ، اکسی هموگلوبین) به جز سولفو هموگلوبین که به مقدار ناچیزی در خون وجود دارد ، همگی به سیانومت هموگلوبین تبدیل می شوند. البته سرعت تبدیل کربوکسی هموگلوبین به سیانومت هموگلوبین در مقایسه با بقیه کمتر است .

۲- محلول های استاندارد پایدار سیانومت هموگلوبین با مقادیر مشخص هموگلوبین به صورت تجارتی موجود است .

۳- حداکثر جذب نوری سیانومت هموگلوبین در طول موج ۵۴۰ نانومتر، به صورت یک باند نسبتا"پهن و صاف است واز این رو به اندازه گیری هموگلوبین با اسپکترومتر می توان اعتماد کرد.

در این روش از دستگاه هموگلوبینومتر Huma Meter Hb^{plus} استفاده می‌شود. این دستگاه در واقع یک اسپکتروفتومتر است که روی طول موج ۵۷۴ نانومتر (مخصوص تشخیص هموگلوبین) ثابت شده است. اساس اندازه‌گیری هموگلوبین در این روش براساس تبدیل آن به سیانومت هموگلوبین می‌باشد و به همین نام هم نامیده شده است. در این روش خون در محلول **دراپکین** که حاوی فری‌سیانیدپتاسیم و سیانید پتاسیم می‌باشد، رقیق می‌شود. فری‌سیانید پتاسیم هموگلوبین را به مت‌هموگلوبین اکسیده می‌کند. سیانید پتاسیم یون‌های سیانید را جهت تشکیل سیانومت‌هموگلوبین فراهم می‌کند که جذب گسترده‌ای در طول موج ۵۴۰ نانومتر دارد.

ترکیبات محلول **درابکین** شامل:

۱- فری سیانور پتاسیم $K3Fe(CN)6$ ۲۰۰ میلی‌گرم

۲ - سیانید پتاسیم KCN ۵۰ میلی‌گرم

۳- فسفات پتاسیم منوبازیک $KH2PO4$ ۱۴۰ میلی‌گرم

۴- آب مقطر ۱۰۰۰ سی سی

۵- دترجنت (پاک کننده) مناسب مانند تریتون X-100 که این محلول پاک کننده غیر یونی ، همولیز گلبولهای قرمز را سرعت می دهد و موجب کاهش کدورت ناشی از لیپو پروتئینها و غشای گلبولها می شود.

در هنگام تهیه محلول دراپکین بایستی بسیار با احتیاط عمل کرد زیرا املاح یا محلول‌های سیانید سمی هستند. این محلول در دمای ۲۵-۴ درجه سانتی گراد در شیشه قهوه ای بوروسیلیکات برای چندین ماه پایدار است . محلول دراپکین باید صاف و زرد روشن باشد و جذب نوری آن در طول موج ۵۴۰ نانومتر با شاهد آب مقطر ، صفر شود. میزان PH آن بین ۷/۴-۷ است و توصیه می شود که PH آن به طور منظم حداقل ماهی یکبار با PH-meter کنترل شود.

فرمول واکنش :

$Hb(Fe^{2+}) + K3Fe(CN)6 \rightarrow$ Met hemoglobin $(Fe^{3+})KCN \rightarrow$ Cyan met Hb

وسایل و مواد مورد نیاز:

۱ - محلول دراپکین (Drapkins reagent)

۲- آب مقطر

۳- خون حاوی ماده ضد انعقاد (EDTA)

۴- دستگاه هموگلوبینومتر و کووت

۵- پیپت ۵ میلی لیتری و پوار

۶- سمپلر (۲۰ میکرو لیتر)

۷-پیپت سالی مخصوص اندازه گیری هموگلوبین (در صورت عدم استفاده از سمپلر)

روش انجام آزمایش:

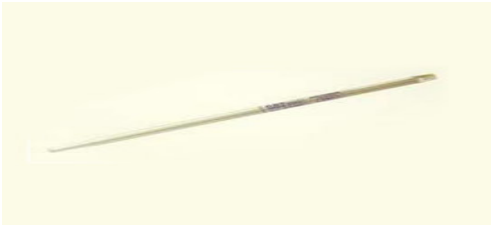
روش اول استفاده از پیپت سالی ومحلول استاندارد سیانومت هموگلوبین

۱- نمونه خون را به آرامی بهم بزنید و سپس ۰۲/. سی سی خون با پیپت سالی برداشته به ۵ سی سی محلول درابکین اضافه کنید تا رقت ۱:۲۵۱ بدست آید. پیپت سالی را چندین بار در محلول درابکین آب کشی کنید.

۲- جذب نوری دستگاه اسپکتروفتومتر را با آب مقطر یا محلول درابکین در طول موج ۵۴۰ نانومتر صفر کرده ، سپس جذب نوری محلول تست و استاندارد را به دست آورید. از این رابطه غلظت هموگلوبین بدست می آید:

$$\frac{\text{غلظت استاندارد} \times \text{جذب نوری تست}}{\text{جذب نوری استاندارد}}$$

پیپت سالی sahli pipette



روش دوم استفاده از سمپلر ودستگاه هموگلوبینومتر :

۱- در یک لوله آزمایش ۵ میلی لیتر محلول دراپکین بریزید.

۲- خون را به آرامی هم زده و با سمپلر ، ۲۰ میکرولیتر (۰/۰۲ میلی لیتر) خون بکشید.

۳- سطح خارجی سمپلر را تمیز نمائید و بعد تمامی خون را وارد محلول دراپکین کنید. مقدار کمی از محلول دراپکین را مجدداً به درون سمپلر فرستاده و داخل آن را شستشو دهید.

۴- به مدت ۵ دقیقه صبر کنید تا بین هموگلوبین خون و محلول دراپکین کمپلکس رنگی سیانومت- هموگلوبین تشکیل گردد. آنگاه توسط دستگاه هموگلوبینومتر ، میزان هموگلوبین را بر حسب گرم در دسی لیتر می‌خوانیم.

روش اندازه گیری با دستگاه هموگلوبینومتر Huma Meter Hb^{plus}

دستگاه را به برق وصل کرده و کلید خاموش-روشن را در وضعیت روشن بگذارید. وقتی دستگاه روشن شد برای حدود سه ثانیه اطلاعات سخت افزاری و نرم افزاری دستگاه ظاهر شده و سپس بصورت اتوماتیک وارد صفحه اصلی می گردد. در این صفحه در سمت چپ نوار بالایی کلمه Blank به حالت چشمک زن ظاهر می شود و در کادر اصلی در قسمت چپ طول موج دستگاه (۵۷۴nm) و در وسط کادر میزان Absorbance بر اساس (Au) و میزان هموگلوبین بر اساس (g/dl) نمایش داده می شود.

یک کووت تمیز را از آب مقطر یا مایع بلانک(در اینجا از دراپکین استفاده می شود) که میزان آن نباید کمتر از ۱ میلی لیتر باشد، پر کرده و در هولدر کووت (Cuvette holder) قرار دهید (قابل ذکر است درصورتی که از کووت چهار گوش استفاده می‌شود، سعی کنید که قسمت ترانس پرنت یا شفاف (Transparent) کووت را به سمت راست و چپ هولدر قرار دهید) و دکمه Read دستگاه را می زنیم تا دستگاه صفر شود. سپس دکمه Enter به حالت چشمک زن در می آید که در صورت زدن این دکمه مقدار بلانک در دستگاه ثبت می گردد و دستگاه صفحه جدیدی را نمایش می دهد که در نوار بالا و سمت راست آن کلمه Sample 001 قرار دارد.اکنون دستگاه آماده است تا مقدار هموگلوبین نمونه شماره یک را بخواند.

آنگاه کووت حاوی مایع بلانک را بردارید و کووتی که حاوی نمونه است در هولدر کووت قرار دهید. سپس با زدن دکمه Read غلظت هموگلوبین نمونه را توسط این دستگاه بخوانید. اگر نمونه های دیگری داشتیم دکمه Enter را فشار می دهیم تا دستگاه برای اندازه گیری بعدی آماده شود و در غیر اینصورت پس از یادداشت کردن مقدار هموگلوبین نمونه، دستگاه را خاموش می کنیم.

هموگلوبین طبیعی

مردان	۲ ± ۱۶ گرم در دسی لیتر
زنان	۲ ± ۱۴ گرم در دسی لیتر
نوزادان	۲۰ ۱۸ گرم در دسی لیتر (به علت بالا بودن RBC در آنها)

علل کاهش هموگلوبین :

۱- از دست دادن خون blood loss

۲- سرکوب مغز استخوان

۳- هموگلوبین غیرطبیعی

۴- نقایصی که منجر به کاهش تولید هموگلوبین شوند مثل فقر آهن

۵- آنمی فیزیولوژیک نوزادی و حاملگی

۶- خون ریزی مکرر در نوزادان نارس

علل افزایش هموگلوبین :

۱- پلی سیتمی ورا

۲- سوختگی شدید

۳-بیماری ریوی انسدادی مزمن COPD

۴-نارسایی احتقانی قلب CHF

۵-دی هیدراتاسیون Dehydration(افزایش کاذب هموگلوبین)

پارامترهای گلبول قرمز (Red Blood Cell Indies):

حجم متوسط گلبول قرمز(MCV (Mean Cell Volume

حجم متوسط گلبول قرمز (MCV) حجم نماینده گلبول های قرمز است . به این مفهوم که اگر یک گلبول به عنوان نماینده ی گلبول های قرمز انتخاب شود دارای چه حجمی است . واحد حجم فمتولیتر است که با علامت fl نمایش داده می شود .هرفمتولیتر معادل $۱۰^{-۱۵}$ لیتر است . با پارامتر MCV می توان گلبولهای قرمز را از نظر اندازه در سه دسته نرمال ، میکروسیت و ماکروسیت طبقه بندی کرد .

میزان نرمال MCV در بزرگسالان ۹۶-۸۰ فمتولیتر ثابت می شود. در یک فرد بزرگسال MCV کمتر از ۸۰ بیانگر گلبولهای قرمز کوچک یا میکروسیت است که می تواند ناشی از کم خونی فقر آهن و یا سندرمهای تالاسمی آلفا و یا بتا باشد. افزایش بیش از ۹۶ بیانگر گلبولهای بزرگ یا ماکروسیت است که ممکن است کم خونی مگالوبلاستیک ناشی از کمبود ویتامین B12 و یا فولیک اسید را مطرح کند. مقدار طبیعی MCV در بدو تولد بین ۱۱۸-۱۰۴ فمتولیتر است .

حجم متوسط گلبول قرمز (MCV)، از رابطه زیر بدست می آید:

$$MCV = HCT/RBC \times 10$$

مثال : هماتوکریت ۴۵٪ و تعداد گلبولهای قرمز $\mu l/ ۱۰^{۶} \times ۵$ مقدار MCV :

$$MCV = 45/5 \times 10 = 90\ fl$$

در مثال فوق شخص از نظر حجم RBC (MCV) نرموسیتیک می باشد.میزان نرمال MCV در کودکان به سن بستگی دارد. برای سنین بین ۱۰-۲ سال :

$$MCV = Age\ (Year) + 70$$

میانگین وزن هموگلوبین درگلبول قرمز MCH : Mean Cell Hemoglobin

پارامتر MCH بیانگر این مطلب است که اگر گلبول قرمزی که از طرف گلبولهای بدن به عنوان نماینده انتخاب شده است ، آن را وزن کنیم چه وزنی از هموگلوبین دارد. به عبارت دیگر MCH مقدار هموگلوبین موجود در یک گلبول قرمز را نشان می دهد. مقدار طبیعی MCH در بالغین ۳۲-۲۷ پیکوگرم است و هر پیکو گرم(pg)معادل $^{-۱۲}$ ۱۰ گرم است. اگر مقدار MCH کمتر از ۲۷ پیکوگرم باشد می توان گفت که نماینده گلبولها پریده رنگ یا هیپوکروم (Hypochrom) است . برای مثال اگر فردی دارای MCV=60 و MCH= 20 باشد نه تنها گلبولهای میکروسیت دارد بلکه گلبولها هیپوکروم یا پریده رنگ هم می باشند. هرشخصی که دارای MCV کمتر از ۸۰ و MCHکمتر از ۲۷ باشد آن شخص بایستی برای کم خونی فقر آهن و سندرمهای تالاسمی ماینور مورد آزمایش های تکمیلی قرار گیرد. فرمول MCH :

$$MCH = Hb/RBC \times 10 \ (Pg)$$

مثال : تعداد گلبولهای قرمز ۵×۱۰^{۶} / µl و میزان هموگلوبین ۱۵ gr/dl میزان MCH برابر است با:

$$MCH = 15/5 \times 10 = 30 \ pg$$

علل کاهش MCH :

۱- آنمی میکروسیتیک

۲- آنمی نورموسیتیک (در مواردی ممکن است MCV بالاتر از ۸۰ fl ولی میزان MCH کمتر از ۲۶pg باشد)

علل افزایش MCH :

۱- آنمی ماکروسیتیک

۲-افزایش تعداد گلبولهای سفید بیشتر از $50000/mm^3$

۳-شیرخواران و نوزادان (نرمال)

غلظت هموگلوبین در گلبول قرمز MCHC (Mean cell Hemoglobin Concentration)

پارامتر MCHC در واقع تناسب بین وزن وحجم گلبول قرمز را بیان می کند. و این پارامتر از تقسیم MCH بر MCV یا تقسیم وزن بر حجم بدست می آید.

$MCHC=MCH/MCV \times 100$

مقدار طبیعی MCHC در بالغین ۱/۵±۳۳ گرم درصد است . چنانچه MCHC بیماری کاهش داشته باشد و برای مثال عدد ۲۸ باشد می توان گفت که مقدار هموگلوبین در گلبول با توجه به حجم گلبول قرمز کم است یعنی گلبول ظرفیت کافی داشته ولی به اندازه ظرفیت خود دارای هموگلوبین نشده است و هموگلوبین در درون گلبول قرمز رقیق است . وقتی که MCHC برای مثال عدد ۳۸ باشد می توان گفت که هموگلوبین در گلبول قرمز غلیظ است و بیشتر از حجم خود دریافت کرده است که این پدیده در اسفیروسیتوز یا کروی شدن گلبول قرمز یافت می شود. رقیق شدن هموگلوبین در گلبول قرمز در کم خونی فقر آهن مشاهده می شود.

MCHC نسبت بین حجم گلبول قرمز و درصد اشباع آن از هموگلوبین را نشان می‌دهد، یعنی اینکه چه نسبتی از MCV با هموگلوبین پر شده است.

اریتروسیت‌های دارای مقادیر طبیعی هموگلوبین (MCHC نرمال) را normochromic ، اگر میزان MCHC پائین‌تر از حد طبیعی باشد، به آن hypochromic و اگر میزان آن بیشتر از حد نرمال باشد به آن hyperchromic گویند.

علل افزایش MCHC :

۱- اسفیروسیتوز ارثی ، گلبولهای داسی شکل

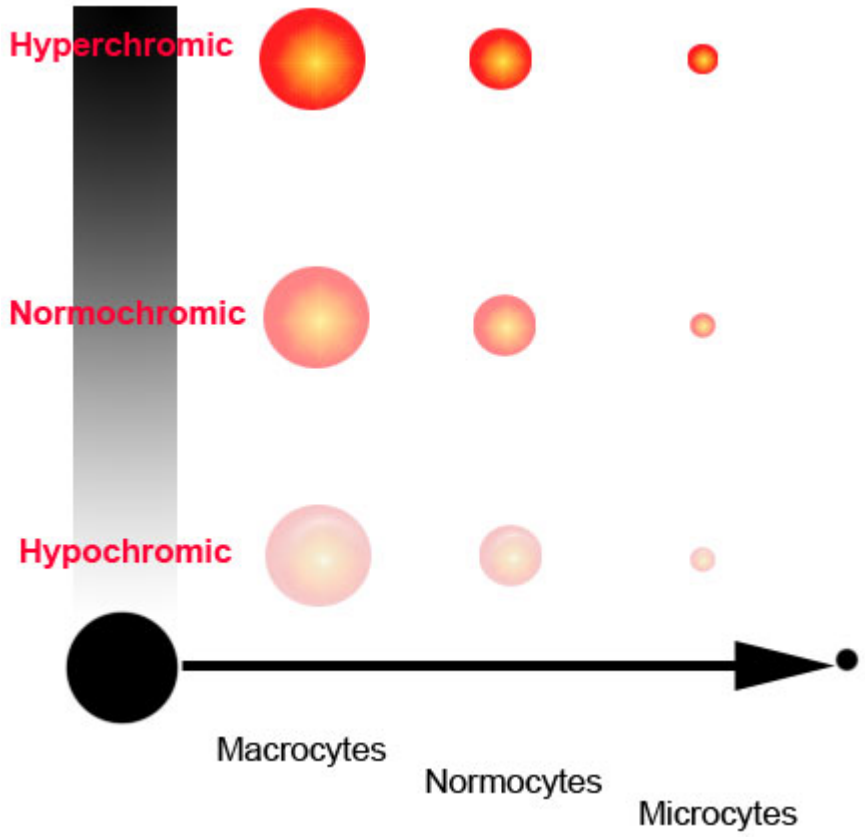
۲-آگلوتینه شدن RBC ها

۴-لکوسیتوز شدید (بیشتر از ۵۰۰۰۰ در میلی متر مکعب) (به دلیل افزایش MCH صورت کسر بزرگ شده در نتیجه کل کسر بزرگ می شود)

علل کاهش MCHC :

۱-آنمی هیپوکرومیک (آنمی فقرآهن پیشرفته و استوماتوسیتوز)

۲-دیابت و اورمی موجب افزایش فشار اسمزی داخل گلبول قرمز شده و باعث ورود آب به داخل گلبول می شود در نتیجه MCV افزایش ولی MCHC کاهش می یابد.



پرسش:

۱ - چگونه می‌توان از آزمایش تعیین هموگلوبین برای تشخیص کم خونی و پرخونی استفاده کرد؟

۲ - در روش تعیین هموگلوبین به طریق سیانومت هموگلوبین، خون به چه میزان رقیق شده است؟ چرا؟

۳ - در روش سیانومت هموگلوبین، از چه محلولی برای رقیق کردن و تولید کمپلکس رنگی استفاده می‌شود؟

۴ - چه ارتباطی بین میزان هموگلوبین و هماتوکریت یک فرد سالم وجود دارد؟

شمارش دستی گلبولهای سفید White Blood Cell COUNT

هدف :

۱- تعیین تعداد گلبولهای سفید در یک میلیمتر مکعب خون و مقایسه آن با میزان طبیعی

۲- آشنایی با شمارش گلبولها به طریقه هموسیتومتر برای کالیبراسیون آنالیزورها و نیز شمارش سلولی مایعات بدن . شمارش دستی در موارد خطای آنالیزور به عنوان یک روش جایگزین به کار میرود.

مقدمه:

شمارش گلبول سفید خون WBC Count

گلبولهای سفید خون، بزرگترین سد دفاعی بدن در مقابل تهاجم میکروبی، ویروسی، قارچی، سمی و عوامل بیگانه دیگر هستند. در حال سلامتی تعداد آنها در خون نسبتاً ثابت بوده ولی در بسیاری از بیماری‌ها مخصوصاً در عفونت‌های حاد یا مزمن، تغییر می‌کنند.

اساس آزمایش :

شمارش سلولها به روش دستی سه مرحله دارد :

۱- رقیق کردن

۲- انتقال قسمتی از خون رقیق شده به لام هموسیتومتر

۳- شمارش در حجم معین و تبدیل به واحد رایج هماتولوژی (واحد حجم میلی متر مکعب mm^3)

وسایل و مواد مورد نیاز:

۱- لام هموسیتومتر نئوبار و لامل

۲- پیپت ملانژوررقیق کننده مخصوص شمارش گلبول سفید

۳- محلول مارکانو یا تورک(۳ ٪ اسید استیک همراه با دو تا سه قطره متیلن بلو)

۴- میکروسکوپ

۵- شیکر

۶- خون مخلوط شده با ماده ضدانعقادی (EDTA)

۷- سمپلر ۵۰ میکرولیتر (در صورت عدم استفاده از پیپت ملانژور)

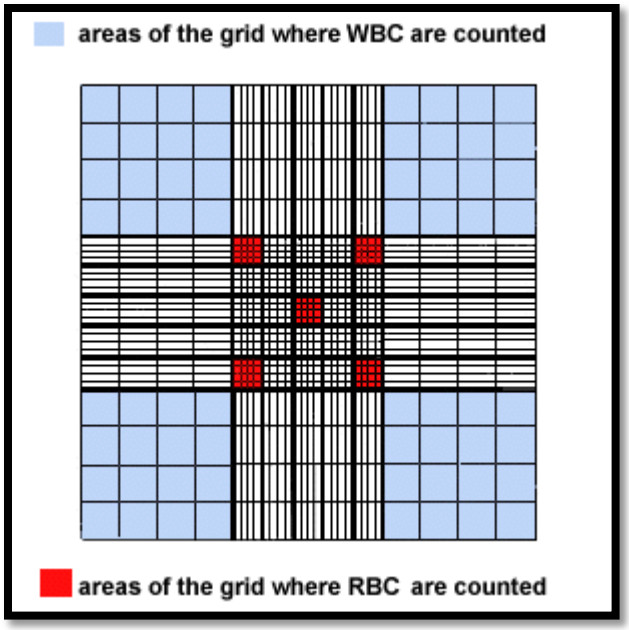
روش انجام آزمایش:

در ابتدا باید خون آغشته به محلول ضد انعقاد را رقیق نماییم. محلولی که جهت رقیق سازی انتخاب می شود، محلول مارکانو است. مارکانو محلولی رنگی است که از ترکیب اسید استیک ۳ ٪ و چند قطره رنگ متیلن بلو ۱ ٪ به وجود می آید. دو دلیل برای رقیق کردن خون جهت شمارش گلبول های سفید خون با محلول مارکانو وجود دارد. اسید استیک موجود در رنگ، گلبول های قرمز خون را لیز کرده و در نتیجه زیر میکروسکوپ مشاهده نمی شوند. همچنین متیلن بلو یک رنگ حیاتی است که سبب رنگ شدن جزیی هسته گلبول های سفید شده و سبب سهولت در مشاهده آنها می گردد.
جهت رقیق کردن خون به دو روش میتوان عمل کرد :

۱- استفاده از پیپت ملانژور : ملانژور گلبول سفید یک ساقه و یک مخزن دارد . درجه بندی از ساقه شروع می شود و تا انتهای مخزن ، ختم می شود . درجه بندی نسبی است و در محلهای ۵/. ، ۱، ۱۱با خط پر رنگ مشخص شده است . حجم ساقه ۱ و حجم مخزن ۱۰ برابر ساقه است . ملانژور گلبول سفید ، مهره سفیدی در مخزن دارد . نسبت حجم ساقه به حجم مخزن برابر رقت خون است . برای مثال چنانچه خون تا درجه ۵/. ساقه کشیده شود و در مخزن با محلول رقیق کننده (مارکانو) رقیق شود خون ۲۰ برابر رقیق می شود . چنانچه خون تا درجه ۱ ساقه کشیده و در مخزن با محلول مارکانو رقیق شود ، خون ۱۰ برابر رقیق می شود . سپس دو انتهای آن را بطور افقی بین دو انگشت شست و اشاره گرفته و به مدت ۳ دقیقه تکان می‌دهیم یا می‌توان از دستگاه شیکر (Shaker) نیز استفاده نمود.

۲-استفاده از سمپلر و لوله آزمایش : جهت رقیق کردن خون در یک لوله آزمایش، یک میلی‌لیتر محلول مارکانو ریخته و ۵۰ میکرولیتر آن را بوسیله سمپلر برداشته و بجای آن ۵۰ میکرولیتر خون اضافه می‌کنیم.. بدین ترتیب خون ما ۲۰ برابر رقیق می‌شود(در آزمایشگاه از این روش جهت رقیق سازی استفاده می گردد).

در این آزمایش نیز از لام نئوبار استفاده می‌شود که توصیف آن در آزمایش قبلی بیان گردید. همانطور که گفته شد چهار مربع که در گوشه لام قرار گرفته اند و هر کدام مساحتی برابر با ۱ میلیمتر مربع دارند، برای شمارش گلبولهای سفید بکار می‌روند. هر کدام از این ۴ مربع، خود نیز به ۱۶ مربع کوچکتر تقسیم شده‌اند.



پس از رقیق کردن خون با محلول مارکانو مشابه شمارش گلبولهای قرمز، یک قطره را به زیر لامل فرستاده و مربعهای موجود بین لام و لامل را از خون رقیق شده پر نمائید. گلبولها را در چهار مربع بزرگ چهار گوشه کناری (در شکل مشخص شده است) شمارش کنید.

جهت شمارش سلول های خونی دو قانون وجود دارد . قانون اول اینکه سلول ها بطور قراردادی بر روی دو ضلع از مربع به شکل L شمارش می گردند و روی دو ضلع دیگر شمرده نمی شوند. بهتر است که انتخاب ضلعهای L برای مربعها یکسان باشد(تمام سلول های داخل مربع شمارش می گردند). و قانون دوم مربوط به نحوه شمارش گلبولهای واقع در داخل مربعهای مخصوص شمارش می باشد که همگی به شکل زیکزاک شمرده می شوند. در هنگام محاسبه، مجموع تعداد گلبولهای شمرده شده را بر عدد ۴ تقسیم نمائید . این تقسیم بر ۴ برای محاسبه تعداد گلبولهای سفید در سطح یک میلی متر مکعب است .

شمارش گلبول سفید = مجموع شمارش ۴ خانه در گوشه ×۲۰×۱۰ / ۴

در فرمول بالا ،عدد ۲۰ فاکتور رقت و عدد ۱۰ ارتفاعی است که به وسیله لامل ایجاد شده است . ارتفاع لامل ۱/. میلی متر است و برای تبدیل به یک میلی متر در عدد ۱۰ ضرب می شود.

در رابطه بالا مخرج ۴ برای محاسبه تعداد گلبولهای سفید در سطح یک میلی متر مکعب است .

به عنوان مثال اگر مجموع شمارش گلبولهای سفید در ۴ خانه مربوط به شمارش گلبولهای سفید ۱۵۰ عدد باشد بنا براین:

تعداد گلبولهای سفید در یک میلی مترمکعب = ۱۵۰×۲۰×۱۰ / ۴ = ۷۵۰۰ /mm3

مقادیر طبیعی گلبولهای سفید:

در کودکان معمولاً حدود ۲۰۰۰۰ در هر میلیمتر مکعب و در بالغین بین ۴۰۰۰ تا ۱۱۰۰۰ و بطور متوسط ۷۰۰۰ در میلیمتر مکعب میباشد.

افزایش گلبولهای سفید یا لکوسیتوز: که شمارش گلبولهای سفید به بالاتر از ۱۱۰۰۰در هر میلیمتر مکعب افزایش می‌یابد، در مواردی مثل نوزادان، ورزش فیزیکی، حاملگی، زایمان، عفونت باکتریایی، اعمال جراحی و غیره دیده می‌شود.

کاهش تعداد گلبول‌های سفید یا لوکوپنی: که شمار گلبولهای سفید به پائین تر از حد نرمال یعنی زیر ۴۰۰۰ در هر میلیمتر مکعب کاهش یابد. در مواردی مثل عفونت با باکتری‌های غیرچرک‌زا مثل حصبه، مالاریا، عفونتهای ویروسی، آنفلوانزا، آبله، اوریون، مصرف بعضی داروها مثل کلرامفنیکل- سولفانامیدها- آسپرین- پنی سیلین، دریافت مکرر اشعه X، سموم شیمیایی، سوء تغذیه و در موارد لوکمی دیده میشود.

پرسش:

۱ - چرا تعداد گلبولهای سفید شمرده شده را بر عدد ۴ تقسیم میکنیم؟

۲ - نقش اسید استیک و متیلن بلو موجود در محلول مارکانو را بیان نمائید.

۳ - در شمارش گلبولهای سفید آیا گلبول قرمزی مشاهده میشود؟ چرا؟

اندازه گیری هماتوکریت یا حجم فشرده گلبولهای قرمز
HCT or Packed cell volume (PCV)

تعریف: نسبت حجم گلبولهای قرمز فشرده شده به کل حجم خون را ، حجم فشرده یا هماتوکریت می گویند

اصول آزمایش :

آزمایش هماتوکریت یا حجم سلولهای فشرده در واقع اندازه گیری نسبت حجم گلبولهای فشرده به حجم خون کامل در نمونه خون مویرگی ، وریدی یا شریانی است. اندازه گیری مستقیم HCT می تواند به وسیله سانترفیوژ کردن خون صورت گیرد اما اندازه گیری غیرمستقیم آن در دستگاههای اتوماتیک صورت می گیرد که از حاصلضرب تعداد گلبولهای قرمز درMCV محاسبه شده (HCT=MCV×RBC)و به صورت درصد بیان می شود. اگر تعداد گلبولهای قرمز و هموگلوبین هردو طبیعی باشند ، معمولا" هماتوکریت سه برابر Hb است . متداولترین روش اندازه‌گیری هماتوکریت خون، روش میکروهماتوکریت می‌باشد که ما نیز در اینجا از این روش استفاده می‌کنیم. در این روش در دستگاه میکرو سانترفیوژ خون را سانترفیوژکرده و اجزای مختلف خون بر اساس چگالی در لایه های مختلف قرار میگیرند که از پایین به بالا به ترتیب ابتدا گلبولهای قرمز سپس گلبولهای سفید و پلاکت (لایه بافی کوت) و در انتها پلاسما قرار می گیرد.

وسایل و مواد مورد نیاز:

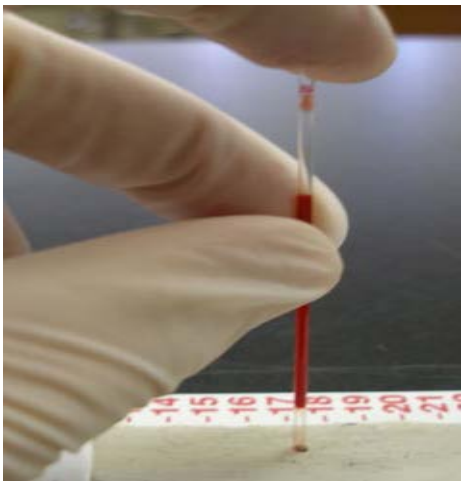
۱- نمونه خون حاوی ضد انعقاد
۲- لوله های هماتوکریت (لوله مویین فاقد هپارین یا لوله مویین دارای هپارین)
۳- خمیر مخصوص هماتوکریت (Cristoseal)
۴- سانترفیوژ میکروهماتوکریت
۵- خط کش هماتوکریت
۶- پنبه الکل
۷- لانست استریل

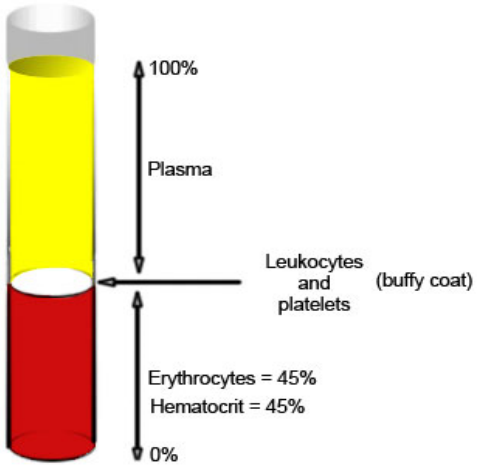
روش آزمایش:

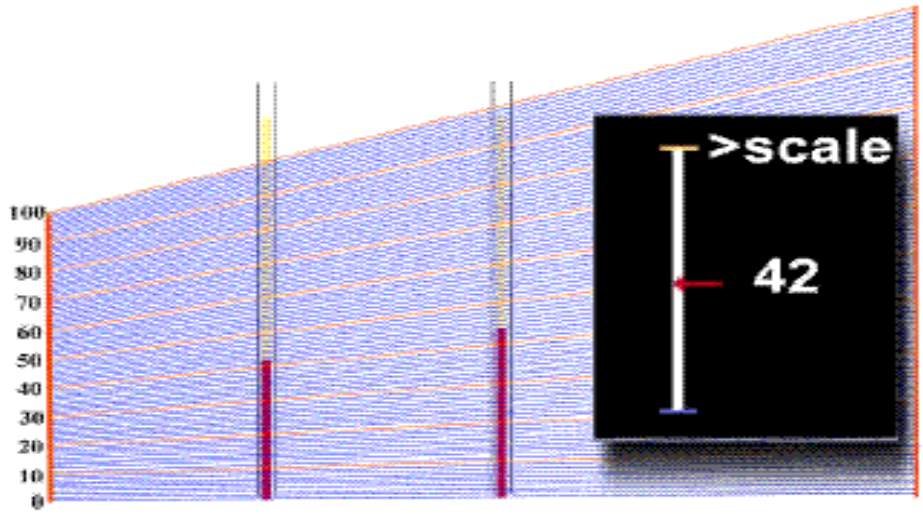
ابتدا نمونه خون را آماده کرده و سپس ۲/۳ تا ۳/۴ از طول لوله کاپیلاری ۷/۵ سانتی متری را با خون پر کنید . قسمت خارجی لوله را با استفاده از یک دستمال پاک کنید . لوله های مویین با حلقه آبی بدون ماده ضد انعقاد است و لوله مویین با حلقه قرمز ۲ واحد هپارین دارد که از آن برای جمع آوری نمونه مویرگی استفاده می شود.
سپس لوله مویین را بصورت عمودی و با زاویه ۹۰ درجه وارد خمیر هماتوکریت کرده ، لوله را در خمیر بچرخانید و پس از آن لوله را از خمیر خارج کنید. (طول خمیر نباید کمتر از ۴ میلی متر باشد). مسدود کردن انتهای لوله با حرارت ، سبب همولیز و خطا در جواب آزمایش می شود.

لوله های مسدود شده با خمیر را به صورتی که انتهای خمیرزده به سمت خارج دستگاه باشد ، درون سانترفیوژ قرار دهید. شماره جایگاه مربوط به محل نمونه را ثبت کنید. درپوش دستگاه را روی آن قرار داده ، در دستگاه را به آرامی ببندید. لوله ها را به مدت ۵ دقیقه با دور g ۱۲۰۰۰-۱۰۰۰۰ سانترفیوژ کنید.

پس از اینکه لوله ها را از سانترفیوژ خارج کردید آن را طوری روی خط کش هماتوکریت قرار دهید ، که مرز بین خمیر هماتوکریت و گلبولهای فشرده بر روی خط ثابت پایینی خط کش (مرز صفر) و انتهای پلاسما برروی خط بالای خط کش (مرز ۱۰۰) قرار گیرد و سپس خط متحرک را جابجا کنید تا در حد فاصل بین پلاسما و گلبولهای فشرده قرار گیرد. عددی را که در امتداد خط متحرک قرار دارد، به عنوان حجم گلبولهای قرمز فشرده در نظر بگیرید.در واقع برای بدست آوردن حجم فشرده ، خون موجود در لوله مویین را معادل ۱۰۰٪ فرض کرده و سپس درصد حجم گلبولهای قرمز فشرده از زیر لایه بافی کوت (لایه سفید رنگ که شامل گلبول سفید و پلاکت است) قرائت می شود. آزمایش هماتوکریت بایستی به صورت دوبل انجام شود و تفاوت نتایج بین دو لوله مربوط به یک نمونه نباید بیش از ۵/. درصد باشد.)







عوامل مداخله گر یا منابع خطا در اندازه گیری HCT :

۱- ماندن خون به مدت زیاد در حرارت آزمایشگاه، موجب ورم کردن گلبولهای قرمز و کاهش انعطاف پذیری و افزایش HCT می گردد. سفارش می شود که حداکثر تا ۶ ساعت بعد از زمان نمونه گیری، آزمایش HCT انجام شود.

۲- افزایش غیرمتناسب هر نوع نمک EDTA نسبت به حجم خون، باعث چروکیدگی گلبولها و کاهش هماتوکریت می گردد.

۳- در حالت طبیعی ، مقداری پلاسما بین گلبولهای فشرده شده قرار می گیرد که به آن پلاسمای به دام افتاده می گویند. این میزان در حالت طبیعی معادل ۳ ٪ هماتوکریت در نظرگرفته شده است. و می توان میزان هماتوکریت را برای پلاسمای به دام افتاده تصحیح کرد. برای مثال اگر HCT بیماری ۴۷ ٪ باشد ، میزان پلاسمای واقعی برابر است با:

47%×3%=1.41
47%-1.41=45.6%

در اینجا میزان HCTواقعی 45.6% می باشد. در کم خونی داسی شکل و اسفیروسیتوز به علت تغییر شکل و کاهش خاصیت انعطاف پذیری گلبولهای قرمز میزان پلاسمای به دام افتاده ممکن است حتی به ۲۰ ٪ هم برسد و میزان HCT را به طور کاذب افزایش دهد. در کم خونیهای ماکروسیتیک، تالاسمی و کم خونیهای هیپوکروم نیز میزان پلاسمای به دام افتاده افزایش می یابد.

۴- نتایج باید در مدت ۱۰ دقیقه پس از سانترفیوژ خوانده شود ، زیرا اگر لوله مویین در همان حالت در دستگاه رها شود ، سطح جدایی گلبولهای قرمز شیبدار شده و اندازه گیری آن مشکل می شود.

مقادیر طبیعی HCT :

مردان ۴۷٪-۳۴٪ و به طور متوسط ۴۱٪

زنان ۴۳٪- ۳۳٪ و به طور متوسط ۳۸٪

نوزادان تا ۶۰٪

در حاملگی کاهش هماتوکریت بخصوص در سه ماهه آخر حاملگی به علت افزایش پلاسما می باشد.

پرسش:

۱ - چرا اجزای مختلف خون جداگانه در لوله قرار می‌گیرند؟
۲ - علت استفاده از خمیر هماتوکریت چیست؟
۳ - علت هپارینه شدن بعضی از لوله های هماتوکریت چیست؟
۴ - لوله‌های هماتوکریت به چه صورتی در سانتریفیوژ قرار می‌گیرند؟
۵ - چه ارتباطی بین میزان هموگلوبین و هماتوکریت یک فرد سالم وجود دارد؟

آزمایشهای انعقادی خون

آیا می دانید سیسستم انعقاد خون ، یک دیوار سنگ چین در محل پارگی عروق درست می کند تا جلوی خونریزی را بگیرد؟ هنگامی که عروق پاره می شوند نخست سنگ چین پلاکتها درمحل بریدگی شکل می گیرد ، بدین مفهوم که پلاکت با چسبیدن به رشته های کلاژن در لایه زیر ناحیه اندوتلیومPlatelet Adhesion ، شالوده انعقاد را پی ریزی می کند و سپس پلاکتها درناحیه بریدگی بهم چسبیده Platelet Aggregation (تجمع پلاکتی) و گردهمایی پلاکتی یا سنگ چین پلاکتی را شکل می دهند . سنگ چین پلاکتی قابل نفوذ است و خون می تواند از لابلای پلاکتها به بیرون نشت کند. سیستم انعقاد خون با فعال کردن فاکتورهای انعقادی فیبرین درست میکند که مانند سیمان لابلای پلاکتها رفته و آنها را غیر قابل نفوذ می کند.

فاکتورهای انعقادی : تمامی فاکتورهای انعقادی در کبد ساخته می شوند .البته فاکتور ۸ بجز کبد درجایگاههای دیگرهم سنتز می شود. برای سهولت می توان فاکتورهای انعقادی را در سه دسته عمده جا داد:

۱ - فاکتورهای وابسته به ویتامین k : فاکتورهای ۲و۷و۹و۱۰ در این دسته اند. علاوه بر اینها پروتئین های Sو Cو Z که تنظیم گر انعقاد خون هستند نیز وابسته به ویتامین k هستند.

۲ - فاکتورهای مصرفی : ۱و۲و۵ و۸ و ۱۳ است. به این مفهوم که چنانچه خون در لوله آزمایش لخته گردد این فاکتورها مصرف می گردند.و از این رو در سرم وجود ندارند. (در پلاسما همه فاکتورهای انعقادی به جز کلسیم وجود دارد).

۳ - فاکتورهای تماسی : فاکتورهایی هستند که در برخورد با سطوح دارای شارژ منفی فعال می شوند مانند فاکتورهای ۱۲ و ۱۱ و پره کالیکرین و کینینوژن با وزن ملکولی بالا. شیشه و ذراتی مانند کائولین و سلیت دارای شارژ منفی هستند و از آنها برای فعال کردن فاکتورهای تماسی در آزمایشگاه استفاده می شود.

فیبرینوژن یا فاکتور انعقادی شماره یک نقش سوبسترای انعقاد خون را دارد. شاید بتوان تمام دستگاه انعقاد خون را با فرمول زیر نمایش داد.

فیبرینوژن ⟸ ترومبین ⟸ فیبرین

برای سالیان دراز این گمان وجود داشت که دو سیستم انعقادی جداگانه بنام خارجی و داخلی وجود دارد. سیستم خارجی با ورود فاکتور بافتی (فاکتور۳) به خون، آغاز به فعالیت کرده و به تولید لخته فیبرینی ختم می شود و سیستم داخلی با فعال شدن فاکتورهای تماسی آغاز شده و تمام فاکتورهای انعقادی بجز ۳و۷ درآن نقش داشته و فرآورده نهایی آن فیبرین است. هر دو مسیر داخلی و خارجی دارای یک مسیر مشترک Common pathway است. اما امروزه اعتقاد بر این است که مسیرهای داخلی و خارجی یک تقسیم بندی آزمایشگاهی است و آزمایشهای PT (زمان پروترومبین) و PTT (زمان پارشیال ترومبوپلاستین) که به ترتیب سیستم انعقادی خارجی و داخلی را ارزیابی می کنند، یک پدیده آزمایشگاهی است و نه یک پدیده فیزیولوژیک که در بدن رخ می دهد.

آزمایش PT یا زمان پروترومبین : Prothrombin Time

آزمایش PT به طور عمده فاکتورهای انعقادی وابسته به ویتامین K را مورد سنجش قرار میدهد. از آزمایش PT برای پیگیری درمان با وارفارین استفاده می شود. وارفارین داروی ضد انعقاد خوراکی است. دوز درمانی وارفارین طوری تنظیم می شود که PT بیمار بین ۲ تا ۲/۵ واحد INR گردد. بدین مفهوم که فاکتورهای انعقادی مسیر آزمایش PT که عمدتا فاکتورهای وابسته به ویتامین K هستند ۲ تا ۲/۵ برابر رقیق تر شوند تا امکان لخته شدن خون در بیمار کم شود. البته PT بیشتر از ۲/۵ واحد INR ممکن است با خونریزی همراه گردد. آزمایش PT یک آزمایش کبدی هم هست و طولانی بودن آن در هپاتیت بیاگر هپاتیت خطرناک و نامطلوب است.

اساس آزمایش :

معرف PT که با نامهای فاکتور بافتی یا ترومبوپلاستین بافتی نامیده می شود ، به طریقه تکنولوژی DNA یا با تخلیص فاکتور بافتی تهیه می گردد و به صورت فسفولیپوپروتئینی بافری شده با کلسیم ۰۲۵/. مولار به صورت سوسپانسیون در می آید. ارگانهایی مانند مغز و ریه و جفت سرشار از فاکتور بافتی هستند. مخلوط کردن معرف با پلاسما، موجب فعال کردن فاکتور ۷ و ایجاد کمپلکس با آن می گردد و در نهایت منجر به تشکیل لخته فیبرین می گردد.

واحد INR : International normalized ratio یا نسبت همسو شده بین المللی

واحد INR یکی از شیوه های گزارش آزمایش PT بر مبنای معرف فاکتور بافتی همسو شده با معرف بافتی مرجع WHO می باشد. برای آزمایش PT بایستی از فاکتور بافتی کالیبره شده توسط WHO استفاده کرد. بدین مفهوم که معرف بافتی هر شرکت سازنده با دریافت ضریب ISI از سوی WHO دارای معرف بافتی همسو شده با WHO می گردد. یعنی هر معرف بافتی که دارای ISI یا نشانگان حساسیت بین المللی باشد مثل این است که آزمایش PT را با معرف بافتی WHO انجام می دهد. به بیان دیگر اگر آزمایش PT بیمار با معرف بافتی مرجع انجام شود ، نسبت PT بیمار به PT کنترل برابر INR می گردد.

واحد ISI (International sensitivity index) یا نشانگان حساسیت بین المللی، حساسیت معرف PT به کمبود فاکتورهای وابسته به ویتامین K در مسیرخارجی را نشان می دهد و مقدار آن از عدد ۱ تا ۳ متغیر است . هرچه مقدار عددی ISI به یک نزدیکتر شود ، بیانگر معرف بسیار حساس و چنانچه به عدد ۳ نزدیک شود بیانگر کاهش حساسیت آن است.

$$INR=\frac{(PT\text{بیماربرحسب ثانیه})}{(PT\text{پلاسمای کنترل})}^{ISI}$$

مثال: بیماری که وارفارین مصرف می کند در یک آزمایشگاه با معرف بافتی باISI=2/3 ، آزمایش PT برابر ۲۲ ثانیه با کنترل ۱۳ و آزمایش PT همان نمونه در آزمایشگاه دیگر با معرف بافتی با ISI=1/3، برابر ۳۰ ثانیه با کنترل ۱۲ ثانیه شده است . تفسیر آزمایش این بیمار چگونه است ؟

آزمایشگاه اول $INR=(22/13)^{2/3}= 3/3$

آزمایشگاه دوم $INR=(30/12)^{1/3}=3/3$

توجه داشته باشید که مقدار ISI ، جواب هردو آزمایشگاه را هم سو کرده و حساسیت زیاد یا کم معرفها را جبران کرده است و هردو مورد دارای INR یکسان هستند. مقدار طبیعی INR بین ۹/. تا ۱/۱ می باشد.

نمونه برای آزمایش PT و PTT : برای این آزمایشها از ضدانعقاد سیترات سدیم ۳/۲٪ استفاده می شود و برای این منظور ۲/. سی سی سیترات سدیم به ۱/۸ سی سی خون اضافه شده و نمونه خون حداقل ۸ بار با عمل وارونه کردن لوله آزمایش مخلوط می شود.

وسایل و مواد مورد نیاز:

۱- پلاسمای سیتراته

۲- معرف PT

۳- کرنومتر

۴- بن ماری ۳۷ درجه

۵- سمپلر ۱۰۰و۲۰۰ میکرولیتر.

روش انجام آزمایش :

۱- معرف PT (فاکتور بافتی / یون کلسیم) را به دمای ۳۷ درجه سانتی گراد برسانید.

۲- مقدار ۱/. سی سی (۱۰۰ میکرولیتر) از پلاسمای کنترل یا تست را در لوله آزمایش ریخته و حداقل ۳ دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه کنید. (هیچگاه پلاسما بیشتر از ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه قرار نگیرد).

۳- مقدار ۲/. سی سی (۲۰۰ میکرولیتر) از معرف بافتی را با فشار به پلاسما اضافه کنید و زمان سنج (کرنومتر) را به کار اندازید. همزمان با مشاهده انعقاد پلاسما زمان سنج را متوقف و زمان را یادداشت نمایید.

تهیه کنترل : هرآزمایشگاه بایستی برای آزمایش PT یا PTT ، محدوده رفرانس طبیعی را پیدا کند. برای تهیه نمونه کنترل حداقل از ۶ نفر زن و مرد که به ظاهر سالم می باشند و دارای بیماریهای التهابی و عفونی نیستند، نمونه گیری انجام داده، سپس پلاسماها را به صورت مخلوط Pooled درآورد. پلاسمای مخلوط شده در ویالهای ۵/. سی سی در فریزرهای خانگی۲۰- به مدت ۲ هفته و در فریزر ۷۰- به مدت ۶ ماه ، قابل استفاده است.

آزمایش PTT : Partial thromboplastin time یا زمان ترمبوپلاستین پارشیال

آزمایش PTT سیستم انعقاد داخلی که یک پدیده آزمایشگاهی است را مورد ارزیابی قرار می دهد. در این آزمایش پلاسمای سیتراته بیمار با معرف PTT که حاوی فسفولیپید و ذرات شارژدار منفی است ، مخلوط شده و با افزودن کلسیم کلراید، زمان انعقاد پلاسما به دست می آید. ذرات با شارژمنفی ، موجب تغییراتی در آرایش فضایی فاکتور ۱۲ و خودفعال سازی آن می شوند. ذرات کائولین ، سلیت ، شیشه از این قبیلند. فعال شدن فاکتور ۱۲ در حضور سایر فاکتورهای تماسی تشدید یافته و به ادامه فعالیت مسیر داخلی انعقاد در آزمایشگاه منجر می شود.

وسایل و مواد مورد نیاز:

۱- پلاسمای سیتراته
۲- کلسیم کلراید۰۲۵/. مولار
۳- معرف PTT
۴- کرنومتر
۵- بن ماری ۳۷ درجه .
۶- سمپلر ۱۰۰میکرولیتر

روش انجام آزمایش :

۱- مخلوط پلاسمای بیمار با معرف PTT را با توجه به سفارش سازنده کیت (معمولا" ۳ دقیقه) در دمای ۳۷ درجه انکوبه کنید. ۱۰۰ میکرولیتر پلاسما + ۱۰۰ میکرولیتر معرف PTT
۲- با افزودن کلسیم کلراید **۰/۲۵**مولار (۱۰۰ میکرولیتر) از قبل گرم شده به لوله آزمایش کرنومتر را به کار انداخته و زمان لخته شدن پلاسما را اندازه گیری کنید.
۳- نتایج آزمایش بیمار و پلاسمای کنترل بر حسب ثانیه گزارش می شوند.

آزمایش PTT یک آزمایش غربالگری برای بررسی وضعیت انعقاد در بیمار است . در این آزمایش تمام فاکتورهای انعقادی به جز ۷و۱۳ نقش دارند. کیت PTT غالبا" طوری طراحی می شود که در کمبود ۳۰ درصدی از فاکتورهای انعقادی به ویژه ۸و۹و۱۱ طولانی گردد. از آزمایش PTT برای پیگیری درمان با هپارین استفاده می شود. از هپارین به عنوان درمان و پیشگیری از پدیده های لختگی استفاده می شود. برای بدست آوردن دوز درمانی هپارین ابتدا آزمایش PTT بیمار قبل از دریافت هپارین به عنوان PTT پایه بدست آورده و دوز درمانی هپارین با طولانی شدن PTT به ۱/۵ تا ۲ برابر میزان پایه بدست آورده می شود.

آزمایش زمان سیلان Bleeding Time(BT)

هدف آزمایش : برای بند آمدن خون ریزی نه تنها به شمارش کافی از پلاکت ها بلکه به کارآمد بودن پلاکت ها نیز نیاز است. پلاکتها با چسبیدن به رشته های کلاژن و انقباض، با تراوش کردن محتویات گرانولهای خود و چسبیدن به یکدیگر در سیستم انعقاد خون شرکت می کنند. آزمایش زمان سیلان(BT) تعداد و عملکرد پلاکتی را در حین پاره شدن مویرگها ارزیابی می کند.

روش انجام آزمایش به روش IVY : برای انجام آزمایش ، دستگاه فشارخون را با فشار 40mmHg درتمام زمان تست روی بازو ثابت نگهدارید. فشار 20mmHg برای اطفال و نوزادان رضایت بخش است. با تیغه مخصوص Template برشی به ابعاد 5mm×1mm (5mm طول و 1mm عمق) روی سطح ساعد، حدود ۳ الی ۵ سانتی متری زیر گودی آرنج ایجاد کنید. برش 3.5mm×1mm برای اطفال و 2.5mm×0.5mm برای نوزادان رضایت بخش است .
برش می تواند افقی (به موازات چین های گودی آرنج) یا عمودی باشد. شانس ایجاد اسکار با برش عمودی کمتر است . ناحیه تولید برش بایستی عاری از خالکوبی ، اسکار و جوش باشد. با مشاهده خروج خون از زخم ایجاد شده کرنومتر را بکار انداخته و قطرات خون خارج شده با کاغذ فیلتر از کناره های زخم پاک می شود (معمولا" هر ۳۰ ثانیه یکبار، قطرات خون از محل برش پاک می شود) .
توجه داشته باشید که هیچگاه کاغذ فیلتر به لبه های زخم تماس پیدا نکند. زیرا موجب جدا شدن تجمع پلاکتی از لبه های زخم و افزایش زمان سیلان می گردد. با رنگی نشدن کاغذ فیلتر، اتمام زمان سیلان یادداشت می گردد.
دستگاه فشار خون را با پایان یافتن زمان سیلان برداشته و چنانچه می خواهید اطراف ناحیه برش را با پنبه الکل تمیز کنید، مواظب باشید که الکل به لبه های زخم تماس پیدا نکند، زیرا در غیراینصورت موجب درد شدید، خونریزی مجدد و افزایش شانس تولید اسکار می شود.
با توجه به اینکه هر نمونه خون را بایستی بالقوه به عنوان یک عامل عفونی به شمار آورد، از این رو باید تیغه مصرف شده در ظرف مقاوم به ابزار تیز و کاغذهای فیلتر آغشته به خون در کیسه مخصوص Biohazard bag ریخت.
زمان سیلان به صورت دقیقه و ثانیه ، همراه با مقدار طبیعی گزارش می گردد. برای مثال زمان سیلان طبیعی به روش IVY بین ۲ تا ۷ دقیقه می باشد.

آزمایش سیلان در تشخیص شدت بیماری فون ویلبراند و نواقص اکتسابی و ارثی پلاکتی کاربرد دارد. و به طور کلی باید توجه کرد که به طور دقیق نمی توان با این آزمایش شدت خون ریزی را پیش بینی نمود. بیماری فون ویلبراند شایع ترین اختلال خونریزی دهنده ارثی با احتمال شیوع ۱ ٪ است. ژن فاکتور فون ویلبراند روی

کروموزوم ۱۲ بوده و این فاکتور دارای نقش مرکزی در پیوند پلاکتها به رشته های کلاژن در محل آسیب عروقی است. علاوه بر آن محافظت از فاکتور ۸ انعقادی نیز به عهده فاکتور فون ویلبراند است . ساخته نشدن یا کاهش فاکتور فون ویلبراند موجب بیماری فون ویلبراند شده که بصورت خون ریزیهای پوستی - مخاطی، گوارشی، خون دماغ و خون ریزیهای شدید ماهانه بروز می کند.

آسپرین با غیرفعال کردن آنزیم سیکلواکسیژناز برای حداقل ۴ روز کارایی پلاکت در عمل تجمعی را کاهش داده و زمان سیلان را افزایش می دهد. آنتی بیوتیکهای پنی سیلین و سفالوسپورین، کارایی پلاکت را تحت تاثیر قرار می دهند. هپارین و کومادین در دوز دارویی، اثری روی زمان سیلان ندارند. کم خونی (هماتوکریت کمتر از ۳۰ ٪) موجب افزایش زمان سیلان می شود.

شمارش افتراقی گلبول‌های سفید (Differential Leucocytes Count)

هدف:

شناخت انواع گلبول‌های سفید خون و تعیین نسبت درصد انواع گلبول های سفید موجود در خون محیطی

مقدمه:

تقسیم بندی گلبول‌های سفید:

گلبولهای سفید انواع مختلفی دارند و هر کدام درصد خاصی از کل گلبول‌های سفید را به خود اختصاص می‌دهند. برای گلبول‌های سفید تقسیم‌بندی‌های مختلفی وجود دارد که رایجترین آنها تقسیم بندی گلبول‌ها براساس شکل هسته و وجود یا عدم وجود گرانول در سیتوپلاسم می‌باشد. بر این اساس گلبولهای سفید به دو دسته تقسیم می‌شوند.

۱- گرانولوسیتها شامل:

الف- نوتروفیل

ب- ائوزینوفیل

ج- بازوفیل

۲- آگرانولوسیتها شامل:

الف- لنفوسیت

ب- منوسیت

خصوصیات انواع گلبولهای سفید:

الف- نوتروفیل: فراوانترین نوع گلبول سفید است. سیتوپلاسم حاوی گرانول های ریز به رنگ بنفش روشن است. هسته کاملاً متراکم و چند قسمتی یا چند لوبه (معمولاً ۵-۳ لوب و ۶-۲لوب نیز دیده می‌شود) حتی گاهی نعل اسبی شکل (باند سل) است. (در باند سل هسته به شکل U وSدیده می شود . هسته به شکل نواری است که در سر تا سر آن قطر یکسانی دارد). بطور طبیعی ۴۰ تا ۶۰ درصد از گلبول های سفید خون را تشکیل می دهند.

ب- ائوزینوفیل: هسته ۳-۲ قسمتی و نسبتاً متراکم، شبیه گوشی تلفن یا فرم کیسه‌ای، سیتوپلاسم حاوی گرانوله های درشت به رنگ نارنجی می‌باشد. بطور طبیعی ۱ تا ۴ درصد از گلبول های سفید را شامل می شوند.

ج- بازوفیل: کمیاب ترین نوع گلبول سفید می‌باشد. بازوفیل هسته لوبوله یا چند قسمتی دارد ولی پوشش گرانولهای درشت آبی رنگ، دیدن لوبها را مشکل می کند. داشتن گرانول‌های درشت به رنگ آبی یا بنفش تیره که حاوی هیستامین است، وجه تشخیص آنها می‌باشد. میزان طبیعی بازوفیل ها ۰ تا ۱ درصد می باشد.

د- لنفوسیت: از نظر اندازه متفاوتند و به سه گروه بزرگ، متوسط و کوچک تقسیم می‌شوند. هسته متراکم و معمولاً کروی ودارای کروماتین یکنواخت می باشد و هسته قسمت اعظم سیتوپلاسم را فرا گرفته است. سیتوپلاسم به صورت هاله ای به رنگ آبی آسمانی دور تا دور هسته قرار دارد.لنفوسیتها ممکن است تعداد محدود و قابل شمارشی از گرانولهای آزروفیل داشته باشند. لنفوسیت کوچک ۸-۶ میکرون دارد ، از اینرو راهنمایی برای اندازه طبیعی گلبول قرمز است . میزان طبیعی آنها شامل ۲۰ تا ۴۰ درصد گلبول های سفید می باشد.

ه- منوسیت: معمولاً درشت ترین نوع گلبول سفید است.اندازه آن معمولا" ۲۰-۱۵ میکرون است . قادر به خروج از عروق و تبدیل شدن به ماکروفاژ است. هسته منوسیت دارای کروماتین بنفش رنگ و دارای فضاهای راه راه است که به آن فضای پاراکروماتین می گویند. هسته ممکن است گرد یا بیضی باشد ولی اغلب دندانه ای عمیق و شبیه به نعل اسب دارد .منوسیت نعل اسبی نباید با سلول باند اشتباه شود . منوسیت با هسته نعل اسبی ، دارای هسته پهن و فضای پاراکروماتینی است در حالیکه هسته سلول باند مانند نوار باریک بوده و سیتوپلاسم آن شبیه نوتروفیل می باشد. سیتوپلاسم منوسیت فاقد گرانول و به رنگ خاکستری مایل به آبی همانند شیشه غبار گرفته می باشد. باید توجه داشت که در این نوع از گلبول سفید، نسبت هسته به سیتوپلاسم کمتر از لنفوسیت ها می باشد. منوسیت ها بطور طبیعی ۶ تا ۸ درصد گلبول های سفید خون را تشکیل می دهند.

وسایل و مواد مورد نیاز:

۱- لام تمیز

۲- میکروسکوپ

۳- خون

۴- رنگ رایت (۳ گرم پودر رایت در ۱۰۰۰ میلی لیتر الکل متانول حل گردد، سپس در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۵-۳ روز تکان داده شود و پس از آن فیلتر گردد).

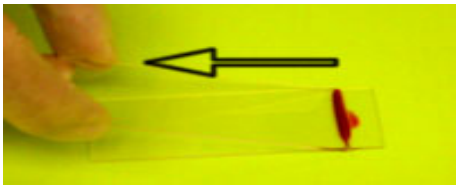
۵- آب مقطر یا بافر سالین

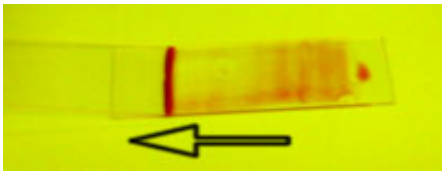
۶- روغن ایمرسیون

رنگ رایت شامل رنگ اسیدی ائوزین و رنگ قلیایی بلودومتیلن می باشد.

روش انجام آزمایش:

۱- لام تمیزی از دو انتها بین دو انگشت شست و سبابه در دست چپ قرار دهید (لامهای مورد استفاده باید کاملاً تمیز باشند). خون را به هم زده و یک قطره کوچک از خون را نزدیک به انتهای لام قرار دهید. آنگاه با دست راست یک لام دیگر را با زاویه ۳۰ درجه روی قطره خون قرار داده تا خون در سراسر قسمت عرضی لام دوم پخش شود. سپس به آرامی لام دوم را روی لام اول با سرعت یکنواخت حرکت داده تا یک لایه نازک خون روی لام پخش شود.





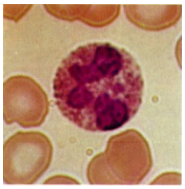
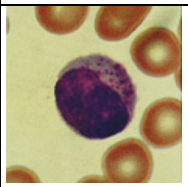
۲- حداقل سه گسترش (Smear) خوب تهیه کنید. لامها را روی میله های شیشه، طوری قرار دهید که کاملاً در سطح افقی قرار گیرند و خشک شوند.

۳- روی لام‌ها رنگ رایت ریخته و به مدت ۵ تا ۸ دقیقه بگذارید رنگ باقی بماند. سپس به همان مقدار آب مقطر روی آن ریخته و به مدت ۵ تا ۷ دقیقه بگذارید بماند. در این هنگام به آرامی با پیپت روی رنگ و بافر فوت کنید تا مخلوط شوند. سپس لام را با آب معمولی بشوئید. پشت لام را با دستمال کاغذی آغشته به الکل تمیز کرده و صبر کنید تا لام خشک شود.

۴- با بزرگنمایی ۱۰ قسمتی از لام را که نازک و یکنواخت و دارای سلول‌ها کاملاً طبیعی است انتخاب کرده (معمولا منتهی الیه گسترش)، سپس یک قطره روغن ایمرسیون را در آن محل گذاشته و با بزرگنمایی ۱۰۰، انواع سلول‌های خونی را شناسایی کنید.

۵- برای شمارش سلول ها باید دیافراگم میکروسکوپ باز باشد و کندانسور آن نیز به حداکثر بالا کشیده شود تا نور بیشتری از لام عبور کند.لام را با حرکات صفحه میکروسکوپ به صورت زیگزاگ به بالا و پایین حرکت داده و ۱۰۰ عدد از گلبول های سفید را شمارش کرده و انواع آن ها را یادداشت می کنیم.بدین ترتیب درصد هر یک از گلبول های سفید به دست می آید.پس از انجام آزمایش عدسی های میکروسکوپ را تمیز می کنیم.

مشخصات گلبول‌های سفید در فروتی رنگ آمیزی شده

نوع سلول		شکل	قطر µm	هسته	مشخصات سیتوپلاسم
گرانولوسیتها	نوتروفیلها		۱۰-۱۴	۲-۶ لوب، که بوسیله رشته‌های کروماتین به همدیگر متصل شده‌اند و بوضوح در داخل سیتوپلاسم دیده می‌شوند.	دانه‌های مشخص بنفش رنگ که یک زمینه شیشه مانند بوجود می‌آورند.
	ائوزینوفیلها		۱۰-۱۵	با لوبهای کمتر، اغلب دو لوبه که بوسیله رشته‌های کروماتین به همدیگر متصل شده‌اند.	دانه های قرمز یا نارنجی
	بازوفیلها		۱۰-۱۵	لوبهای بی شکل، ممکن است دو لوبه یا به شکل S باشند. چون گرانولهای تند روی آنها می‌افتند، ممکن است واضح دیده نشوند.	گرانولهای خیلی زیاد که رنگ آبی تیره بخود می‌گیرند و تمام سلول را پر می‌کنند.
آگرانولوسیتها	منوسیتها		۱۵-۲۰	درشت، خارج مرکزی، ممکن است به شکل نعل اسبی یا کلیوی دیده شود. در نگاه نیمرخ ممکن است بیضی دیده شود.	سیتوپلاسم به مقدار فراوان به رنگ خاکستری-آبی کمرنگ، که گرانول قابل رویت در آن دیده نمی‌شود.
	لنفوسیت کوچک		۷-۹	درشت، گرد، کاملاً تمام سلول را پر می‌کند. به شدت رنگ آبی به خود گرفته و مثل یک لکه جوهر دیده می‌شود.	یک سیتوپلاسم آبی روشن هلالی شکل که گرانولی در آن دیده نمی‌شود.
	لنفوسیت بزرگ		۱۲-۱۵	درشت، گرد، کاملاً تمام سلول را پر می‌کند و به شدت رنگ آبی به خود می‌گیرد.	سیتوپلاسم به مقدار زیاد به شکل هلالی و به رنگ آبی روشن (بیشتر از لنفوسیت کوچک)، گرانول ندارد.

پرسش:

۱ - یک گسترش خون چه مشخصاتی را باید داشته باشد؟

۲ - آیا گلبول‌های قرمز و پلاکت‌ها در این رنگ‌آمیزی نیز مشاهده می‌شوند؟

۳ - اگر مجموع سلول‌های شمارش شده از ۱۰۰ بیشتر یا کمتر باشد، آیا جواب بدست آمده صحیح می‌باشد؟

۴ - وظیفه هر دسته از سلول‌ها کدام است؟

۵ - لنفوسیت بزرگ و کوچک را چگونه از یکدیگر تشخیص می‌دهند؟