منابع خطا در شمارش اتوماتیک سلول‌ها

مقدمه

- علي‌رغم تمام پيشرفت‌هاي به دست آمده در آناليزرهاي هماتولوژي، باز هم احتمال وقوع نتايج كاذب و نادرست در پاسخ‌هاي CBC وجود دارد.

- اين پاسخ‌هاي كاذب ممكن است سبب بروز مشكلاتي نظير:

- تشخيص نادرست بيماري ☜ تشخيص ITP به هنگام ترمبوسيتوپني كاذب
- و يا درمان‌هاي نامناسب ☜ تجويز استروئيد يا اسپلنكتومي در موارد ترمبوسيتوپني كاذب
- و يا انجام آزمايش‌های غيرضروری گردند

☜ آگاهي از علت و مكانيسم اين خطاها و چگونگي رفع آنها مي‌تواند در پيشگيری از موارد فوق و ارائه يك پاسخ صحيح به پزشك معالج مؤثر باشد .

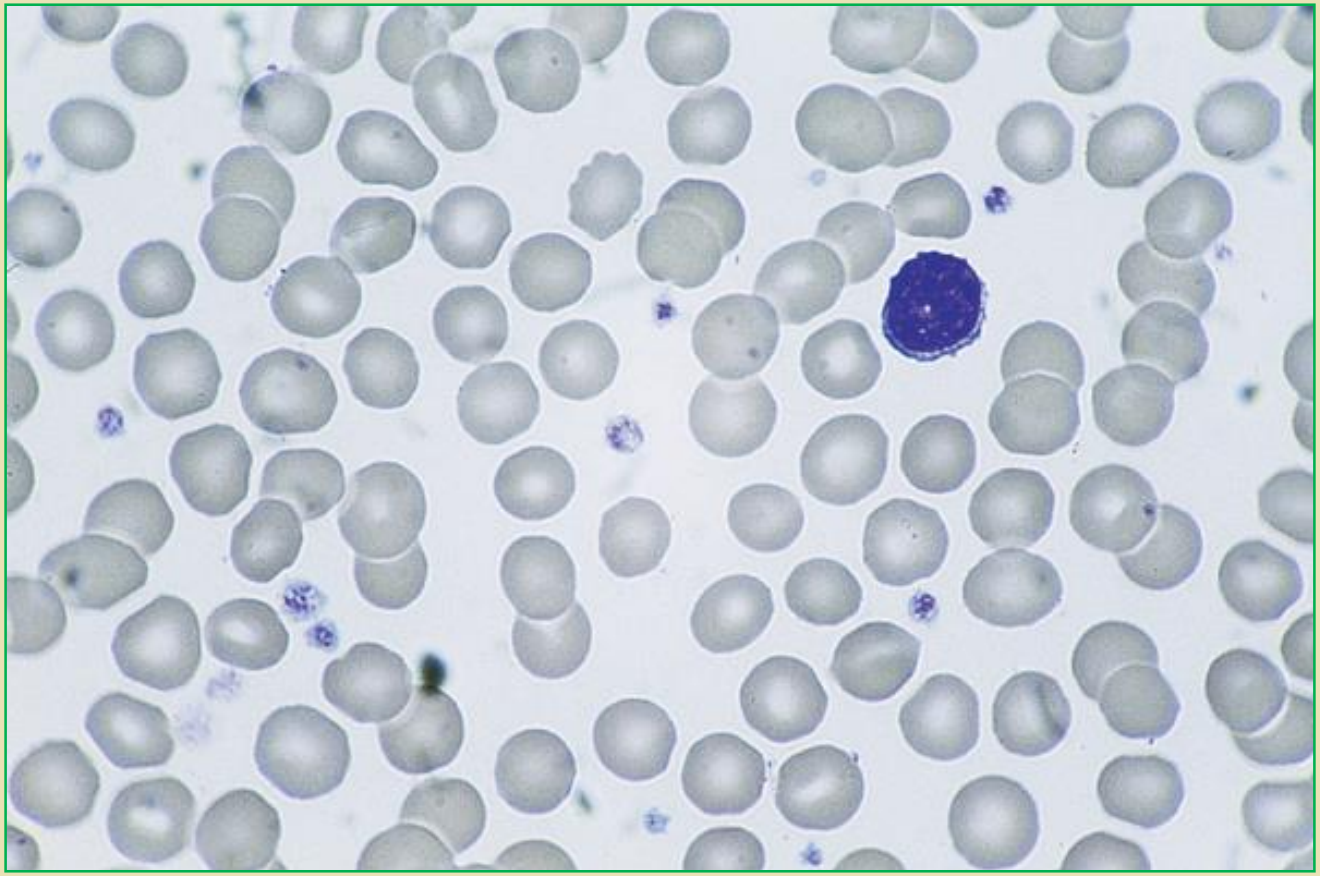
برخي از عوامل ايجاد كننده خطا در شمارش اتوماتيك سلولها

عامل خطا	توضيحات
• جمع‌آوري و يا نگهداري نامناسب نمونه	✓نمونه مربوط به بيمار ديگر باشد، آزمايش‌هاي درخواستي چيز ديگري باشند ✓رقيق شدن نمونه؛ مثلاً نمونه از محلي گرفته شود كه در بالاتر از آن تزريق داخل وريدي انجام مي‌گيرد و يا نسبت محلول EDTA به خون زياد باشد ✓جمع‌آوري خون در ظرفي كه داراي غلظت زياد EDTA باشد ✓غليظ شدن خون به علت بسته بودن طولاني مدت تورنيكت (بيش از يك دقيقه) ✓وجود لخته‌هاي ريز و كوچك در نمونه ✓ليز نمونه ✓حرارت دادن و يا منجمد نمودن سهوي نمونه ✓خون مانده ✓ نمونه آلوده با چربي زير جلدي
• نمونه‌برداري نامناسب	✓نقص اوليه در دستگاه ✓مخلوط شدن ناكافي نمونه ✓حجم ناكافي نمونه ✓ انسداد مجراي مكش دستگاه مثلاً توسط لخته خوني
• كاليبراسيون نامناسب دستگاه • نگهداري نامناسب دستگاه و معرف‌ها • خطاهاي ذاتي مربوط به متدولوژی • خطاهای ناشی از اختلالات مربوط به نمونه	✓استفاده از مواد كنترلي به عنوان كاليبراتور ✓در حضور هيپوكرومي، شمارشگرهاي امپدانسي MCV را پايين تر از ميزان واقعي برآورد مي‌كنند. عدم تشخيص سلول‌ها به علت كمبود پراكسيداز، در برخي دستگاه‌ها ✓ به عنوان مثال آگلوتينين‌هاي سرد باعث ايجاد خطا در ميزان هماتوكريت و يا انديس‌هاي اريتروسيتي مي‌گردند. همچنين نقص يا كمبود پراكسيداز ممكن است باعث نوتروپني كاذب در بعضي سيستم‌ها گردد

منابع خطا در آنالیزرهای هماتولوژی

- منابع خطا در شمارش اتوماتیک پلاکتها
- منابع خطا در شمارش اتوماتیک گلبول‌های سفید
- منابع خطا در شمارش اتوماتیک گلبول‌های قرمز

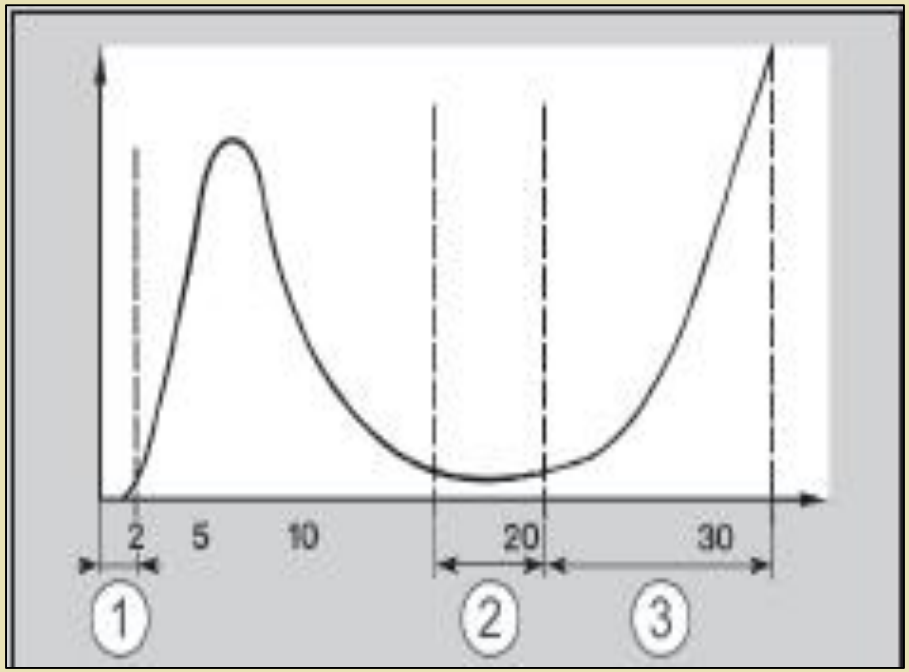
منابع خطا در شمارش اتوماتیک پلاکت‌ها



اساس شمارش اتوماتیک پلاکتها

- در آناليزرهاي هماتولوژي شمارش اريتروسيت‌ها و پلاكت‌ها دريك جايگاه و به صورت توأم انجام مي‌گيرد.

- در جايگاه شمارش RBC/PLT، ذراتي كه حجم آنها بين fL ۲۰-۲ باشد به‌عنوان پلاكت و ذرات بين ۳۶۰-۳۶ فمتوليتر به‌عنوان گلبول قرمز شمارش مي‌گردند.



در شکل مقابل:

۱. سلولهای کوچک
۲. شیستوسیت‌ها
۳. میکروسیت‌ها

افزايش كاذب شمارش اتوماتيك پلاكت‌ها

- شمارش ذرات ديگر به جاي پلاكت يكي از ايرادهاي غالب آناليزرهاي هماتولوژي است.
- چنين ذراتي ممكن است در محلول‌هاي رقيق‌كننده، در نمونة خون و يا متعاقب تركيب خون با محلول‌هاي دستگاه بوجود آيند.

- معمولاً افزايش كاذب شمارش اتوماتيک پلاكت‌ها در موارد زير رخ می‌دهد:
  - اختلالات مربوط به گلبولهای قرمز
  - قطعات سيتوپلاسمي سلولهای هسته‌دار
  - ميكروارگانيسمها
  - ليپيدها
  - كرايوپروتئينها (كرايوگلوبولين و كرايوفيبرينوژن و ...)

افزايش كاذب شمارش اتوماتيك پلاكت‌ها

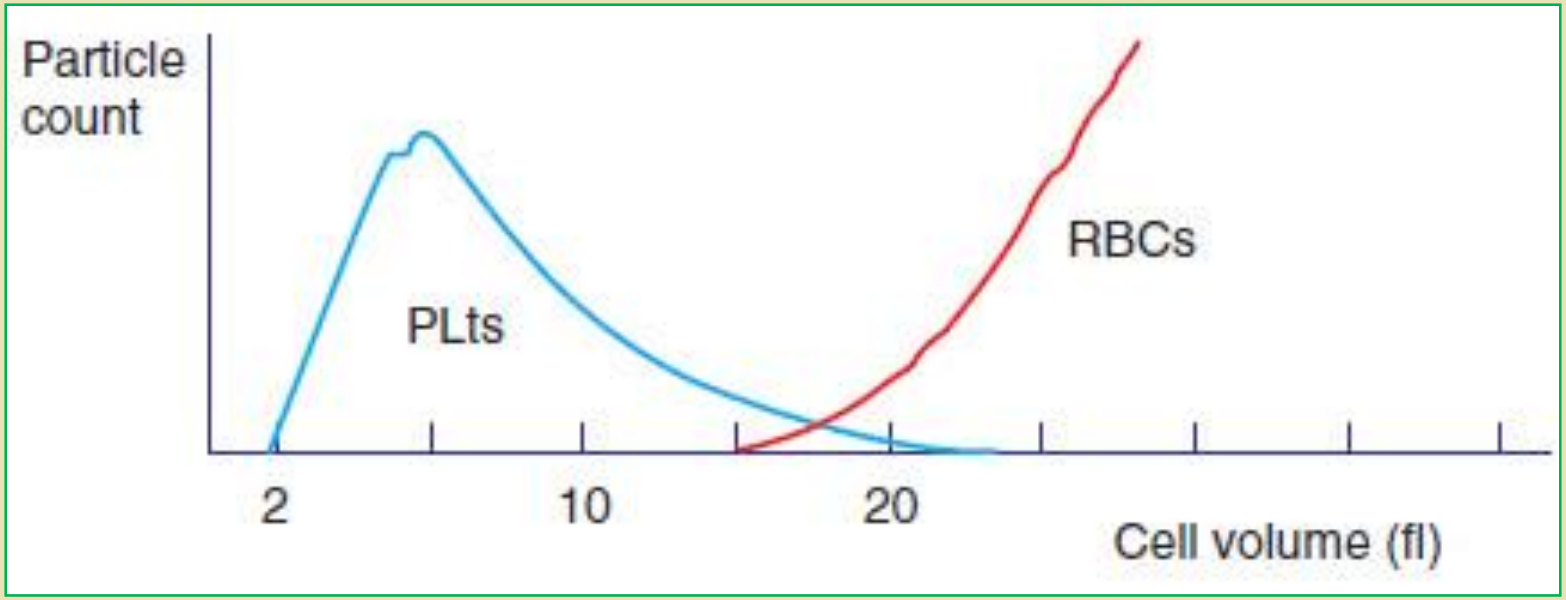
الف: اختلالات مربوط به گلبولهای قرمز

- اريتروسيت‌هاي بسيار ميكروسيت ⇦ دربيماري هموگلوبين H و آنمی فقرآهن شديد
- اريتروسيت‌هاي شكسته شده ⇦ در همولیز ميكروآنژيوپاتيک

☜ در مواردي چون DIC، TTP، HUS اگرچه تعداد واقعي پلاكت‌ها كاهش مي‌يابد ولي آناليزرهاي هماتولوژي شمارش آنها را بطور كاذب بالا نشان مي‌دهند

- ميكرواسفروسيت‌های بوجود آمده در سوختگی‌های شديد

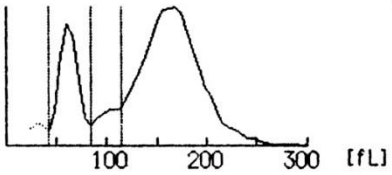
☝ در موارد مذكور سلولها پايين‌تر از آستانة تشخيص اريتروسيتي آناليزرهاي هماتولوژي قرار مي‌گيرند، باعث افزايش كاذب شمارش پلاكت‌ها مي‌شوند.



افزايش كاذب شمارش پلاكت‌ها در حضور فراگمانته‌هاي گلبول‌هاي قرمز

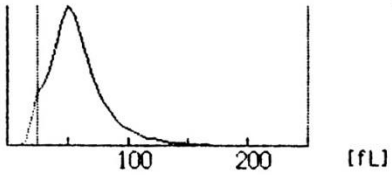
WBC		5.8×10³/μL
RBC	RL*	5.65×10⁶/μL
HGB	-	8.4g/dL
HCT	RL*	32.5%
MCV	RL*	57.5fL
MCH	RL*	14.9pg
MCHC	RL*	25.8g/dL
PLT	PU!	1884×10³/μL

WBC



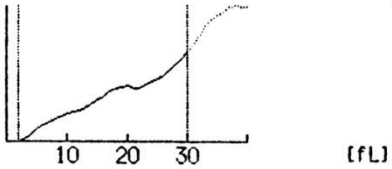
LYM%	21.0%
MXD%	7.2%
NEUT%	71.8%
LYM#	1.2×10³/μL
MXD#	0.4×10³/μL
NEUT#	4.2×10³/μL

RBC



RDW RL* 32.3%

PLT

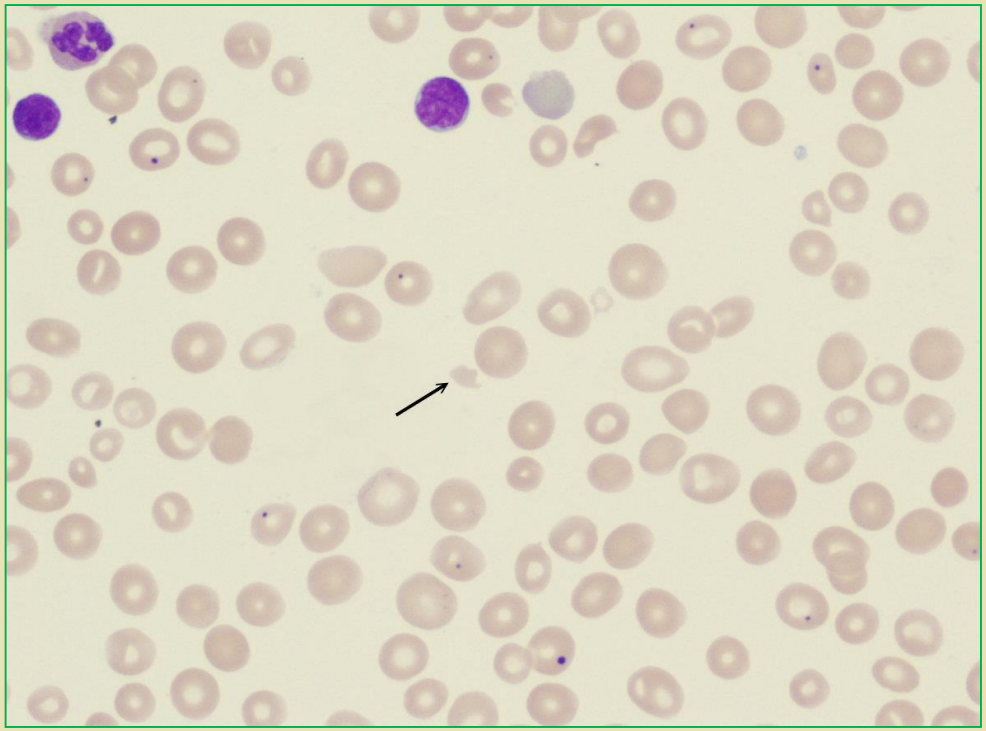


PDW	DW	---.-fL
MPV	PU	---.-fL
P-LCR	PU	---.-%

در اين شكل پاسخ آزمون CBC يكي از مراجعين بيمارستان شهدا كرمانشاه كه مبتلا به TTP بود، نشان داده شده است.

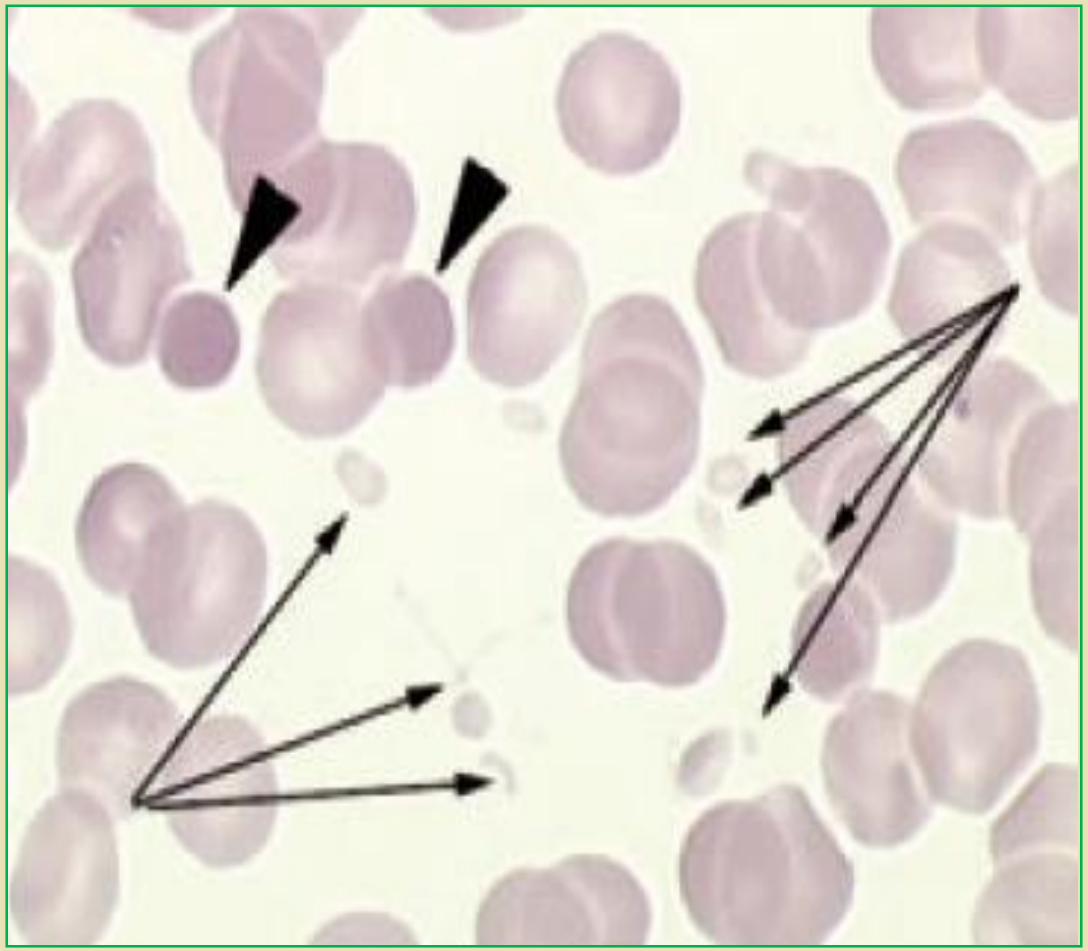
☜شمارش واقعي پلاكت‌هاي اين بيمار ۸۰×۱۰³ /μL بود.

☜به پارامترهاي MCV، RDW، PLT و نيز هيستوگرام‌هاي اريتروسيتي و پلاكتي توجه فرماييد.



افزايش كاذب شمارش پلاكت‌ها در حضور فراگمانته‌هاي گلبول‌هاي قرمز

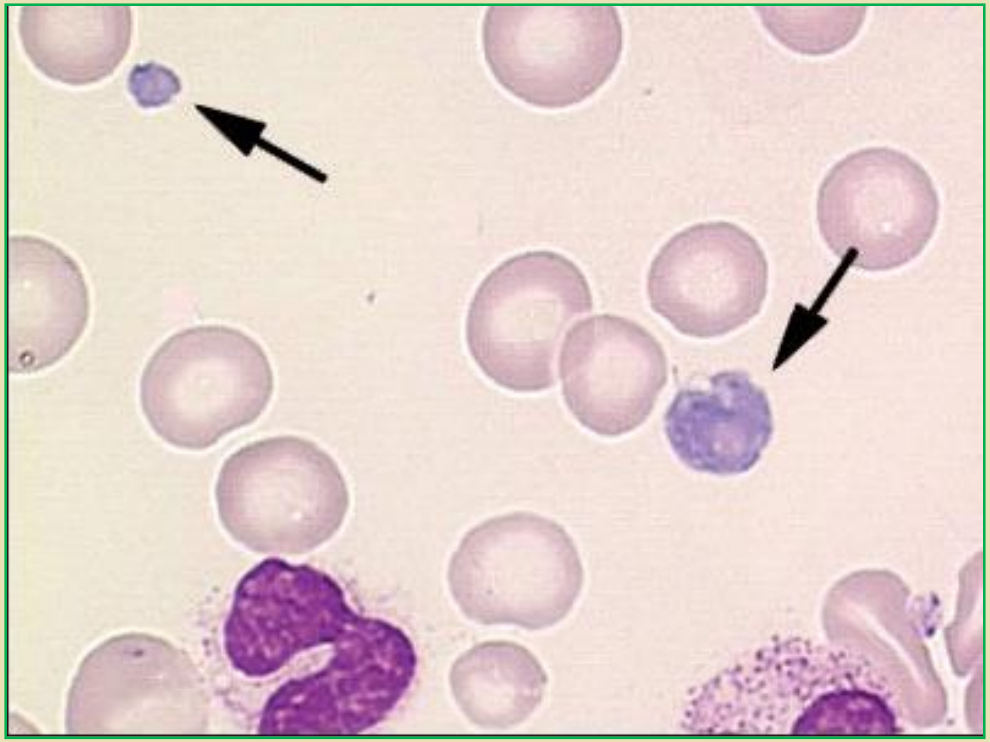
- متعاقب سوختگی حاد تغییرات متعددی در اریتروسیتها شامل اسفروسیتها (پیکانهای کوتاه) و قطعات بسیار کوچک اریتروسیتها (پیکانهای بلند) ممکن است رخ دهد.



ب. قطعات سيتوپلاسمي سلول‌های هسته‌دار

- این قطعات که قطري حدود ۵-۳ میکرون دارند در مواردي نظير HCL، AML، لنفوم و یا عفونت‌هاي شدید، حضور دارند.

- قطعات سیتوپلاسمی سلولهای لنفومایی (پیکانها) موجود در جریان خون. تشخیص
  - ☜ این قطعات هم به روش میکروسکوپی و هم توسط آنالیزرهای هماتولوژی از پلاکتها مشکل است.



ب. قطعات سيتوپلاسمي سلول‌های هسته‌دار

- شمارش قطعات لكوسيتي و اريتروسيتي به عنوان پلاكت در بيماران مبتلا به لوسمي حاد، ممكن است ترمبوسيتوپني بيمار را مخفي نموده و با جلوگيري از تزريق پلاكت و يا تأخير در آن عوارض وخيمي را بدنبال داشته باشد.

- از آنجا که شمارش پلاکتی طبیعی و یا افزایش یافته در بیماران مبتلا به لوسمي‌های حاد نامعمول است، به هنگام مشاهده این حالت ویا هرگونه افزایش پیش‌بيني‌نشده در شمارش پلاکت‌ها در این بیماران، گسترة خون محیطي بررسي شده و نیز شمارش پلاکتي به روش هموسیتومتر فازکنتراست انجام گیرد (بویژه به هنگام مشاهده علایم خونریزی).

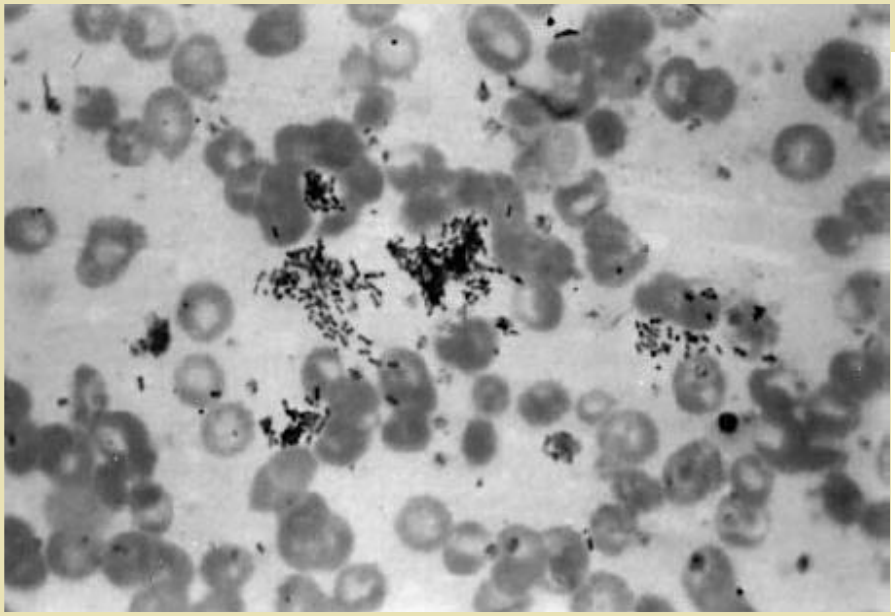
ج. میکروارگانیسم‌ها

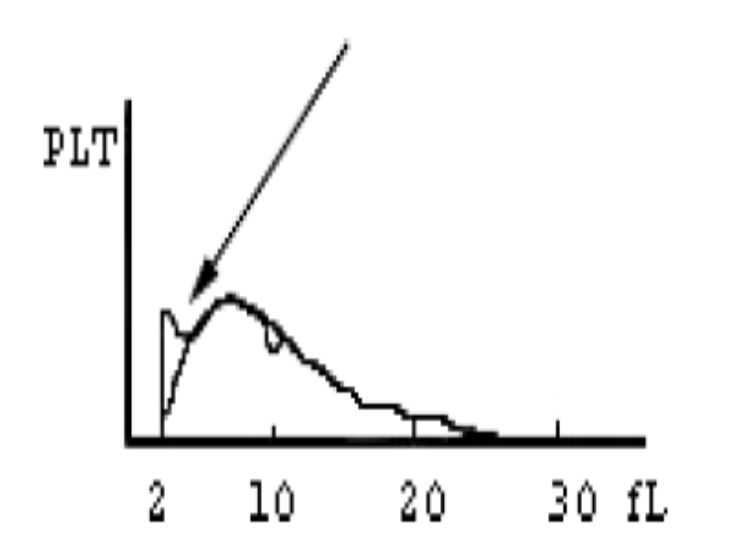
- در موارد نادر باکتریمی شمارش اتوماتیک پلاکتها ممکن است بصورت کاذب افزایش یابد.

☜در این حالت هیستوگرام پلاکتها غالباً غیرطبیعی بوده و یک جابجایی به سمت چپ درآن دیده می‌شود (ناشی از باکتریها یا توده های باکتریایی).

☜در چنین مواردی غالباً با بررسی میکروسکوپی گستره خونی می‌توان حضور باکتریها را مشاهده نمود.

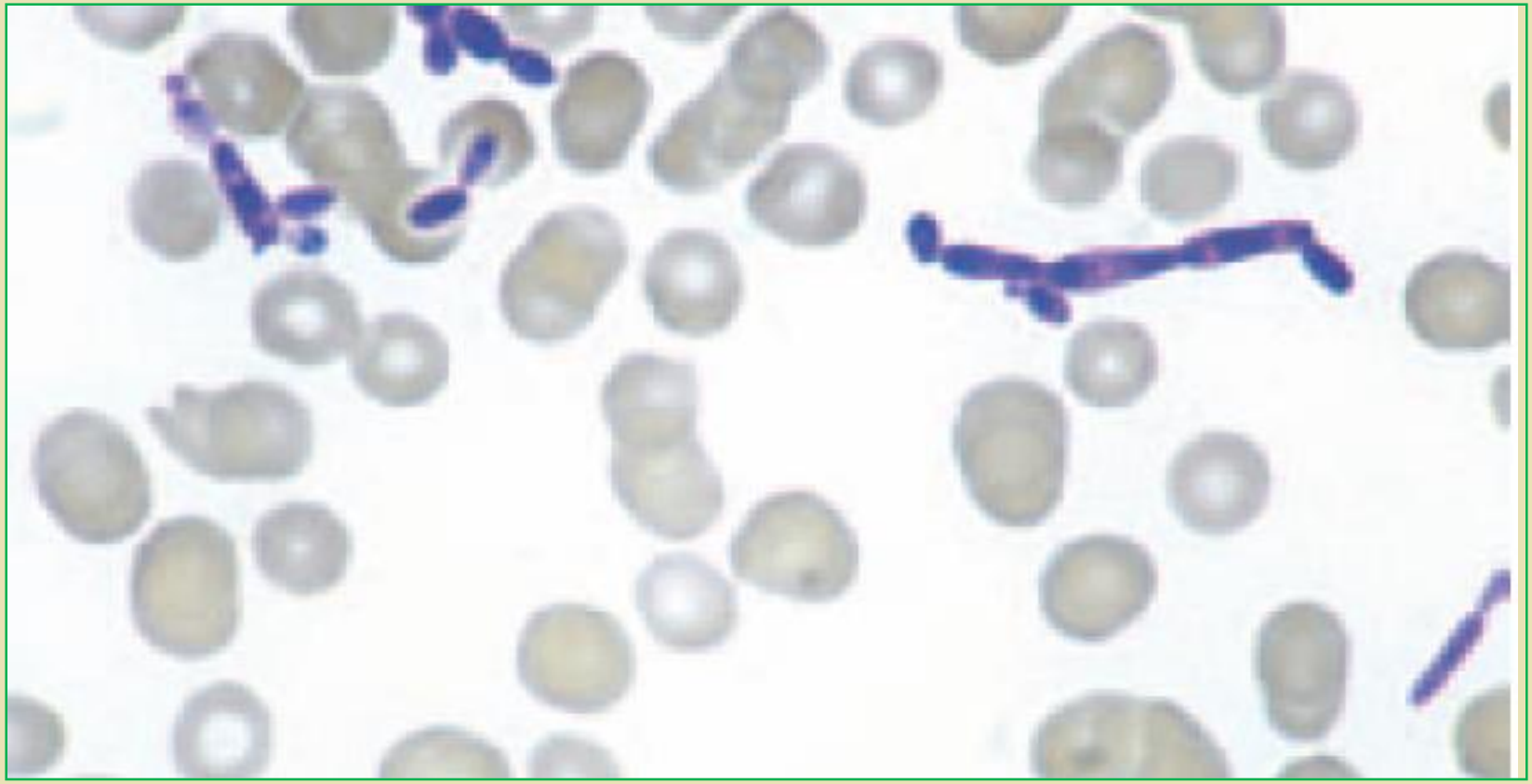
- گاهی در بیماران مبتلا به سپتیسمی بدلیل تاخیر در آنالیز نمونه، ما شاهد باکتریمی مشخص هستیم.





ج. ميكروارگانيسم‌ها

- قارچ‌ها نيز مي‌توانند باعث افزايش كاذب شمارش پلاكت‌ها شوند.
- مثلاً مواردي از كانديديازيس در برخي از بيماران مبتلا به AML كه باعث افزايش كاذب شمارش پلاكت‌ها شده گزارش شده است.



د. لیپیدها

- در بیماران مبتلا به شیلومیکرونمی، گاهی در نمونه‌های گرفته شده بعد از صرف غذا، و یا درمانهای تغذیه‌ای خاص لیپیدها ممکن است در شرایط in vitro تشکیل قطرات کوچکی دهند و بدین شکل با شمارش اتوماتیک پلاکتها (و حتی شمارش RBC، WBC و سنجش Hb) تداخل ایجاد کنند.

☜ لیپیدها بیشتر روش‌های اپتیکال را تحت تاثیر قرار می‌دهند. لیپیدها دارای شاخص انکسار بالایی بوده و می‌توانند در ناحیه پلاکتها و یا ناحیه دبریس برخی سیستم‌ها ایجاد سیگنال‌های غیرطبیعی مزاحم نمایند.

☜ در چنین حالتی بررسی تخصصی Flagها و اسکاترگرامهای ارائه شده نقش کلیدی در تشخیص اثر تداخلی لیپیدها در نتایج آزمون CBC دارد.

ه. کرایوپروتئین‌ها (کرایوگلوبولین و کرایوفیبرینوژن و ...)

- کرایوگلوبولین‌ها مي‌توانند منجر به افزایش کاذب در شمارش لکوسیت‌ها، پلاکت‌ها و در موارد نادر شمارش اریتروسیت‌ها شوند.

☜ میزان اختلال ناشی از این پروتئینها بستگی به اندازه رسوب‌های آنها دارد:

- چنانچه اندازه رسوبات کرایو کوچک باشد (در حد اندازه پلاکت‌ها)، مي‌توانند شمارش پلاکتها را (حتی تا هشت برابر) افزایش دهد.
- کرایوپرسیپیتیتهای با اندازه بزرگتر بعنوان WBC شمارش مي‌شوند.

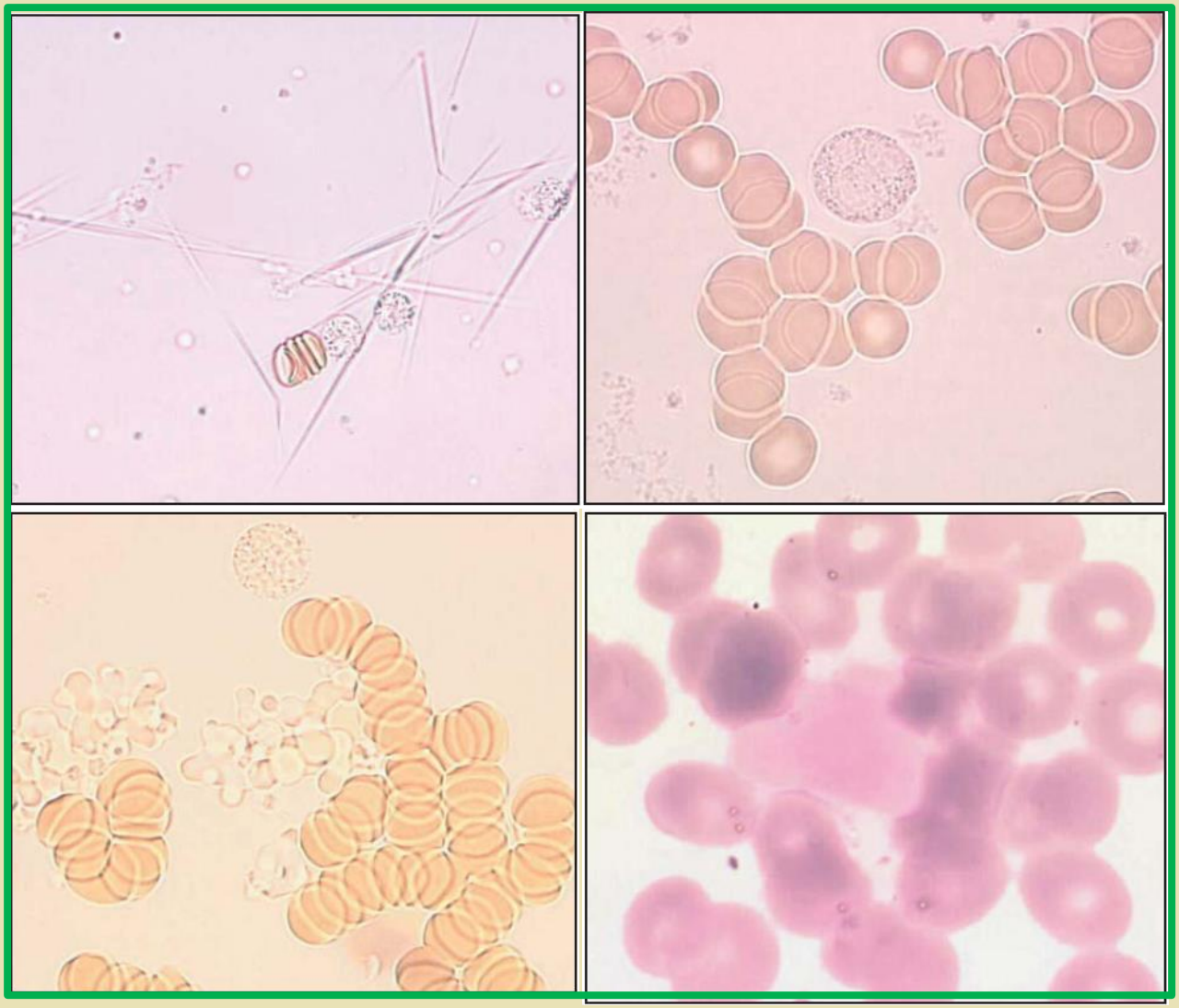
- کرایوپروتئین‌ها ممکن است در بیماران مبتلا به اختلالات لنفوپرولیفراتیو، بیماریهاي اتوایمیون مثل SLE و یا بیماریهاي عفوني دیده شود.

☜ انکوباسیون نمونة حاوي کرایوپروتئین در ۳۷ درجه به مدت ۶۰-۱۵ دقیقه (بسته به غلظت کرایوپروتئین)، بلافاصله پیش از انجام آزمایش، اغلب شمارش قابل قبولي از WBC و پلاکت‌ها را بدست مي‌دهد.

☜ در برخي موارد ممکن است لازم باشد نمونه درسرنگ گرم جمع‌آوري گردد و یا شمارش WBC و پلاکت به روش دستي انجام گیرد.

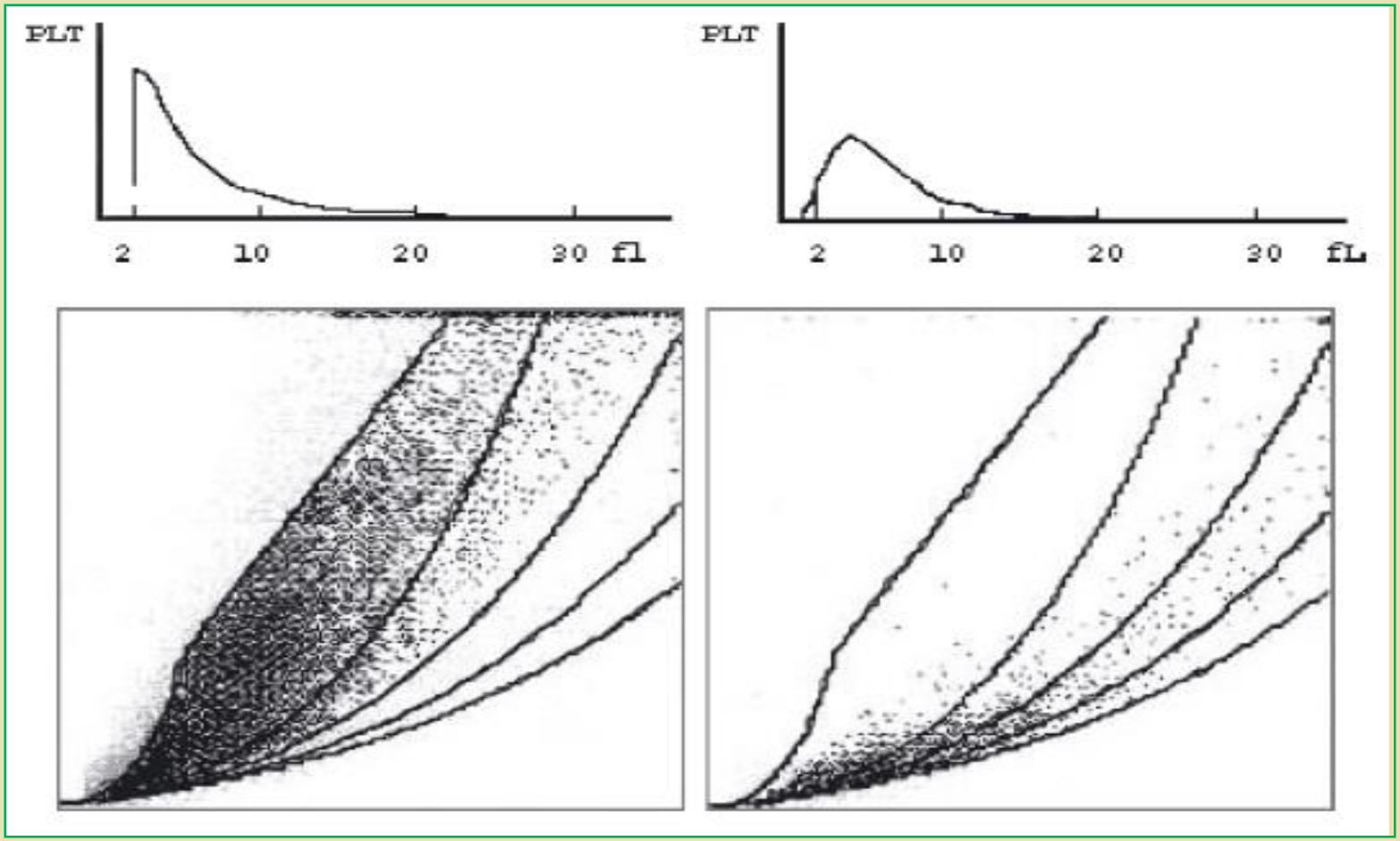
کرایوگلبولین‌ها در اسمیر خون محیطی

- در صورت حضور این پروتئین‌ها ممکن است اسمیر خون محیطي نمايي از ساختمان‌هاي كريستالي، دستجات يا اجتماعاتي از ذرات كوچك يا مواد گلبولار را نشان دهد.



- اندازه کوچک پارتیکلهای ایجاد شده در کرایوگلوبولینمی باعث شیفت هیستوگرام پلاکتی به سمت چپ مي‌شود (بالا سمت چپ).
- سیتوگرام پلاکتی توسط پارتیکلهای با اندازه متفاوت پر شده است (پایین سمت چپ).

- متعاقب گرم کردن نمونه در ۳۷ درجه، کرایوگلوبولینها حل شده و شمارشهای کاذب و اختلال در هیستوگرامها و سیتوگرامها برطرف گردیدند (سمت راست، بالا و پایین).



اقدام مناسب در موارد افزايش كاذب شمارش پلاكتها

۱. با استفاده از هموسيتومتر و محلول اگزالات آمونيوم ۱% و يا محلول بار (Barrs Fluid) شمارش پلاكت‌ها به روش دستي انجام گيرد.

۲. شمارش پلاكت‌هاي بيمار به صورت تقريبي از روي گستره خوني بيمار تخمين زده شود.

در اين حالت شمارش پلاكتي بيمار با عبارت زير گزارش مي‌گردد:

Estimated platelet count by peripheral blood smear analysis is about … .

۳. عبارتي دال بر عدم قابل اعتماد بودن شمارش اتوماتيك پلاكت‌ها به دليل تداخل اثر عواملي نظير شيستوسيت‌ها، ميكروسيت‌ها، ميكروارگانيسم‌ها و ... ، در برگه پاسخ بيمار قيد شود مثلاً:

Platelet count is falsely higher than true value due to interference by microcytic RBCs, schisticytes, micro organism, ….

کاهش کاذب شمارش اتوماتیک پلاکت‌ها

- موارد کاهش کاذب پلاکتها بسیار شایع‌تر از موارد افزایش کاذب آنهاست

پديده تجمع پلاكت‌ها

- فراوان‌ترين علت ترمبوسيتوپني كاذب، پديده تجمع پلاكت‌ها مي‌باشد.
- علل:

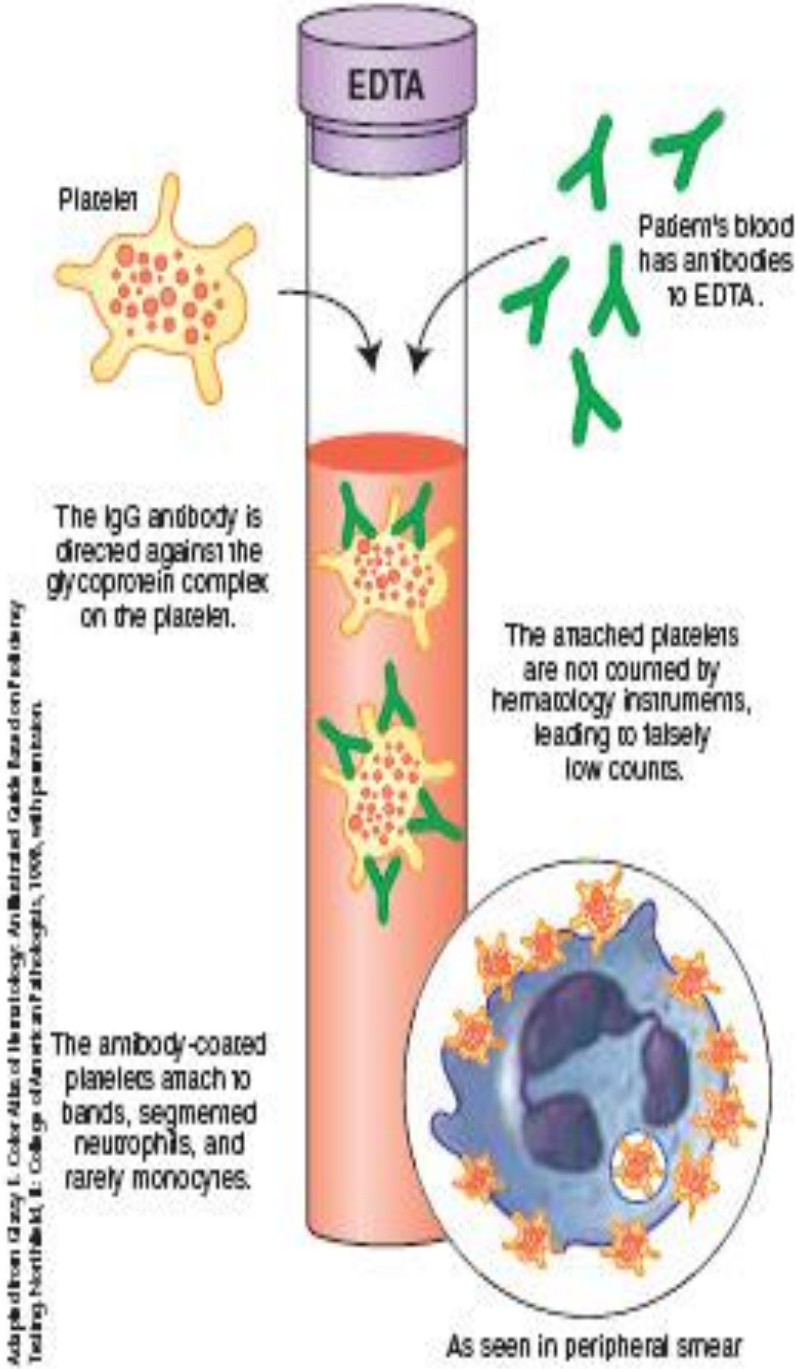
- ممكن است مربوط به فعال شدن پلاكت‌ها در طي يك خونگيري مشكل باشد
- ممكن است با واسطة آنتي‌بادي IgG و وابسته به EDTA باشد.

☜ آنتي‌بادي‌هاي IgG ضد پلاكتي، عليه يك آنتي‌ژن مخفي (Crypto-antigen) موجود در Gp IIb پلاكتي عمل مي‌كنند.

ترمبوسيتوپني كاذب وابسته به EDTA

- ترومبوسیتوپنی کاذب مرتبط با EDTA یک پدیده آزمایشگاهی بوده و باعث توده‌اي شدن پلاكتها مي‌شود.

- در این حالت آنالیزرهای هماتولوژی نمی‌توانند پلاکتهای موجود در کلمپ‌هاي بزرگ را بعنوان پلاکت شمارش نمایند (اینها معمولاً بعنوان WBC شمارش مي‌شوند) ⇦ وقوع ترومبوسیتوپنی کاذب و گاهی افزایش کاذب لکوسیت‌ها



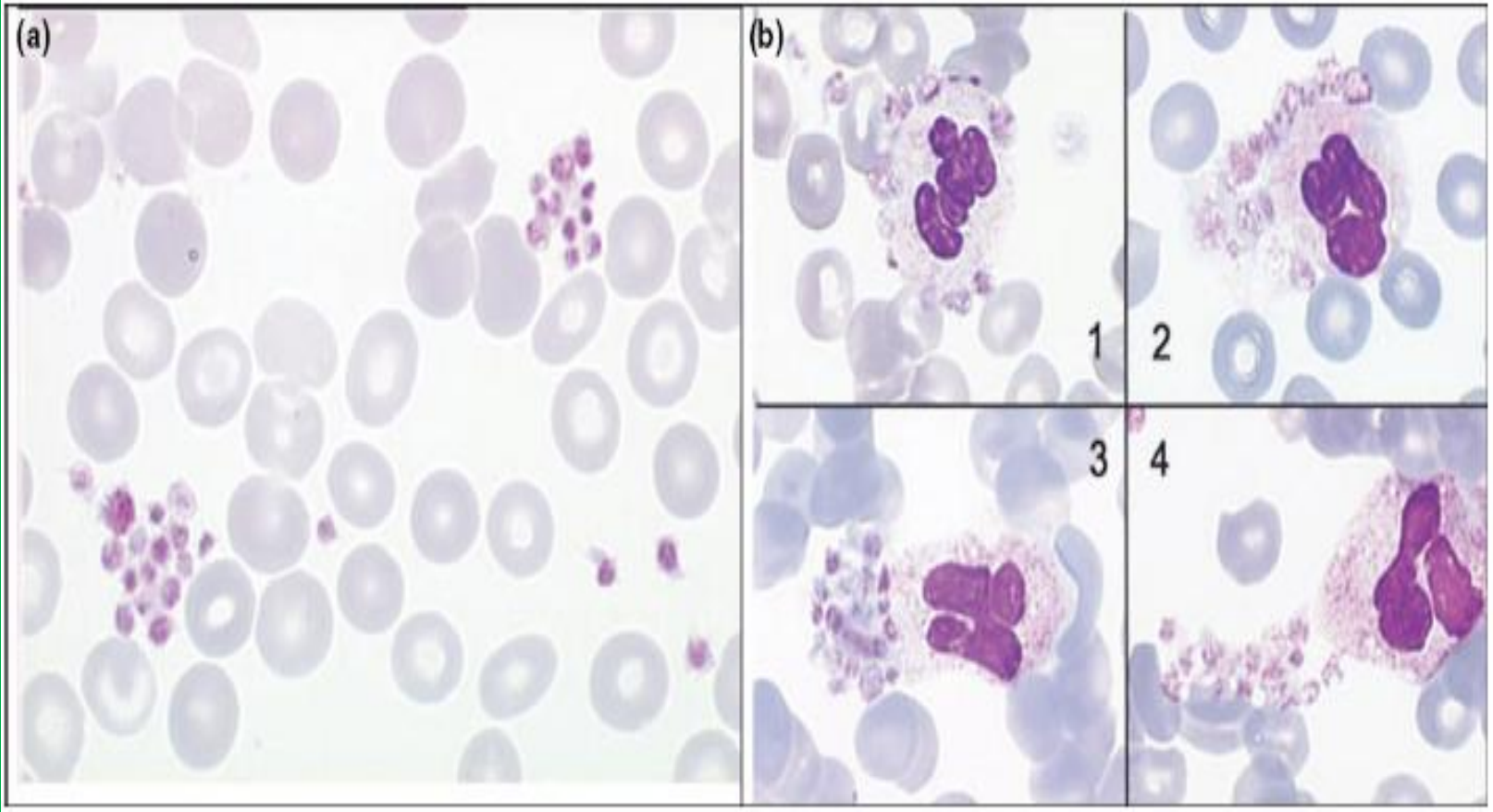
ترمبوسيتوپني كاذب ناشی از اقماری شدن پلاكتها پيرامون گلبولهای سفيد

- با واسطة آنتي‌بادي وابسته به EDTA رخ مي‌دهد
- پلاكت‌ها به دور نوتروفيل‌ها يا منوسيت‌ها حلقه زده و جزء شمارش پلاكتي محسوب نمي‌گردند.
- يك پديده ايمونولوژيك ناشی از حضور آنتي‌بادي‌هاي طبيعي بوده كه در آن پلاكت‌ها به شكل گزينشي در پيرامون نوتروفيل‌ها آرايش مي‌يابند.
- آنتي‌بادي يك ساختار آنتي‌ژنتيك مشترك را بر سطح پلاكت‌ها و نوتروفيل‌ها شناسايي كرده ⇦بين اين دو سلول پل مي‌زند.
- در اين پديده معمولاً شمارش اين سلولها كاهش خفيف تا متوسطی دارد (بين ۱۰۰-۵۰هزار).

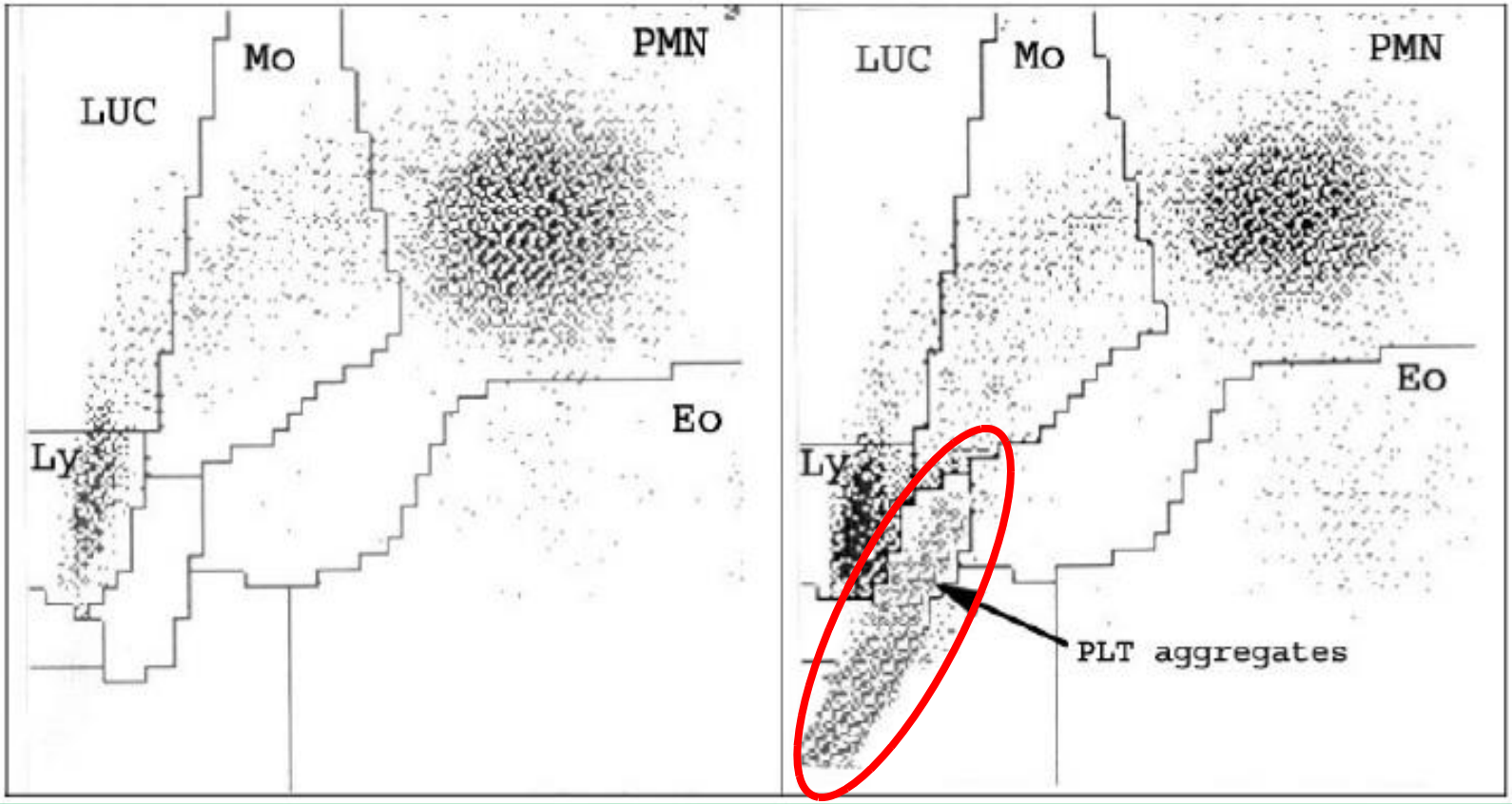
ترومبوسیتوپنی کاذب مرتبط با EDTA

(a). برخی ازتوده‌های پلاکتی ایجاد شده به بزرگی لکوسیتها بوده و بنابراین توسط آنالیزرها بعنوان WBC شمارش مي‌گردند.

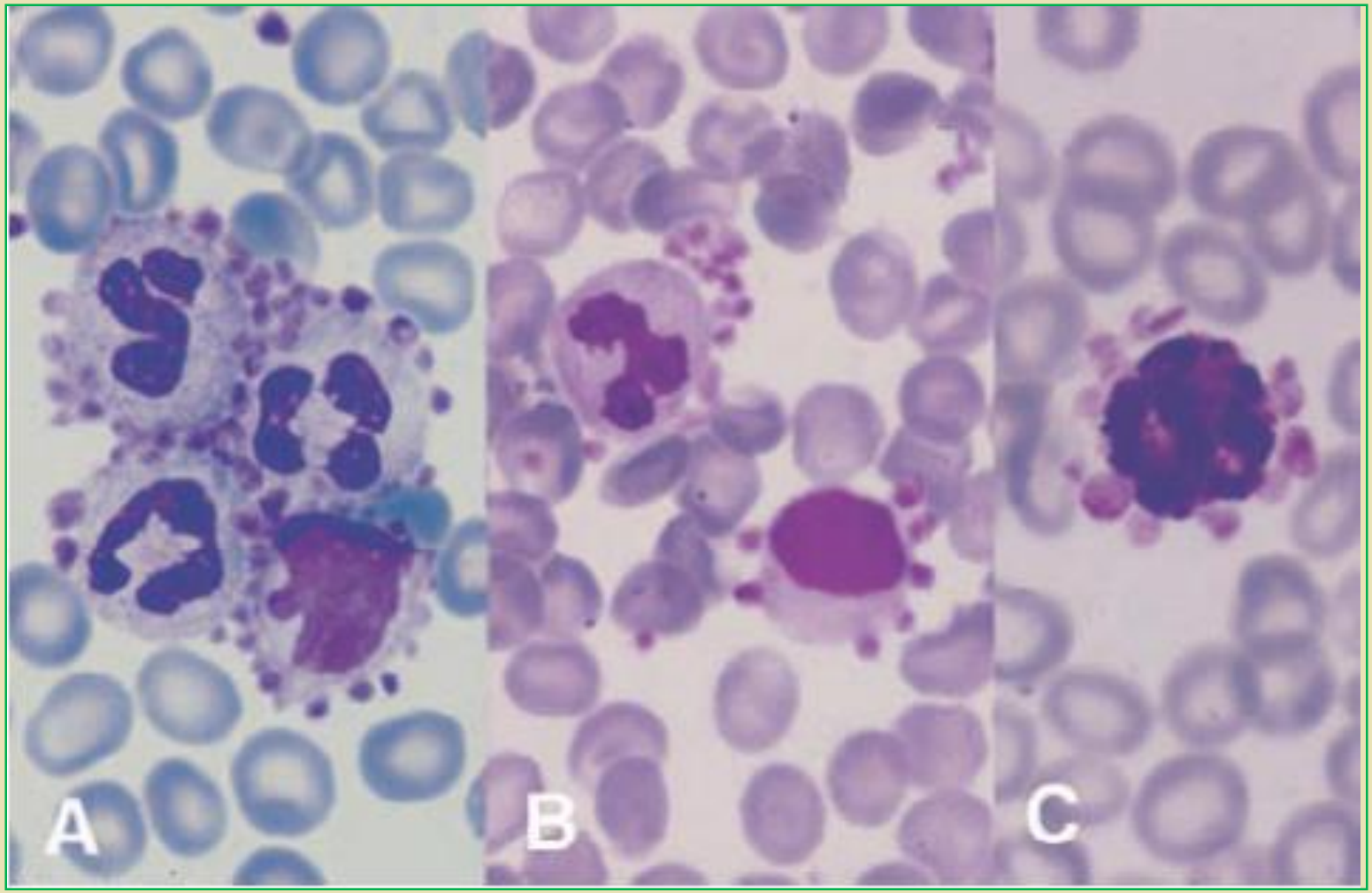
(b). اقماری شدن پلاکتها پیرامون سلولهای پلي مورفونوکلئار



- سیتوگرام WBC در یک نمونه دارای توده‌هاي پلاکتی القاء شده توسط EDTA (سمت راست) در مقایسه با یک نمونه طبیعی (سمت چپ) .
- توده‌هاي پلاکتی با اندازه‌هاي کوچک و متوسط ایجاد یک طرح راکت مانندی در سیتوگرام کانال پروکس کرده‌اند (علامت پیکان).
- این توده‌ها شمارش صحیح WBC را توسط دستگاه تحت تاثیر قرارمي‌دهند.

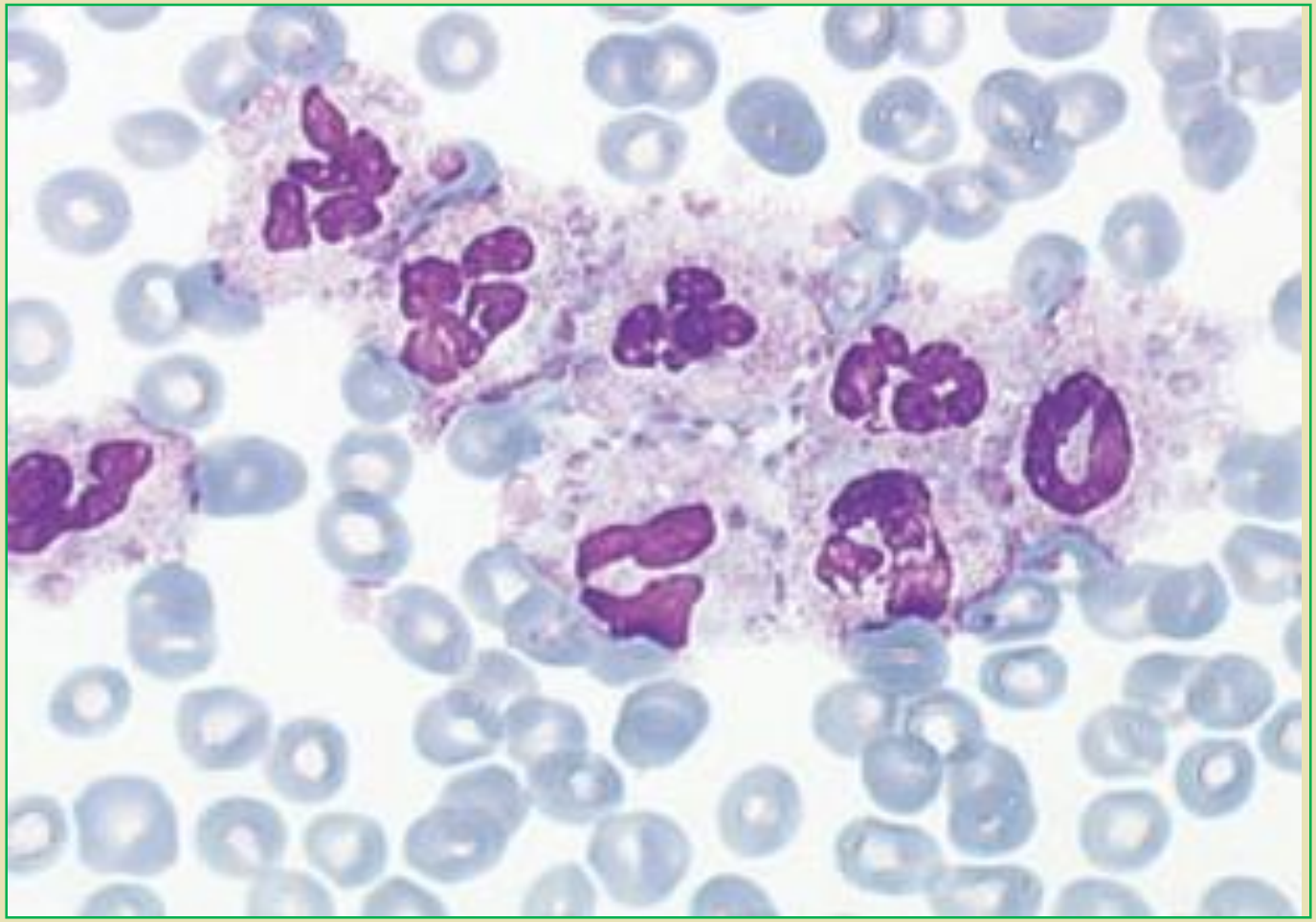


در موارد نادري ممكن است اقماري شدن پلاكت‌ها در پيرامون سلول‌هاي منوسيت (A)، لنفوسيت (B) و يا بازوفيل (C) رخ دهد.



- توده‌های PLT-WBC ناشی از پدیده اقماري شدن پلاکت‌ها پیرامون PMNها.

☜ در این حالت پلاکتها بین روزتهای پلاکت - نوتروفیل پل زده و ایجاد توده‌های بزرگی مي‌کنند.



پلاکت‌های بسیار بزرگ

- پلاکت‌هاي غول‌آسا (حجم بيش از ٤٠-٣٠ فمتوليتر) ممكن است باعث ترمبوسيتوپني كاذب شوند.

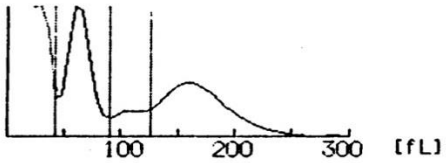
- پلاكت‌هاي غول‌آسا در سندرم‌هاي ارثي نادر مثل بيماري برنارد سولير و آنومالي مي‌هگلين، بيماري‌هاي ميلوپروليفراتيو و ... ديده مي‌شوند.

- در صورتي كه پلاكت‌هاي غول‌آسا درصد بالايي از جمعيت كلي پلاكت‌ها را تشكيل دهند، شمارش اتوماتيك پلاكت‌ها ممكن است به ميزان زيادي كاهش نشان دهد؟

No. 40
Date 83/04/09 10:03
Mode WB

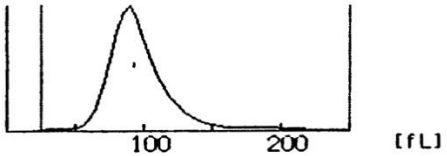
WBC	WL*	10.2×10³/μL
RBC		5.46×10⁶/μL
HGB		14.6g/dL
HCT	+	50.1%
MCV		91.8fL
MCH		26.7pg
MCHC	-	29.1g/dL
PLT	PL*	36×10³/μL

WBC



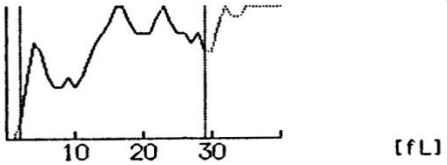
LYM%	WL*	42.4%
MXD%	WL*	11.3%
NEUT%	WL*	46.3%
LYM#	WL*	4.3×10³/μL
MXD#	WL*	1.2×10³/μL
NEUT#	WL*	4.7×10³/μL

RBC



RDW 13.7%

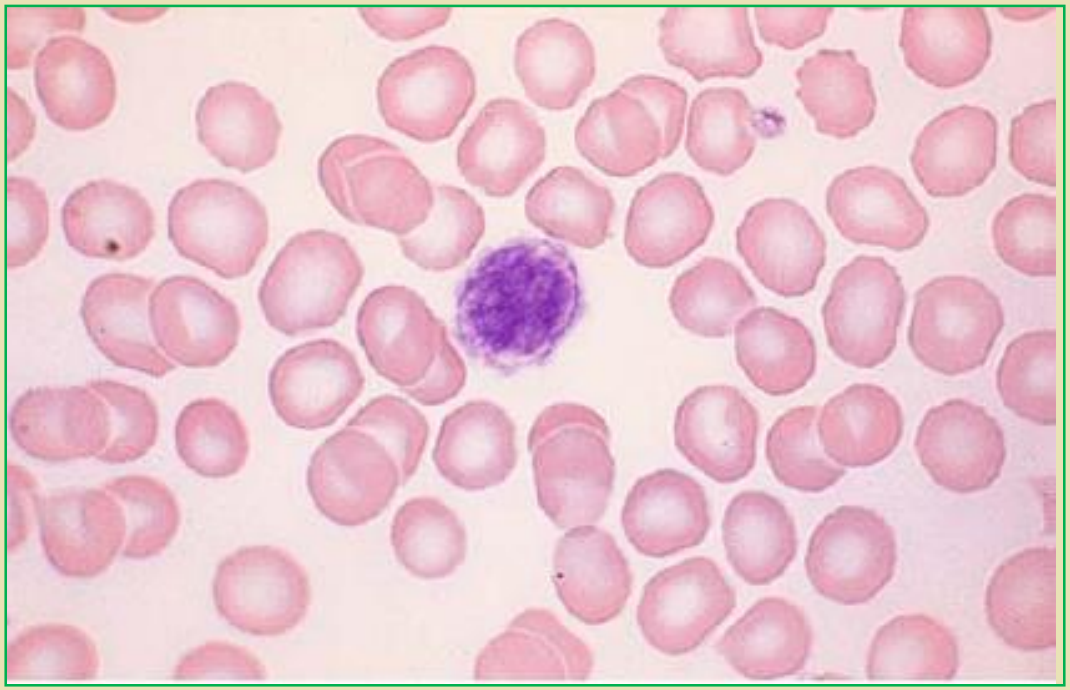
PLT



PDW	MP	---.-fL
MPV	PL	---.-fL
P-LCR	PL	---.-%

پاسخ آزمون CBC يك بيمار مبتلا به مگاترومبوسيت

به شمارش پايين پلاكتي، هيستوگرام غيرطبيعي پلاكتي و هشدارهاي اعلام شده توسط دستگاه، توجه فرماييد.



تشخيص افتراقی در موارد کاهش کاذب شمارش پلاکتها

- دو روش براي تعيين اينكه تجمع پلاكتي مشاهده شده، ثانويه به EDTA است و يا ساير مكانيسم‌ها در آن دخيل هستند، وجود دارد.

- ۱. جمع‌آوري خون از انگشت با استفاده از اگزالات آمونيوم و شمارش پلاكت‌ها با ميكروسكوپ است. ☜ در اين حالت هيچگونه تجمع پلاكتي نبايد در خانه‌هاي مورد شمارش ديده شود و نيز شمارش پلاكتي بايد بيشتر از نمونة حاوي EDTA باشد.

- ۲. جمع‌آوري نمونة خون وريدي در ضد انعقاد سيترات سديم 3.8 % است. بدين ترتيب اسمير تهيه شده ازنمونة محتوي EDTA بايد تجمع پلاكتي نشان دهد درحاليكه در اسمير تهيه شده از نمونة حاوي سيترات سديم نبايد تجمع پلاكتي مشاهده شود. همچنين شمارش پلاكتي انجام گرفته شده بر روي نمونة حاوي سيترات سديم بايد بيشتر از نمونة حاوي EDTA باشد.

☜ در ترمبوسيتوپني كاذب وابسته به EDTA، غالباً MPV نرمال است. بنابراين چنانچه در يک بيمار فاقد خونريزي، با MPV طبيعي، شمارش اتوماتيك پلاكت‌ها پايين باشد بايستي نخست به ترمبوسيتوپني كاذب ناشي از EDTA مظنون شد.

☜ به منظور شمارش صحيح پلاكت‌ها در افراد داراي تجمع پلاكتي وابسته به EDTA مي‌توان از كانامايسين نيز كمك گرفت. در اين حالت ۲۰ ميلي‌گرم كانامايسين يا به ضد انعقاد مورد استفاده جهت جمع‌آوري خون و يا به خون جمع‌آوري شده با ضد انعقاد EDTA اضافه مي‌شود و سپس شمارش اتوماتيك پلاكت‌ها انجام مي‌گيرد.

اقدام مناسب در موارد كاهش كاذب شمارش پلاكتها

نكته:

- پديده‌هاي تجمع پلاكتي و اقماري شدن پلاكت‌ها تنها در شرايط آزمايشگاهي رخ داده و فاقد اهميت باليني هستند.
- اين پديده‌ها فقط از نظر تشخيص علت ترمبوسيتوپني و پيشگيري از آزمايش‌هاي اضافي و درمان‌هاي غير ضروري مهم مي‌باشند.
- به هر حال در چنين مواردي بايستي در برگه پاسخ بيمار به غير واقعي بودن شمارش پلاكت‌ها اشاره شود مثلاً:
- **Platelet count is not reliable (falsely low) due to aggregation.**
- و در صورت لزوم بدين صورت قيد شود:
- **Platelet count to be repeated on a new speciment.**
- در برخورد با يك شمارش پايين و غيرمنتظره پلاكتي، ضروري‌ست كه نمونة بيمار از نظر حضور رشته‌هاي فيبريني، تجمع پلاكتي، اقماري شدن پلاكت‌ها و پلاكت‌هاي درشت بررسي گرددد.
- به منظور تأييد شمارش دستگاهي سلول‌ها لازم است اسمير خون محيطي بررسي شودد. چنانچه شمارش اتوماتيك پايين پلاكتي كه با ارزيابي گسترة خون محيطي تأييد شده هنوز هم غيرمنتظره باشد، بايستي ضمن دقت در تكنيك نمونه‌گيري، يك نمونة جديد از بيمار گرفته شود و شمارش‌ها از نو انجام گيرد.

منابع خطا در
شمارش اتوماتیک گلبول‌های سفید

عوامل ايجاد كنندة لكوسيتوز كاذب

- ۱- اريتروسيت‌هاي هسته‌دار ⇦ مقاوم در مقابل اثر تخريب كنندگي محلول ليز كننده
- ۲- اريتروسيت‌هاي مقاوم به ليز

- در برخي هموگلوبينوپاتي‌ها (مثل هموگلوبين‌هاي S، C، E، D و O به شكل هتروزيگوت يا هموزيگوت)
- افراد مبتلا به اورمي شديد (در دستگاه‌هاي سري H)
- سلول‌هاي تارگت
- گلبول‌هاي قرمز جنين و نوزاد در برخي موارد
- توده‌هاي به هم چسبيده اريتروسيتي ناشی از حضور آگلوتينين‌هاي سرد.

☝ در موارد ذكر شده علاوه بر لكوسيتوز كاذب، معمولا با يك شمارش افتراقي معكوس (*نوتروفيل* < *لنفوسيت*) نيز مواجه هستيم زيرا غالباً اين سلول‌ها به عنوان لنفوسيت شمارش مي‌گردند.

پديده Carry-Over

- چنانچه يك نمونه داراي شمارش بالاي WBC باشد، ممكن است در نمونة بعدي كه توسط دستگاه آناليز مي‌شود تأثير گذاشته و باعث افزايش كاذب شمارش لكوسيت گردد.

- اين افزايش معمولاً ناچيز بوده ولي چنانچه WBC نمونه قبلي بيش از ۵۰هزار باشد خطاي ناشي از Carry-Over چشمگير بوده و مي‌تواند لكوپني نمونه بعدي را نرمال جلوه دهد.

- دراين موارد بايد دستگاه را چندين بار شستشو داد تا خطاي Carry-Over ازبين برود.

عوامل ایجاد کنندة لکوسیتوز کاذب

- حضور ذراتی در خون که ممکن است به عنوان لکوسیت شمارش شوند شامل:
- تجمع پلاکتي
- پلاکت‌هاي غول‌آسا
- پاراپروتئينمي
- توده‌های فیبرین
- هيپرليپيمي
- انگل مالاریا
- مواد موسيني ناشي از ترشح برخي تومورها
- آلودگي نمونه با چربي زيرجلدي
- کرایوپروتئین‌ها (کرایوگلوبولین وکرایوفیبرینوژن)
- آگلوتينين‌هاي سرد

پاسخ آزمون CBC مربوط به يك نوزاد نارس مبتلا به اريتروبلاستوز جنيني.

- نسبت لنفوسيت‌ها بيشتر از نوتروفيل‌هاست (Diff معكوس).
- در شمارش افتراقي به روش دستي:

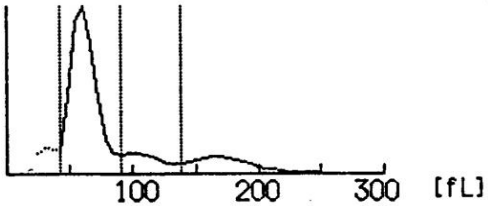
لنفوسيت‌ها برابر با ٤٧ درصد و NRBCها برابر WBC 125/100 بود.

شمارش واقعي WBC اين نوزاد برابر ۱۰^۳×٦/۱۲ بود

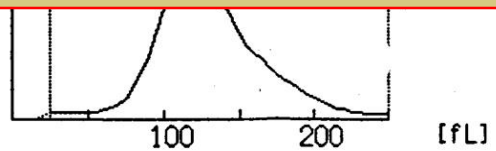
No. 25
Date 83/
Mode WB

WBC + 28.5×10³/μL
RBC − 3.70×10⁶/μL
HGB 14.3g/dL
HCT 45.1%
MCV +121.9fL
MCH + 38.6pg
MCHC 31.7g/dL
PLT AG 186×10³/μL

WBC

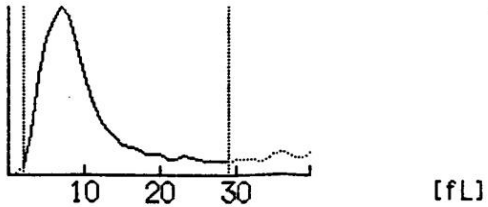


LYM% + 70.6%
MXD% 12.8%
NEUT% − 16.6%
LYM# 20.1×10³/μL
MXD# 3.6×10³/μL
NEUT# 4.8×10³/μL



RDW + 19.2%

PLT

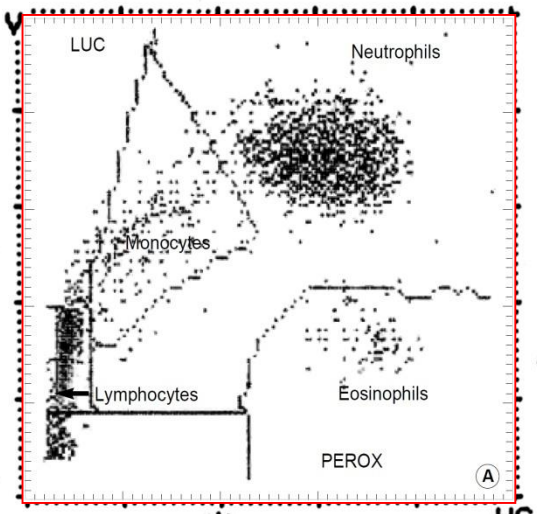


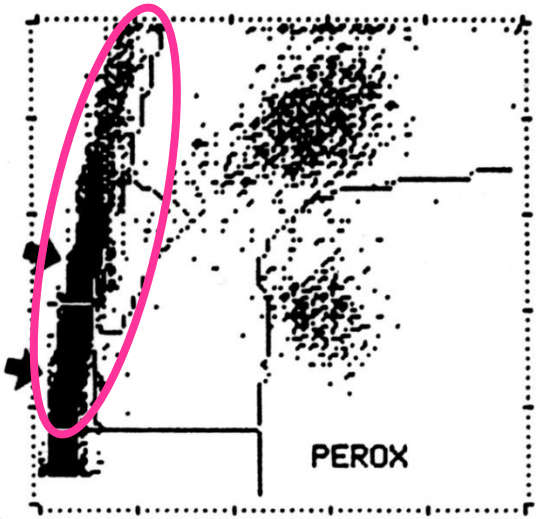
PDW 12.0fL
MPV 10.2fL
P-LCR 26.1%

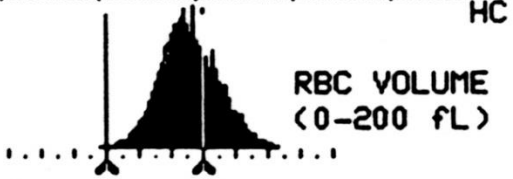
خطاي شمارش افتراقي آناليزر H2 ناشي از مقاومت به ليز RBCهاي نوزاد

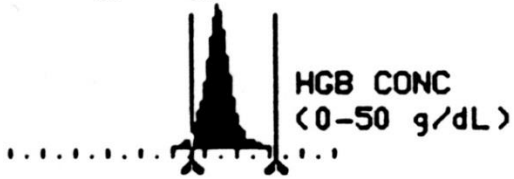
- در كانال پروكس برخي از RBCهاي مقاوم به ليز پايدار مانده و به عنوان لنفوسيت يا LUC شمارش مي‌گردند.
اين حالت منجر به افزايش كاذب Lymph و LUC و كاهش كاذب Neutهامي‌شود

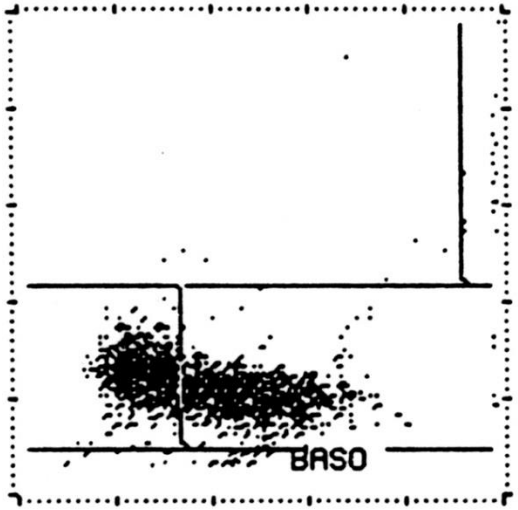
SEQ#	0007079		
TIME	15:09 29/07/94		
SYS#	001		
ID	000000132986		
	CBC		
	5.48*	x10⁹/L	WBC
L	3.41	x10¹²/L	RBC
	12.8	g/dL	HGB
	.383		HCT
H	112.2	fL	MCV
H	37.6	pg	MCH
	33.5	g/dL	MCHC
H	17.9	%	RDW
H	2.73	g/dL	HDW
	191	x10⁹/L	PLT
L	7.1	fL	MPV
H	55.6	%	PDW
	.13	%	PCT
RBC FLAGS			1203
	%	DIFF	10⁹/L
L	4.2*	NEUT L	.23*
H	60.4*	LYMP H	3.31*
L	.7*	MONO L	.04*
	1.2*	EOS	.06*
	.6*	BASO	.03*
H	32.9*	LUC H	1.80*
	LI	L	1.56
	MPXI		-8.5
WBC FLAGS			2044



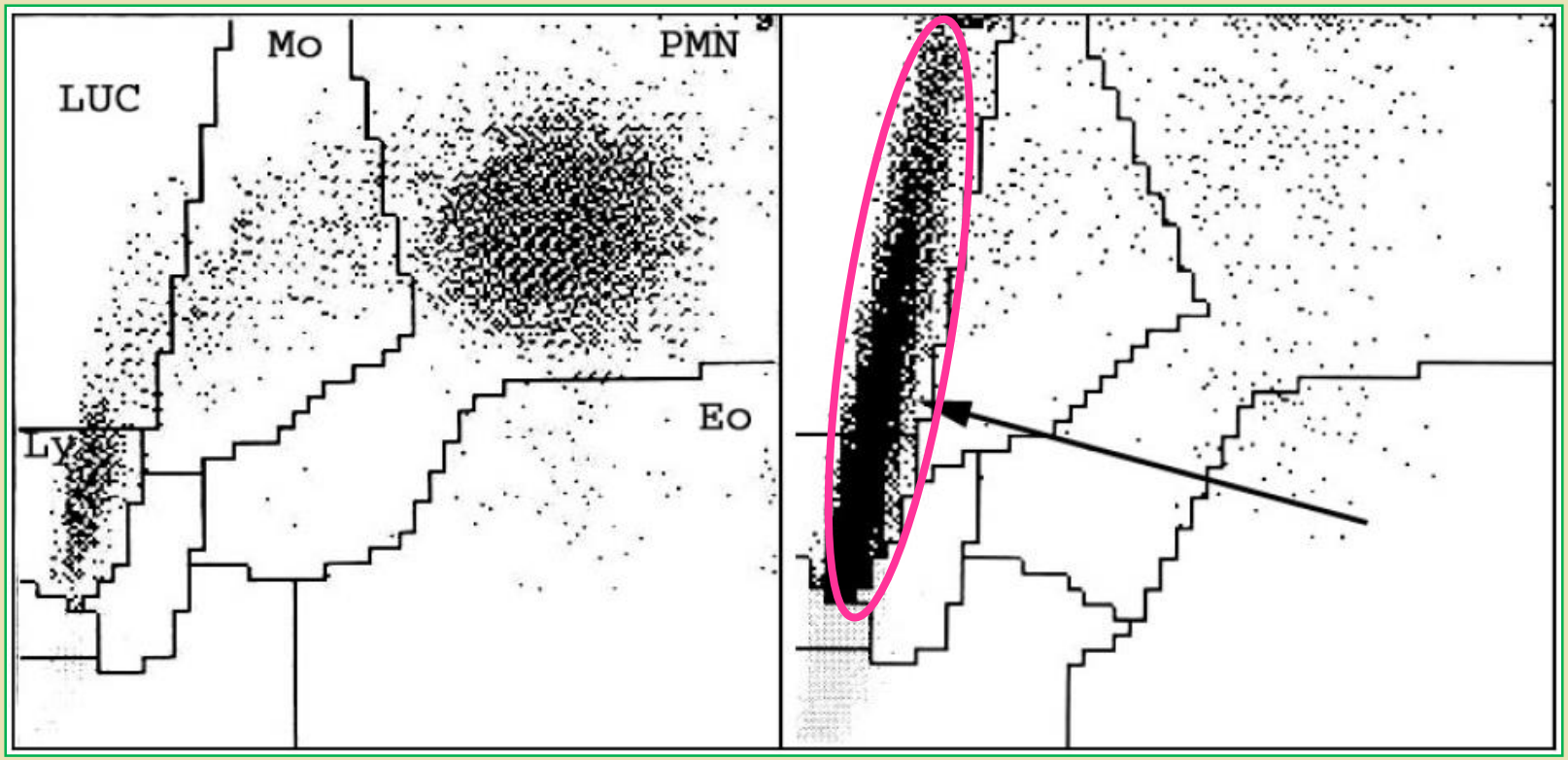


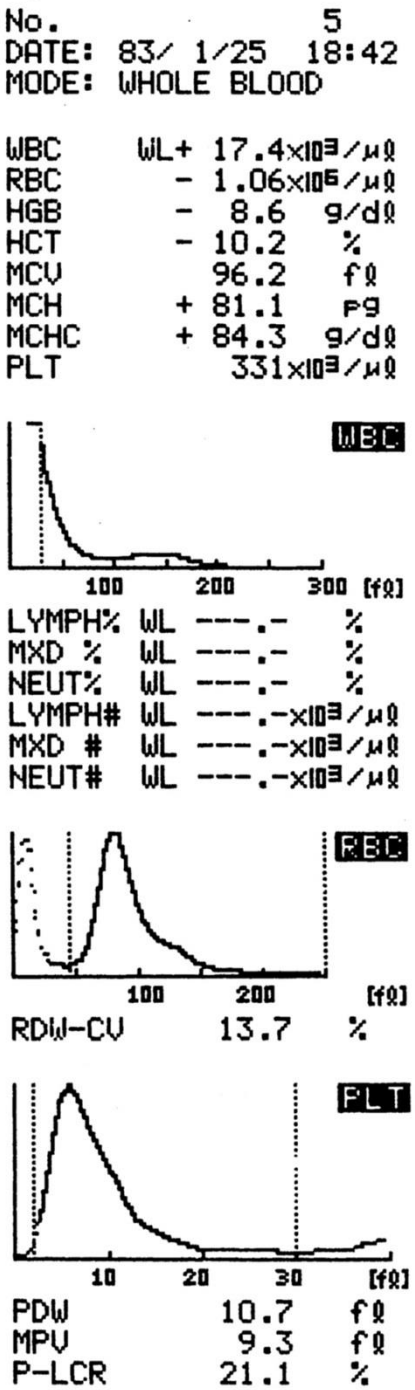


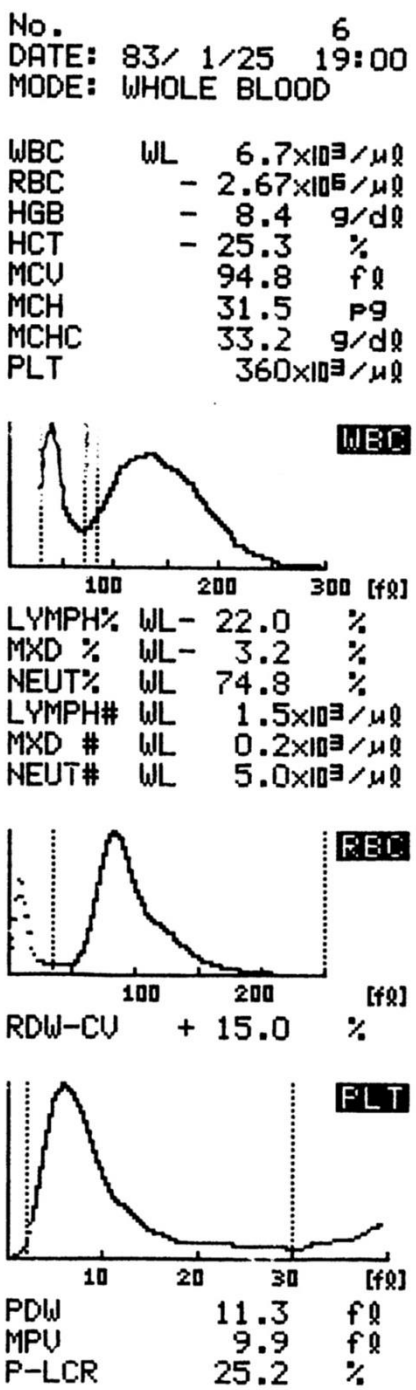




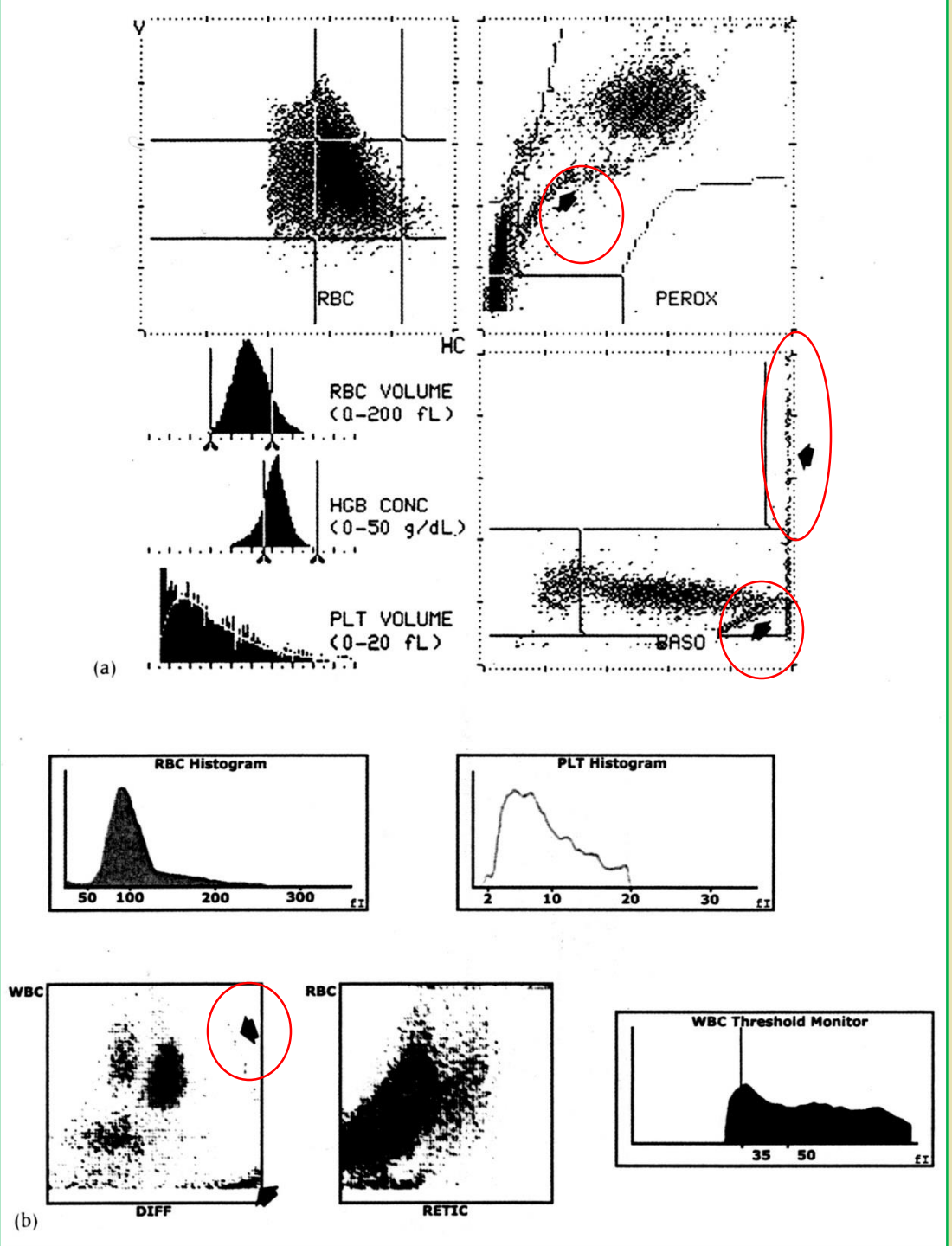
سیتوگرام پروکس در حضور NRBC







- پاسخ‌هاي CBC مربوط به نمونه يك بيمار داراى آگلوتينين‌هاي سرد.
- با مشاهده برگه پاسخ بيمار (پاسخ سمت چپ)، نمونه به مدت ۱۸ دقيقه در ۳۷ درجه سانتي‌گراد انكوبه و مجدداً به آناليزر داده شد (پاسخ سمت راست).
- چنانكه مشاهده مي‌شود به دنبال اين اقدام شمارش لكوسيت‌ها و پارامترهاي ديگر اصلاح مي‌شوند.



افزایش کاذب شمارش WBC ناشی از اثر تداخلی چربی زیر جلدی

- نمونه پاسخ حاصل از آنالیزرهاي تکنیکون H2 (شکل a) و کولتر GEN-S (شکل b)، از نمونه‌اي که بصورت تصادفي با چربي زيرجلدي آلوده شده است.
- سیگنال‌هاي حاصل از چربي با علامت پیکان نشان داده شده‌اند.
- در این حالت شمارش WBC حاصل از H2 اشتباه و در مورد کولتر GEN-S صحیح مي‌باشد.

عوامل ايجاد كنندة لكوپني كاذب

- اين خطا به ندرت رخ مي‌دهد

عوامل ايجاد كنندة لكوپني كاذب

۱ـ مواردي كه شمارش گلبول‌هاي سفيد خارج از آستانه بالايی خطي بودن (Linearity) دستگاه مي‌باشد.

☜ جهت رفع اين مشكل بايد خون را پيش از دادن به دستگاه رقيق نمود.

- WBC	>	$100 \times 10^3/mm^3$
- RBC	>	$8.0 \times 10^6/mm^3$
- PLT	>	$2200 \times 10^3/mm^3$ (HGB $\geq$ 2 g/dL)
- PLT	>	$4000 \times 10^3/mm^3$ (HGB < 2 g/dL)
- HGB	>	26 g/dL
- HCT	>	80%

عوامل ايجاد كنندة لكوپني كاذب

۲ـ مواردي كه ليز لكوسيت‌ها رخ داده :

✓خون مانده: چنانچه خون بيش از سه روز بماند كاهش شديد لكوسيت‌ها و بخصوص گرانولوسيت‌ها را نشان مي‌دهد.

✓لكوسيت‌های شكننده: در مواردی مانند بيماران مبتلا به لوسمي (به ويژه CLL) و كاله‌آزار ☜ لكوسيت‌های شكننده به شكل سلول اسماج درآمده و شمارش نمي‌گردند.

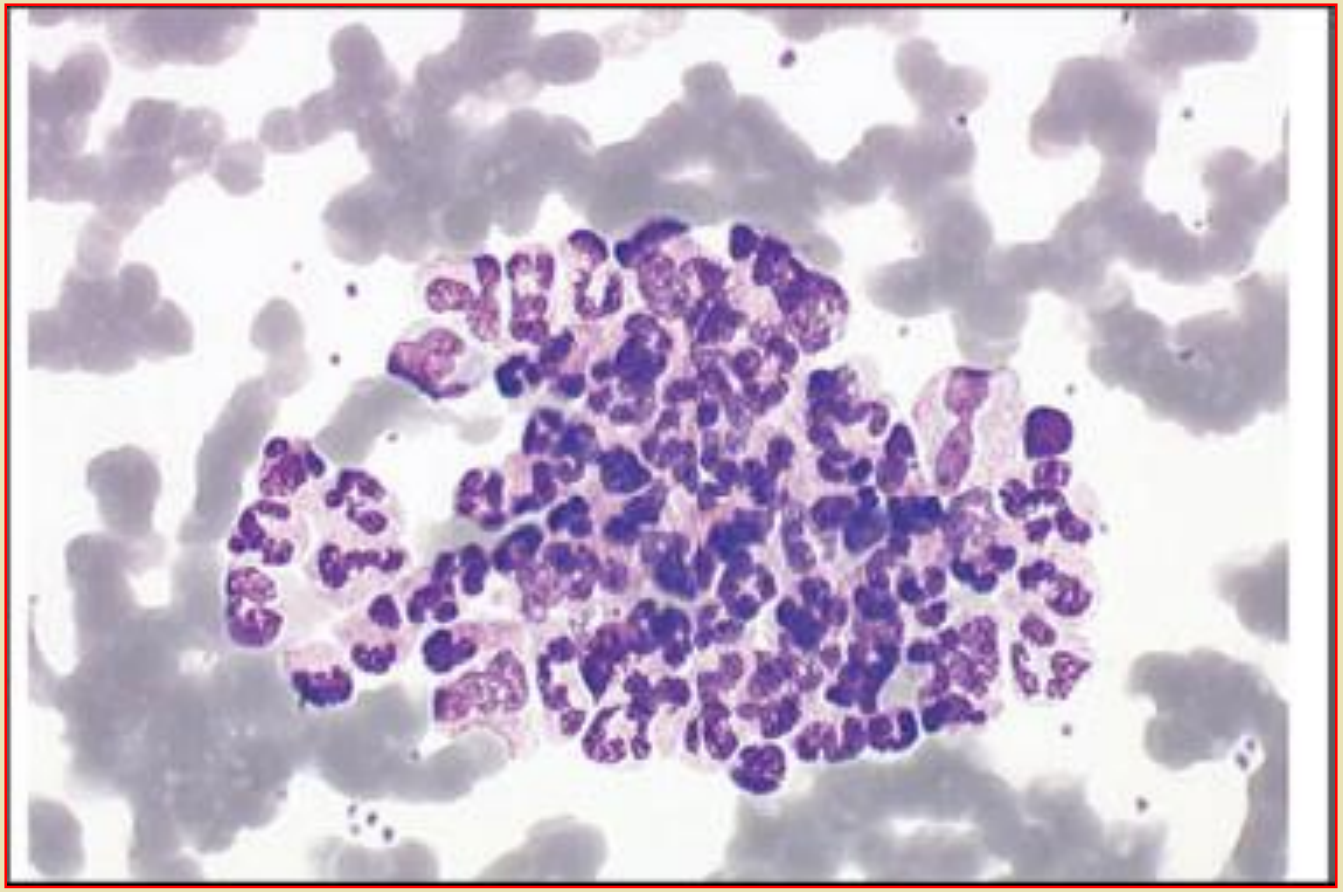
✓در بيماران مبتلا به اورمي و بيماراني كه داروهاي سركوب كننده سيستم ايمني (ايمونوساپرسيو) دريافت مي‌نمايند

☜در چنين شرايطي شمارش لكوسيتي بايد به روش دستي انجام گيرد.

☜ در واقع اورمي هم مي‌تواند افزايش كاذب و هم كاهش كاذب لكوسيت‌ها را سبب گردد.

عوامل ايجاد كنندة لكوپني كاذب

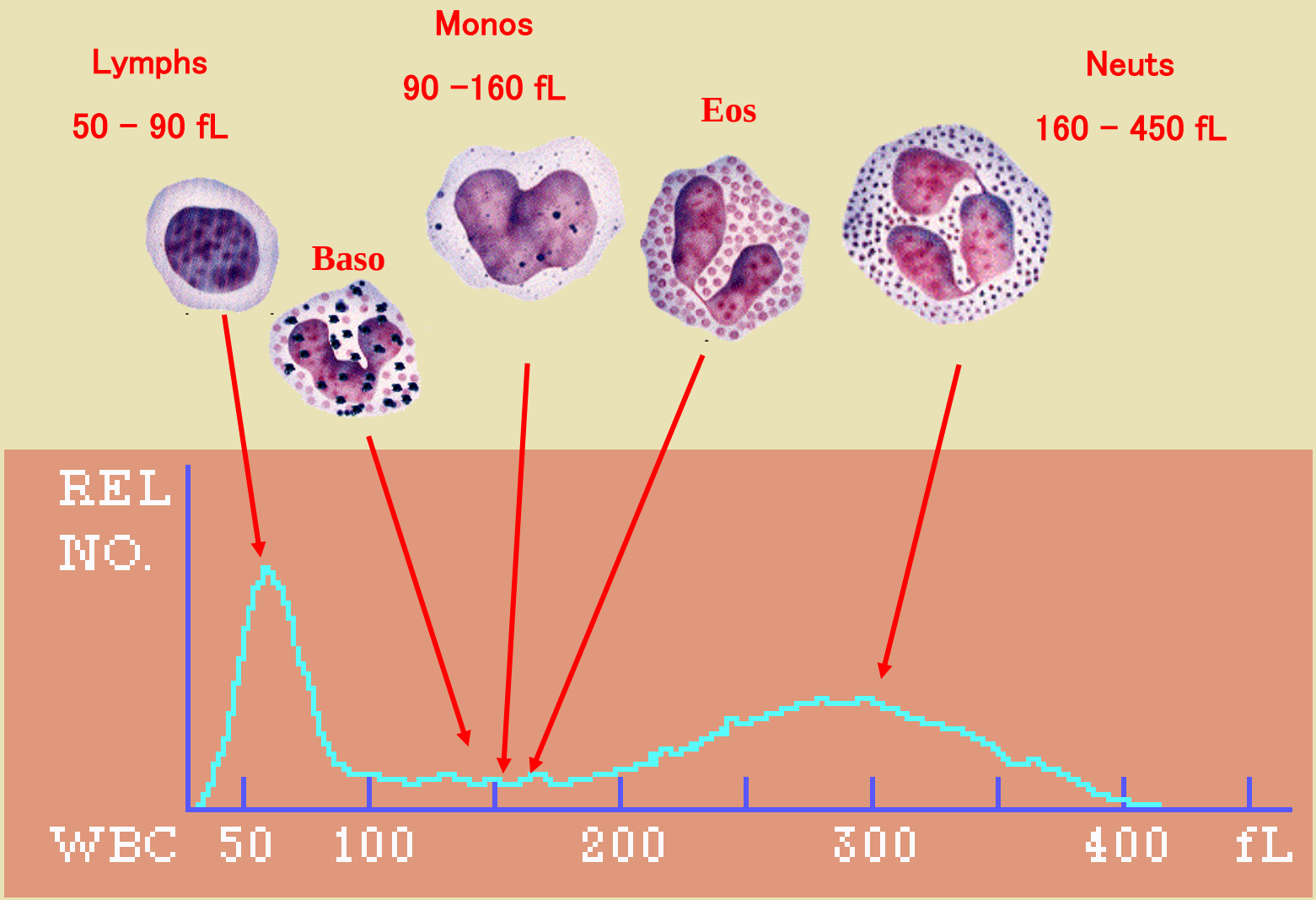
۳- تجمع لكوسيت‌ها ثانويه به اتوآنتي‌بادي، EDTA و يا مواد موكوپلي‌ساكاريدي ترشح شده از برخي تومورها



منابع خطا در شمارش افتراقي اتوماتيک لکوسيت‌ها

منابع خطا در شمارش افتراقي سه‌قسمتي در آناليزرهاي امپدانسي

- عدم تشخيص صحيح موارد افزايش ائوزينوفيل‌ها و بازوفيل‌ها و منوسيت‌ها



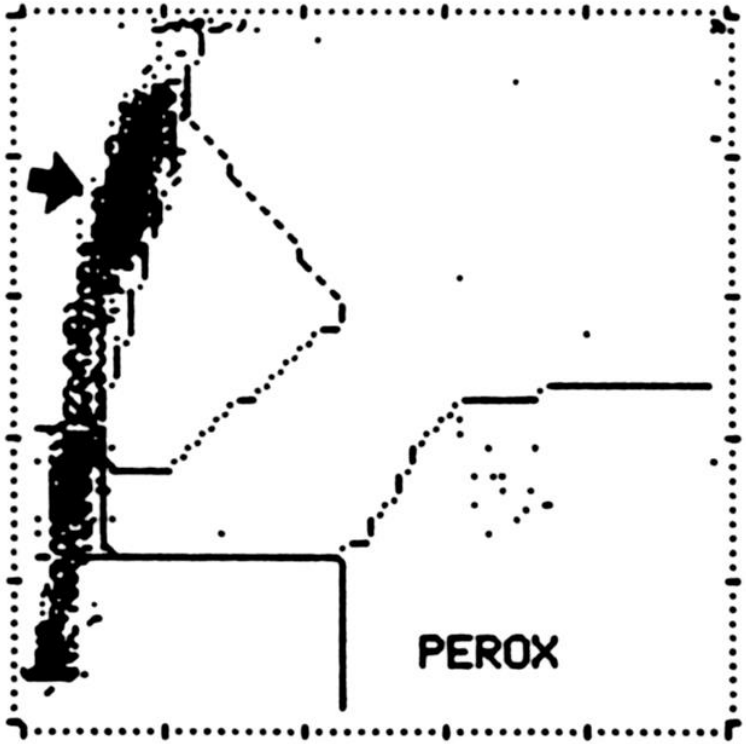
منابع خطا در شمارش افتراقي پنج‌قسمتي لكوسيت‌ها

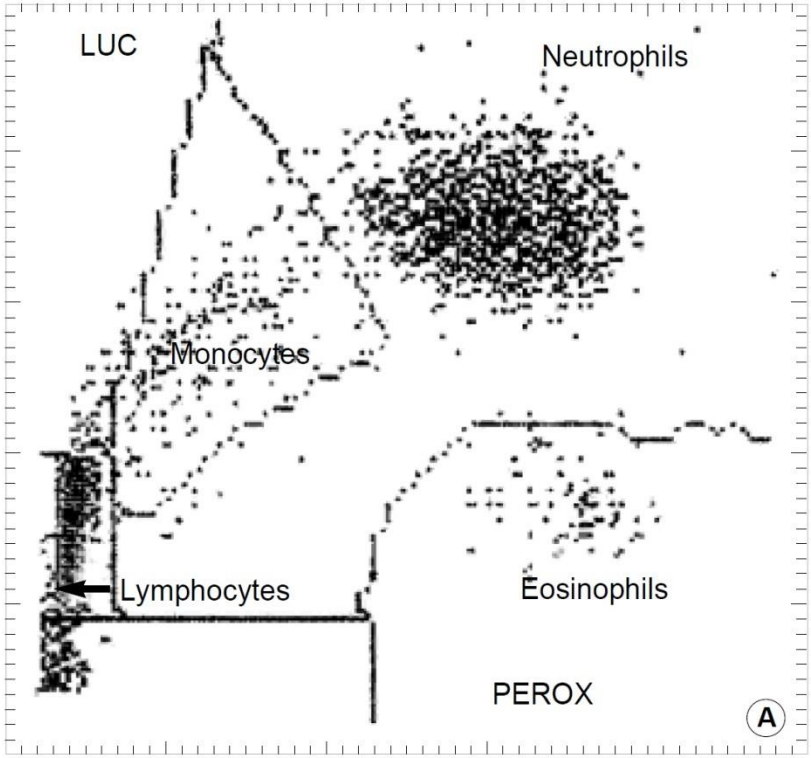
- آناليزرهاي سري تكنيكون H شمارش افتراقي لكوسيت‌ها را علاوه بر پراكنش نور، بر مبناي واكنش سيتوشيميايي پراكسيداز انجام مي‌دهند.
- بنابراين ممكن است به هنگام كمبود ارثي يا اكتسابي پراكسيداز در نوتروفيل‌ها، ائوزينوفيل‌ها يا منوسيت‌ها، شمارش‌هاي نادرستي را ارائه دهند.

منابع خطا در شمارش افتراقي پنج‌قسمتي لكوسيت‌ها

- سيتوگرام پروكس H2 در يك بيمار مبتلا به كاهش شديد پراكسيداز نوتروفيلي كه باعث پاسخ كاذب شمارش نوتروفيل‌ها شده است.
- در واقع اين سلول‌ها به عنوان LUC (سلول بزرگ رنگ نشده) شمارش شده و شمارش نوتروفيلي صفر گزارش شده است .

كانال بازوفيل– لوبولاريتي شمارش نرمال گرانولوسيت‌ها را نشان مي‌دهد.





منابع خطا در شمارش افتراقي پنج‌قسمتي لكوسيت‌ها

- سيتوگرام پروكس H2 حاصل از نمونه يك بيمار مبتلا به كاهش نسبي پراكسيداز ائوزينوفيلي .
- حدود دو سوم ائوزينوفيل‌هاي اين نمونه بعنوان نوتروفيل شمارش شده‌اند.

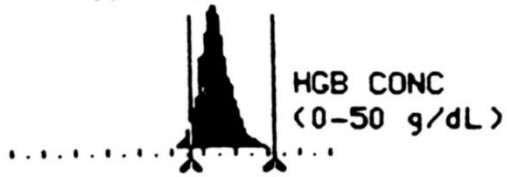
SEQ# 0000410
TIME 12:00 20/07/88
SYS# 901
ID

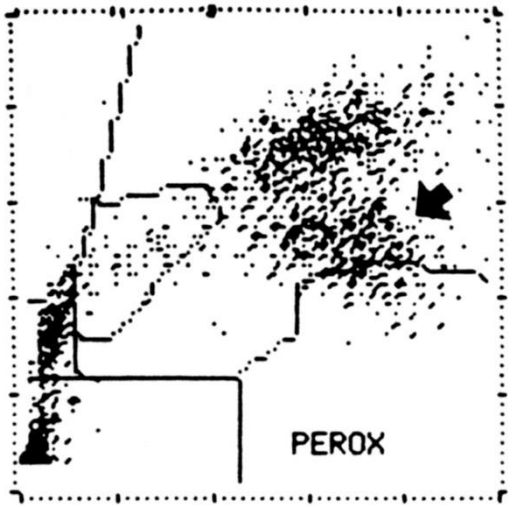
	CBC		
	4.52	x10⁹/L	WBC
L	3.86	x10¹²/L	RBC
	12.8	g/dL	HGB
	.385		HCT
H	99.9	fL	MCV
H	33.1	pg	MCH
	33.2	g/dL	MCHC
	14.2	%	RDW
	2.53	g/dL	HDW
L	114	x10⁹/L	PLT
	8.1	fL	MPV
	56.1	%	PDW
L	.09	%	PCT
RBC FLAGS			0200

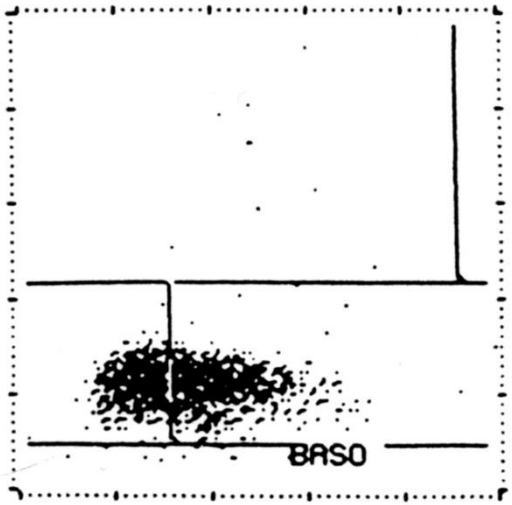
	%	DIFF	10⁹/L
	67.7	NEUT	3.06
L	17.1	LYMP L	.77
	4.6	MONO	.21
	6.8	EOS	.31
	.8	BASO	.04
	3.0	LUC	.14
	LI	L	1.21*
	MPXI		-3.5
WBC FLAGS			4000

MORPHOLOGY FLAGS

PARAMETER	SUSP	VERIFY
ANISO		
MICRO		
MACRO	++	
VAR		
HYPO		
HYPER		
L SHIFT	+	
ATYP		
BLASTS		
OTHER		
OTHER	IG	

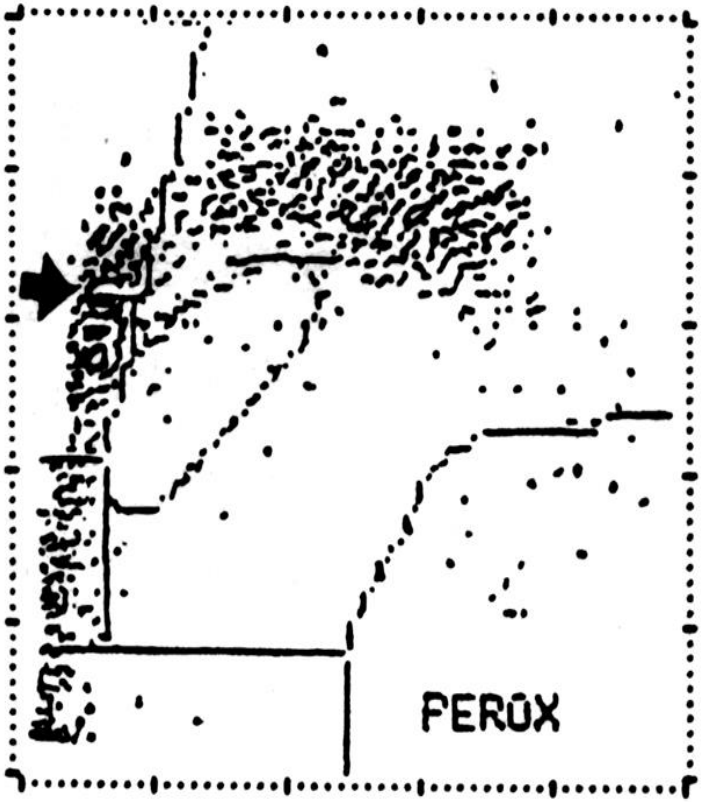


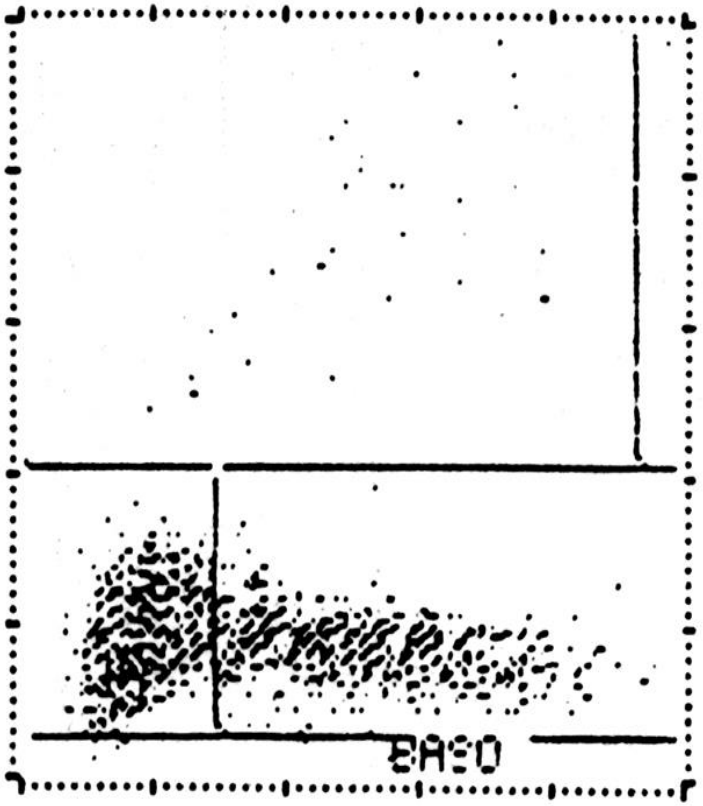




منابع خطا در شمارش افتراقي پنج‌قسمتي لكوسيت‌ها

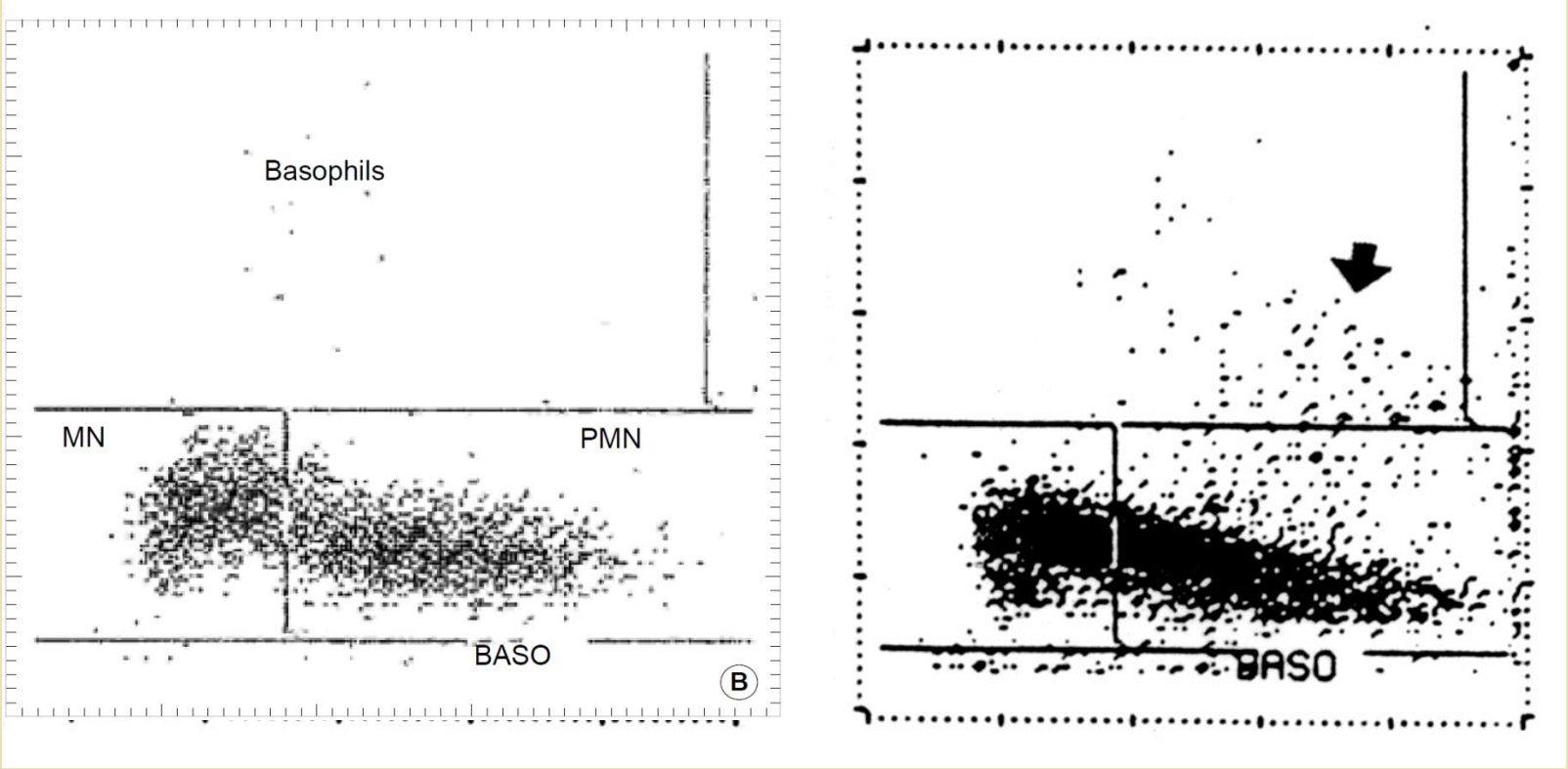
- سيتوگرام پروكس H2 حاصل از نمونه يك بيمار مبتلا به كاهش پراكسيداز منوسيتي.
- در اين مورد تقريباً تمامي منوسيت‌ها بعنوان LUC شمارش شده‌اند.





منابع خطا در شمارش افتراقي پنج‌قسمتي لكوسيت‌ها

- اسكاترگرام لكوسيتي تكنيكون H2 حاصل از نمونه يك بيمار مبتلا به لنفوم فوليكولار .
- در اين حالت بدليل آنكه سلول‌هاي لنفوم به غلط بازوفيل انگاشته مي‌شوند با يك بازوفيلي كاذب مواجه هستيم.



منابع خطا در
شمارش اتوماتيك اريتروسيت‌ها

افزايش كاذب در شمارش اريتروسيت‌ها

- حضور پلاكت‌هاي درشت به ميزان فراوان (مانند موارد MPD)
- لكوسيتوز
- كرايو گلوبولين وكرايوفيبرينوژن
- هيپرليپيمي در پاره‌اي موارد

✓ لكوسيتوز؛ علاوه بر افزايش كاذب RBC، ميزان Hb، HCT و MCV را نيز بطور كاذب افزايش مي‌دهد.

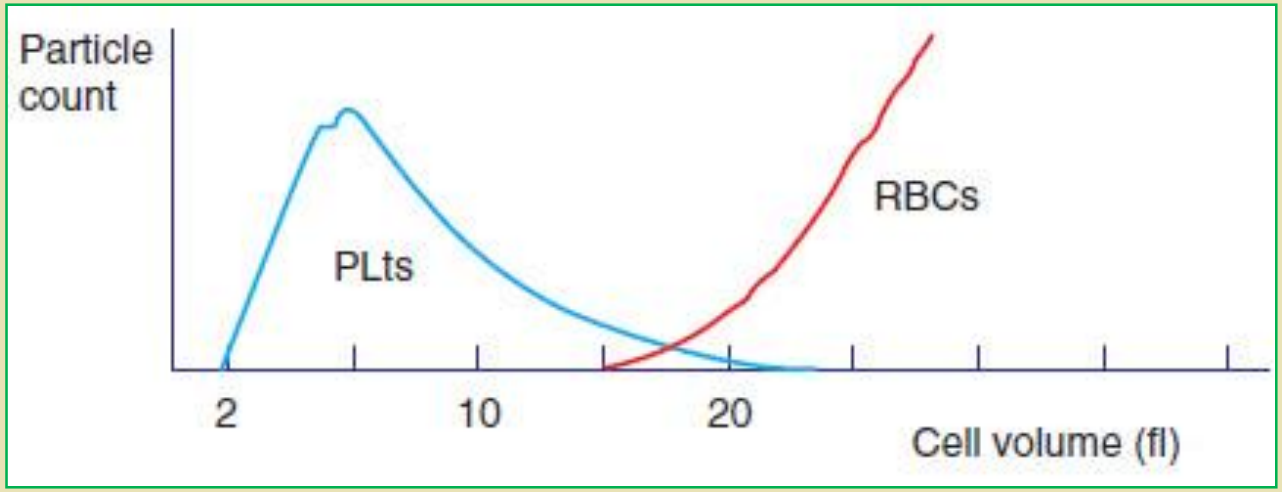
✓ تعداد اريتروسيت‌ها درخون خيلي بيشتر از لكوسيت‌ها و پلاكت‌هاست؛ لذا شمارش بسيار بالايي از WBC يا پلاكت‌هاي درشت لازم است تا باعث افزايش چشمگير شمارش RBC گردند.

✓ كرايوگلوبولين و هيپرليپيمي گاهي در خون به شكل ذرات درشتي درآمده و به عنوان سلول خوني شمارش مي‌گردند.

کاهش کاذب در شمارش اریتروسیت‌ها

میکروسیتوز شدید (MCV< 50 fl)

- در پیرو پوئي‌کیلوسیتوز
- گاهي در بیماري هموگلوبین H



کاهش کاذب در شمارش اريتروسيت‌ها

۲- تجمع اريتروسيت‌ها ثانويه به آگلوتينين‌هاي سرد، گرم و يا EDTA (پان‌آگلوتينين).

۳- همولیز شدید در محیط آزمایشگاه (In vitro) ⇦اگرچه نادر است ولي مي‌تواند باعث کاهش کاذب شمارش RBC و HCT گردد.

منابع خطا در اندازه‌گيري ميزان هموگلوبين

عوامل دخيل در افزايش كاذب هموگلوبين

☜تشخيص افزايش كاذب غلظت هموگلوبين ممكن است مشكل باشد چون غالباً در اين حالت هيستوگرام‌ها و انديس‌هاي اريتروستي طبيعي به نظر مي‌رسند.

- حضور كربوكسي هموگلوبين
- حضور كرايوگلبولين- كرايوفيبرينوژن
- لكوسيتوز
- هيپرليپيدمي
- هيپربيلي‌روبينمي
- هيپرپروتئينمي
- عدم ليز اريتروسيت‌ها

عوامل دخيل در افزايش كاذب هموگلوبين

۱- عوامل كدر كننده محلول درابكين:

☜بيشترين اختلالات كاذب هموگلوبين از تغيير در كدورت ناشي مي‌شوند.

- عواملي كه باعث كدورت محلول درابكين مي‌شوند عبارتند از:

- لكوسيتوز (به ويژه بيش از ۵۰هزار)
- هيپرليپيدمي
- هيپرپروتئينمي
- عدم ليز اريتروسيت‌ها

☜در موارد فوق بهتر است از روش دستي جهت اندازه‌گيري هموگلوبين استفاده شود.

افزايش كاذب هموگلوبين ناشی از هيپرليپيدمي

هيپرليپيدمی شايع‌ترين عامل كدورت پلاسما است.

- هنگامي كه در گسترة خون محيطي، حاشيه RBCها محو بوده و به صورت مات (Blurred margin) باشد بايستي هيپرليپيدمي نمونه مد نظر قرار گيرد.
- پلاسماي كدر در بيماران مبتلا به هيپرشيلوميكرونمي چه به صورت درونزا و چه بصورت برونزا (به دنبال تزريق داخل وريدي حاوي ليپيد)، غلظت هموگلوبين بطور كاذب افزايش مي‌دهد.
- در واقع بدليل آنكه ليپيد در محلول درابكين حل نمي‌شود باعث افزايش كاذب هموگلوبين مي‌شود.
- از اين رو توصيه مي‌شود كه آزمون CBC در صبح ناشتا انجام شود.

- بطور كلي براي رفع كدورت ناشي از هيپرليپيدمي مي‌توان پلاسماي شيري رنگ را برداشت و هم حجم آنرا سرم فيزيولوژي اضافه نمود و بعد آزمون را انجام داد.
- راه‌حل ديگر آن است كه نخست هماتوكريت بيمار را به روش دستي (ميكروهماتوكريت) بدست آورد و سپس با استفاده از رابطة زير ميزان واقعي هموگلوبين را محاسبه نمود:

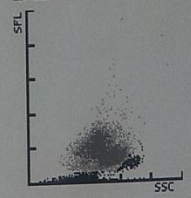
[(1-HCT) Hb پلاسماي شيري رنگ] - مقدار Hb اوليه = مقدار واقعي هموگلوبين

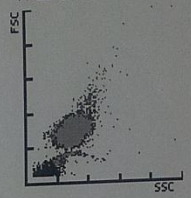
Sample No.: 126
Patient ID:
Name:
Comments:

Rack:
Ward:

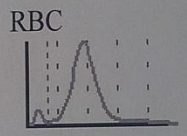
Tube: 0 2009/03/10 12:01:58
Dr.:
Birth: Sex:
Inst.ID:XT-1800i-1

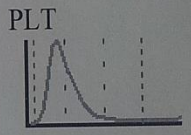
Positive
Morph. Count





WBC	20.63 *	[10^3/uL]			
RBC	3.03 *	[10^6/uL]			
HGB	13.9 *	[g/dL]			
HCT	28.0 *	[%]			
MCV	92.4 *	[fL]			
MCH	45.9 *	[pg]			
MCHC	49.6 *	[g/dL]			
PLT	1151 *	[10^3/uL]			
RDW-SD	62.5 +	[fL]			
RDW-CV	19.9 +	[%]			
PDW	10.3 *	[fL]			
MPV	9.6 *	[fL]			
P-LCR	21.3 *	[%]			
PCT	1.10 *	[%]			
NEUT	----	[10^3/uL]	----	[%]	
LYMPH	----	[10^3/uL]	----	[%]	
MONO	----	[10^3/uL]	----	[%]	
EO	0.45 *	[10^3/uL]	2.2 *	[%]	
BASO	0.15 *	[10^3/uL]	0.7 *	[%]	





WBC IP Message(s)
WBC Abn Scattergram
Leukocytosis

Immature Gran?
Abn Lympho/Blasts?
NRBC?

RBC IP Message(s)

RBC Agglutination?
Turbidity/HGB Interf?

PLT IP Message(s)
Thrombocytosis

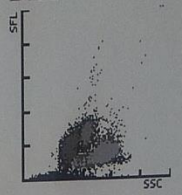
PLT Clumps?

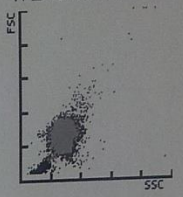
Sample No.: 125
Patient ID:
Name:
Comments:

Rack:
Ward:

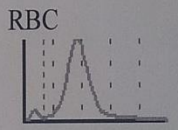
Tube: 0 2009/03/10 11:58:20
Dr.:
Birth: Sex:
Inst.ID:XT-1800i-1

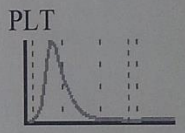
Positive
Diff. Morph.
Count





WBC	23.57 *	[10^3/uL]			
RBC	2.92	[10^6/uL]			
HGB	9.5	[g/dL]			
HCT	26.8	[%]			
MCV	91.8	[fL]			
MCH	32.5	[pg]			
MCHC	35.4	[g/dL]			
PLT	1015 *	[10^3/uL]			
RDW-SD	62.3 +	[fL]			
RDW-CV	19.8 +	[%]			
PDW	8.8 *	[fL]			
MPV	8.8 *	[fL]			
P-LCR	15.6 *	[%]			
PCT	0.89 *	[%]			
NEUT	14.96 *	[10^3/uL]	63.4 *	[%]	
LYMPH	5.45 *	[10^3/uL]	23.1 *	[%]	
MONO	2.92 *	[10^3/uL]	12.4 *	[%]	
EO	0.18 *	[10^3/uL]	0.8 *	[%]	
BASO	0.06 *	[10^3/uL]	0.3 *	[%]	





WBC IP Message(s)
Neutrophilia
Lymphocytosis
Monocytosis
Leukocytosis

Immature Gran?
Abn Lympho/Blasts?
NRBC?

RBC IP Message(s)
Anemia

PLT IP Message(s)
Thrombocytosis

PLT Clumps?

افزايش كاذب هموگلوبين

- لكوسيتوز

- ميزان افزايش كاذب هموگلوبين توسط WBCها در دستگاه‌هاي مختلف بسيار متفاوت بوده و به قدرت معرف ليزكننده‌اي كه دركانال WBC/Hb بكار گرفته شده، بستگي دارد.

- هيپرپروتئينمی

- پاراپروتئين‌ها مثلاً در گاماپاتي‌هاي منوكلونال (نظيرمولتيپل مايلوما و ماكروگلوبولينمي والدنشتروم) يا گاماپاتي‌هاي پلي‌كلونال (نظير عفونت‌ها و التهابات) با مواد ليزكننده در برخي دستگاه‌ها واكنش مي‌دهند و باعث كدورت محلول سنجش Hb می‌گردند.

☜به هنگام حضور هيپرپروتئينمي مي‌توان با افزودن يك قطره آمونيوم ۲۵% يا كربنات پتاسيم، محلول را صاف كرده و بعد جذب نوري تست را قرائت نمود.

- افزايش كدورت همچنين مي‌تواند به علت **عدم ليز گلبول‌هاي قرمز** ثانويه به هموگلوبينوپاتي‌ها و يا تارگت سل‌ها باشد.

افزايش كاذب هموگلوبين

- كربوكسي‌هموگلوبين

- بدليل اينكه سرعت تبديل كربوكسي‌هموگلوبين به سيان مت‌هموگلوبين كم است ونيز جذب نوري كربوكسي‌هموگلوبين در طول موج nm ٥٤٠ بيشتر از سيان مت‌هموگلوبين است (حدود ٣٠%)، لذا در حضور ميزان زياد كربوكسي هموگلوبين غلظت هموگلوبين خون به طور كاذب افزايش مي‌يابد.
- در برخي از افراد سيگاري ميزان كربوكسي هموگلوبين ممكن است به ٢٠ درصد برسد كه باعث افزايش كاذب هموگلوبين به ميزان ٦ درصد مي‌گردد.

- هيپربيلي‌روبينمي

- هيپربيلي‌روبينمي در طول موج جذبي سيان مت‌هموگلوبين (nm ٥٤٠) به ندرت ممكن است ايجاد اشكال كند.

كاهش كاذب ميزان هموگلوبين

☜كاهش كاذب غلظت هموگلوبين شيوع نسبتاً كمتري دارد.

كاهش كاذب ميزان هموگلوبين

- افزايش سولف‌هموگلوبين كه به سيان مت‌هموگلوبين تبديل نمي‌شود باعث كاهش كاذب غلظت هموگلوبين مي‌گردد.

☜اين حالت به دنبال درمان با سولفوناميدها، فناستين، استانيليد و ساير آمين‌هاي آروماتيك گزارش شده است.

- اگرچه در تئوري مقدار قابل ملاحظه سولف‌هموگلوبين باعث كاهش غلظت هموگلوبين مي‌شود ولي مقادير باليني آن به ندرت به بيش از ۱۰ درصد مي‌رسد.

منابع خطا در اندازه‌گيري MCV

افزایش کاذب MCV

- لکوسیتوز
- میکروسیتوز شدید
- ماندن خون در حرارت اتاق
- آگلوتینین‌هاي سرد
- پدیده تورم حاد
- رسوب پروتئین در اطراف روزنه
- کاهش قابلیت ارتجاعي اریتروسیت‌ها

افزايش كاذب MCV

- هيپرلكوسيتوز

- در مواردیکه شمارش لكوسيت‌ها متجاوز از ۵۰هزار در ميكروليتر مي‌گردد (مثلاً در لوسمي‌ها)؛ علاوه برخطا در شمارش RBC، ميزان MCV نيز بطور كاذب افزايش مي‌يابد.

☜حجم لكوسيت‌ها خيلي بيشتر از اريتروسيت‌ها است

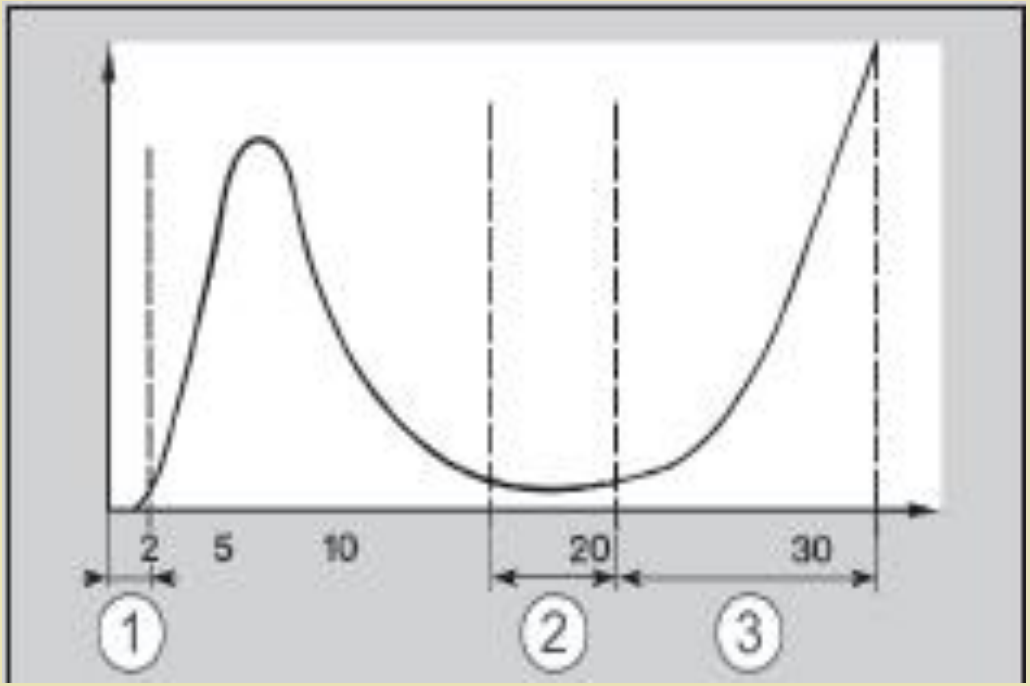
☜جهت اندازه‌گيري MCV، نمونة خون تنها در معرف ايزوتون رقيق مي‌شود بنابراين علاوه بر RBCها، گلبول‌هاي سفيد نيز حضور دارند.

☜ در حالت طبيعي چون تعداد لكوسيت‌ها نسبت به اريتروسيت‌ها كم است (يك لكوسيت در مقابل ۵۰۰ تا ۷۰۰ اريتروسيت) خطاي MCV قابل چشم‌پوشي است.

☜ جهت حذف تداخل WBCها مي‌توان بافي‌كوت خون را برداشته و حجم آنرا با سرم فيزيولوژي جايگزين نمود و اندازه‌گيري را تكرار كرد.

افزايش كاذب MCV

- در حضور **ميكروسيتوز شديد**، اريتروسيت‌هاي ميكروسيتيك كه از حد آستانة پايين شمارش RBCها (٣٦ fl) كوچكتر باشند به عنوان گلبول قرمز در نظر گرفته نمي‌شوند كه همين امر باعث افزايش كاذب MCV مي‌شود.
- در حالاتي كه **اريتروسيت‌هاي شكسته** شده به وفور يافت مي‌شوند (مانند سندرم‌هاي قطعه‌قطعه شدن اريتروسيت‌ها)



افزایش کاذب MCV

- ماندن خون در حرارت اتاق باعث تورم سلول‌ها شده و بدین ترتیب در سنجش MCV و HCT ایجاد خطا مي‌کند.

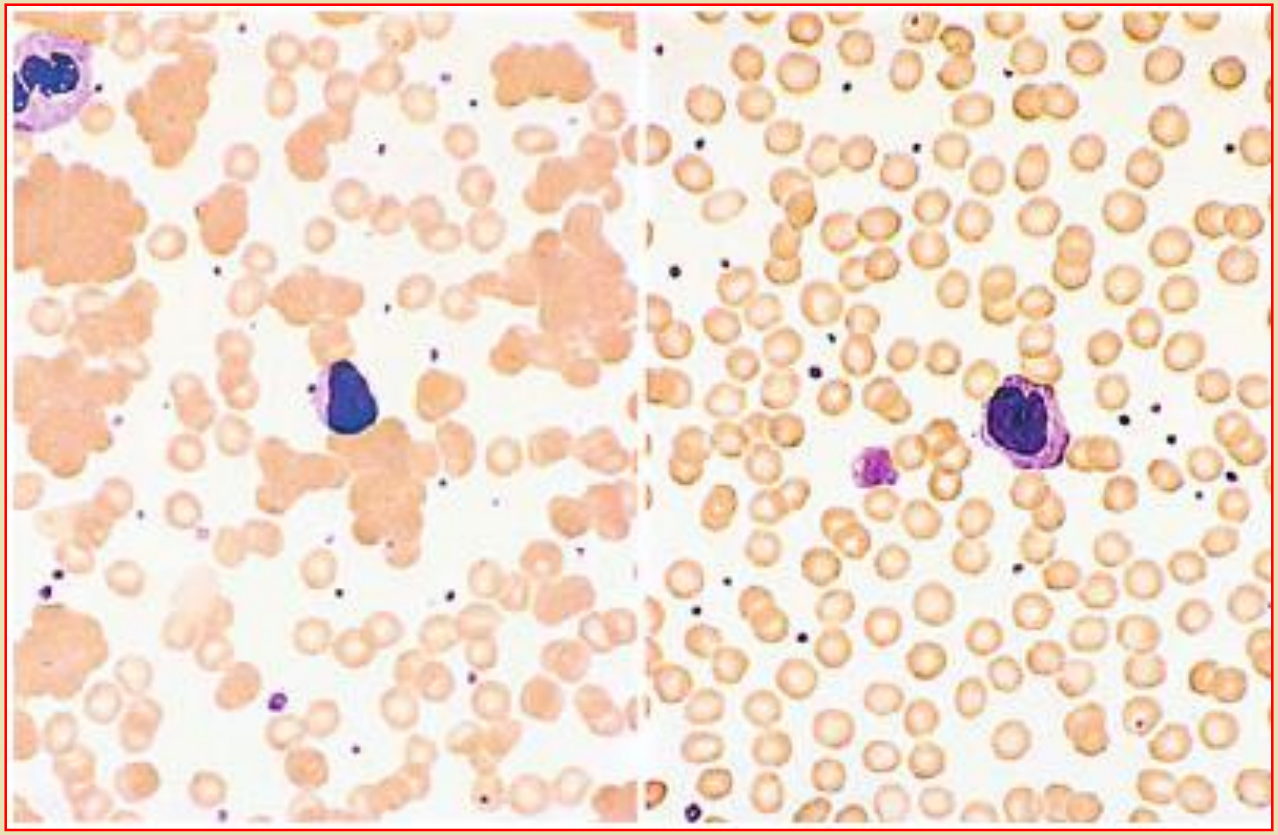
- تغییرات MCV نمونه‌هاي خوني که در دماي یخچال نگهداري مي‌شوند، در مدت ٤٨ ساعت کمتر از ٣ فمتولیتر مي‌باشد که این از نظر بالیني بي‌اهمیت است.
- انجام آزمون CBC در نمونة حاوي ضد انعقاد EDTA که در یخچال نگهداري شود، به مدت ٢٤ ساعت قابل اعتماد مي‌باشد.
- نگهداري خون به مدت ٢٤ ساعت در دماي اتاق مي‌تواند حدوداً تا ٦ فمتولیتر و به مدت ٤٨ ساعت در دماي اتاق مي‌تواند حدوداً ٩-٨ فمتولیتر MCV را افزایش دهد.

☜از آنجا که در اکثر سیستم‌ها میزان هماتوکریت از حاصل ضرب MCV در شمارش RBC بدست مي‌آید در این حالت هماتوکریت نیز بطور کاذب بالا رفته و در نتیجه میزان MCHC بطور کاذب کاهش مي‌یابد.

☜کاهش MCHC بدون حضور هیپوکرومیا درگسترة خون محیطي ممکن است دال بر ماندن خون در محیط آزمایشگاه باشد.

افزايش كاذب MCV

- آگلوتينين‌هاي سرد باعث به هم چسبيدن چندتايي گلبول‌هاي قرمز مي‌شوند. در نتيجه:
  - شمارش RBC و هماتوكريت به صورت كاذب كاهش مي‌يابند.
  - MCV، MCH و MCHC افزايش مي‌يابند.
  - ☜ غالباً ميزان MCV افزايش يافته و MCHC بيش از g/dL ٤٠ مي‌باشد.
  - ☜ ميزان هموگلوبين تحت تأثير نمي‌گيرد در نتيجه در اين حالت نسبت هموگلوبين به تعداد اريتروسيت‌ها داراي تناقضي آشكار است.



افزايش كاذب MCV

- پديده تورم حاد (Acute Swelling)

- چنانچه سلول‌هاي خوني در يك محيط هيپراسمولار قرار گيرند سيتوپلاسم آنها نيز هيپراسمولار مي‌شود. اين سلول‌ها در مجاورت ايزوتون آب را جذب كرده و متورم مي‌شوند ⇦ MCV بطور كاذب افزايش مي‌يابد.

☜ پديده تورم حاد در مواردي نظير هيپرناترميك (ناشي از دهيدراتاسيون شديد)، اورمي شديد، هيپرگليسمي كنترل نشده (گلوكز بيش از mg/dl ۵۰۰) و يا به دنبال تزريق وريدي سرم قندي رخ مي‌دهد.

☜ از آنجا كه آناليزرها سرعت زياد و سيكل زماني كوتاهي دارند اجازة بازگشت اريتروسيت‌ها به حالت طبيعي را نمي‌دهند.

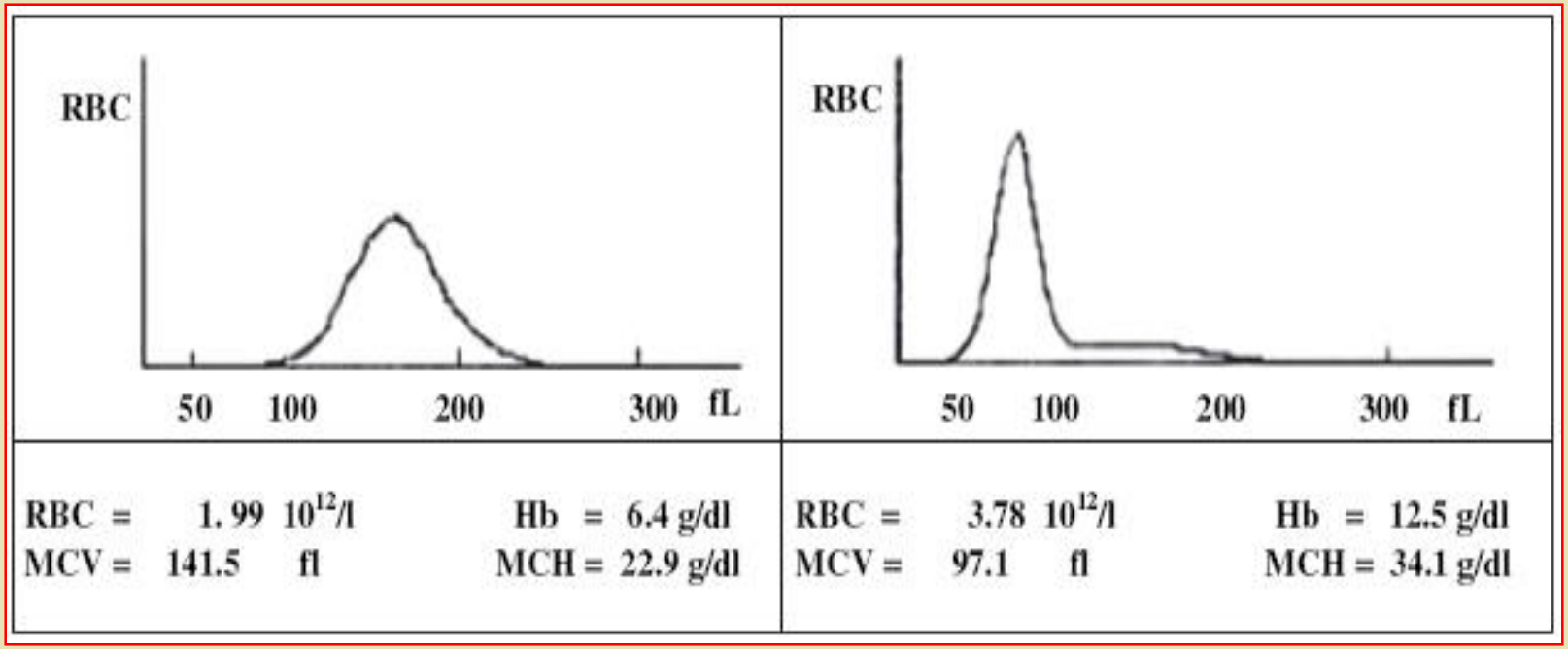
براي رفع اين اشكال:

☜مي‌توان خون را از قبل با محلول ايزوتون رقيق نموده و پس از ۵ دقيقه آنرا به دستگاه داد. دربسياري از دستگاه‌هاي اتوماتيك با استفاده از مد از پيش رقيق‌سازي (Pre-dilute) مي‌توان جهت حل اين مشكل اقدام نمود.

☜ راه ديگر آن است كه ميزان هماتوكريت نمونه را به روش دستي اندازه گرفت و با استفاده از شمارش RBC حاصل از دستگاه، ميزان MCV را محاسبه نمود.

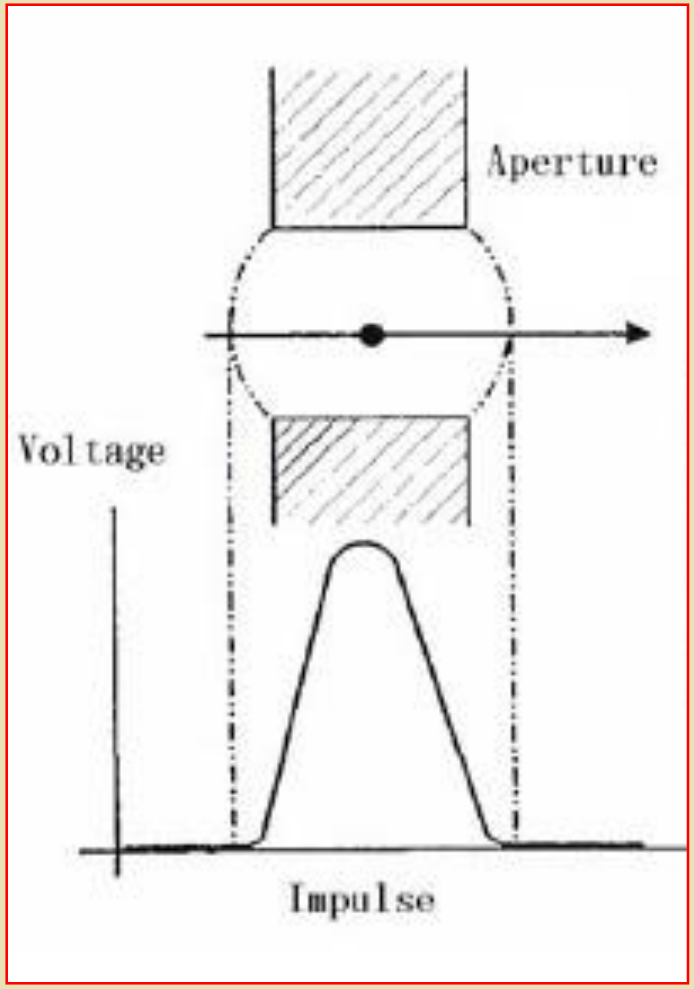
پدیده تورم حاد (Acute Swelling)

نمونه گیری از ناحیه نزدیک به محل تزریق وریدی گلوکز. این پدیده نه تنها باعث کاهش Hb بدلیل رقیق شدن شده است بلکه میزان MCV بطور کاذب افزایش پیدا کرده و میزان MCHC بطور چشمگیری کاهش پیدا کرده است (شکل سمت چپ).
مقادیر واقعی پارامترهای مذکور که در روز دیگری و در عدم همزمانی با تزریق محلول قندی سنجش شده‌اند در شکل سمت راست ارائه شده است.



افزايش كاذب MCV

- رسوب تدريجي پروتئين در روزنه (Aperture) آناليزرهاي امپدانسي باعث كوچك شدن قطر روزنه و كاهش سرعت جريان سوسپانسيون سلولي به داخل آن مي‌شود.



در اين حالت MCV بطور كاذب افزايش و شمارش سلولي بطور كاذب كاهش مي‌يابد.

کاهش کاذب MCV

- هيپواسمولاريتي پلاسما
- هيپوكروم بودن اريتروسيت‌ها
- حضور كرايوگلبولين و كرايوفيبرينوژن
- پلاكت‌هاي غول‌آسا
- عدم رعايت نسبت خون به ضد انعقاد

كاهش كاذب MCV

- در هيپواسمولاريتي پلاسما، عكس پديده تورم حاد رخ مي‌دهد.

☜ اين حالت در شرايطي مانند الكلسيم مزمن، هيپوناترمي و ترشح نامتناسب هورمون آنتي‌ديورتيك (ADH) رخ مي‌دهد.

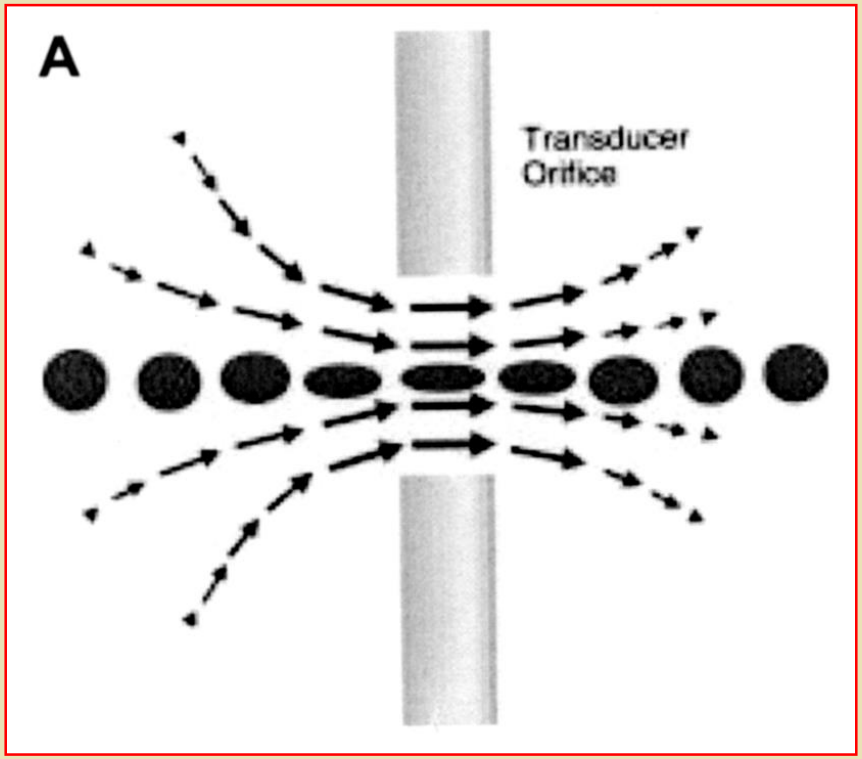
- كاهش كاذب MCV ناشي از حالت هيپواسمولاريتي پلاسما نه تنها باعث ميكروسيتوز كاذب مي‌شود بلكه مي‌تواند يك ماكروسيتوز واقعي را مخفي نمايد.

☜ براي رفع اين حالت نيز بايد مثل حالت هيپراسمولاريتي رفتار نمود (استفاده از مد پره ديلوت).

كاهش كاذب MCV

- اريتروسيت‌هاي فوق‌العاده هيپوكروم مانند مورفولوژي آنولوسيت يا لپتوسيت و يا RBCهايي كه ميزان MCHC آنها پايين است به هنگام عبور از روزنه بسيار كشيده مي‌شوند. از اينرو MCV آنها كمتر از ميزان واقعي برآورد مي‌شود.

- در حقيقت در دستگاه‌هاي سري H1 جهت كاهش تغيير شكل و در نتيجه تغيير MCV ناشي از آن، گلبول‌هاي قرمز در حجم خود (ايزوولومتريك) كروي شده و سپس مورد حجم سنجي قرار مي‌گيرند. بدين ترتيب خطاي مذكور كاهش مي‌يابد.



کاهش کاذب MCV

- به هنگام حضور كرايوفيبرينوژن و كرايوگلبولين‌ها، درصورتي كه به اندازة كافي بزرگ بوده (به اندازة يك RBC) و در كانال شمارش RBC، شمارش گردند ميزان MCV بطور كاذب كاهش مي‌يابد.

- چنانچه پلاكت‌هاي درشت و غول‌آسا نيز به ميزان قابل توجهي در خون حضور داشته باشند به عنوان اريتروسيت شمارش شده و در نتيجه باعث كاهش كاذب MCV مي‌شوند.

- چنانچه نسبت ضدانعقاد EDTA به خون بيش از حد لازم باشد باعث چروكيدگي سلول‌ها و كاهش MCV مي‌گردد.

☜ اين حالت همچنين بيشترين خطا را در اندازه گيري هماتوكريت به روش دستي تشكيل مي‌دهد.

تاثیر غلظت بالای EDTA بر پارامترهای هماتولوژیک

- کاهش کاذب MCV
- کاهش کاذب هماتوکریت
- کاهش کاذب تعداد لکوسیتها
- افزایش کاذب تعداد پلاکتها

افزایش و کاهش کاذب MCH

$$\text{MCH (pg)} = \frac{\text{HGB (g/dL)}}{\text{RBC } (\times 10^6/\mu\text{L})} \times 10$$

افزايش و كاهش كاذب MCHC

$$MCHC\ (g/dL) = \frac{HGB\ (g/dL)}{HCT\ (\%)} \times 100$$

- افزايش واقعي MCHC بسيار نادر بوده و تنها در موارد اسفروسيتوز رخ مي‌دهد. بنابراين هرگونه افزايش غيرطبيعي MCHC را بايستي معيار خوبي جهت مطرح نمودن احتمال خطا در نظر گرفت.

نوع خطا	علت خطا
افزايش كاذب شمارش RBC	✔ لكوسيتوز شديد ✔ حضور پلاكت‌هاي درشت به تعداد فراوان ✔ هيپرليپيدمي (هميشگي نيست) ✔ كرايوگلبولينمي و كرايوفيبرينوژنمي
كاهش كاذب شمارش RBC	✔ آگلوتينين هاي سرد ✔ پان‌آگلوتيناسيون وابسته به EDTA ✔ همولیز اريتروسيت‌ها در محيط خارج از بدن به علت شرايط نامناسب نمونه‌گيري يا نگهداري و يا به علت حضور گلبول‌هاي قرمز بسيار غيرطبيعي ✔ ميكروسيتوز شديد و يا قطعه‌قطعه شدن اريتروسيت‌ها بطوريكه پايين‌تر از آستانة تشخيصي اريتروسيتي قرار گيرند
افزايش كاذب MCV	✔ نگهداري خون در دماي اتاق ✔ آگلوتينين‌هاي سرد و آگلوتينين وابسته بهEDTA ✔ لكوسيتوز شديد ✔ موارد هيپراسمولار ✔ نسبت اضافي K2EDTA
كاهش كاذب MCV	✔ اريتروسيت‌هاي هيپوكروم ✔ افزايش دماي محيط ✔ حالت‌هاي هيپواسمولار ✔ مخلوط كردن مكرر نمونه كه منجر به افزايش اكسيژناسيون سلول‌ها مي‌شود
افزايش كاذب HCT	✔ عواملي كه باعث افزايش كاذب MCV مي‌شوند (به استثناي مورد آگلوتينين‌هاي سرد) ✔ افزايش كاذب شمارش RBCها
كاهش كاذب HCT	✔ عواملي كه باعث كاهش كاذب MCV مي‌شوند ✔ كاهش كاذب شمارش RBC ناشي از ميكروسيتوز شديد و يا تخريب گلبول‌هاي قرمز در محيط خارج از بدن ✔ آگلوتينين‌هاي سرد ✔ مخلوط كردن مكرر نمونه كه منجر به افزايش اكسيژناسيون سلول‌ها مي‌شود

پايش عملكرد آناليزرها با استفاده از نمونه‌ها و نتايج بيماران

- روش‌هاي مبتنی بر استفاده از كنترل‌هاي سلولي، علي‌رغم مزاياي متعدد، داراي معايبی نيز مي‌باشند كه اين امر استفادة منحصر از آنها را محدود مي‌سازد. از جمله:
- هزينة بالا، ناپايداری كنترلها ، و ... .

- كنترل كيفي با استفاده از نمونه‌ها و نتايج بيماران، براساس پاسخ‌هاي مربوط به تك تك آنها و يا چندين بيمار به اجرا درمي‌آيد.
- مزاياي اين روش عبارتند از هزينه پايين و مقرون به صرفه بودن و توانايي كشف مشكلات مرتبط با نمونه‌ها.

- به دو شكل كلی می‌توان از نمونه‌ها و نتايج بيماران در ارزيابي عملكرد آناليزرها استفاده نمود:
- **الف ـ انجام روش‌هاي كنترلي بر روي نمونه‌هاي بيماران:**

☜ روش بريتين، انجام روش‌هاي مرجع بر روي نمونه‌هاي بيماران، الگوريتم بول، آزمون F، آزمون مضاعف، آزمون چك و... .

- **ب ـ كنترل براساس نتايج بيماران:**

☜ همخواني پاسخها با وضعيت باليني بيمار، ارتباط با ساير آزمونهاي آزمايشگاهي و گزارش تجمعي نتايج بيمار، بررسي دلتا وغيره.

روش كنترلي بريتين = آزمون پایداری کالیبراسیون

- این روش مبتنی بر آزمون آماري t استودنت است
- براساس مشاهدات بريتين هفت پارامتر RBC ، WBC ، Hb ، HCT ، MCV ، MCH و MCHC در خون حاوي ضدانعقاد EDTA به مدت ٢٤ ساعت در دماي يخچال پايدار هستند.

روش انجام

- ٥ نمونه خون بيمار كه مقادير پارامترهاي آنها در محدودة طبيعي است به دستگاه داده و مقادير آنها يادداشت مي‌شود.
- نمونه‌ها در يخچال نگهداری شده و روز بعد پس از آنكه به دماي اتاق رسيدند مجدداً به دستگاه داده مي‌شوند.

☜پاسخهاي دو روز متوالي بايستي با هم همخواني داشته باشند.

- براي اثبات همخواني پاسخهاي هر يك از پارامترها از روش آماری t-student استفاده مي‌كنيم.

☜ در صورتيكه tn بدست آمده براي ٥ نمونه بيشتر از 2.776 (عدد بحراني براي ٥ نمونه از جدول t- استودنت) باشد با ٩٥% اطمينان مي‌توان گفت اختلاف معني‌داري بين دو روز متوالي در پارامتر سنجش شده وجود دارد. در اين حالت دستگاه كاليبره نبوده و بايد اقدام به رفع اشكال نمود.

☜ در صورتيكه tn محاسبه شده كوچكتر از عدد بحراني باشد تفاوت معني‌داري بين نتايج دو روز ديده نمي‌شود. اين حالت ازنظر كنترل كيفي وضعيت مناسبي به‌شمار می‌رود.

روش آماري نسبت F (مقايسه عملكرد آناليزر با يك آناليزر كاليبره شده)

- چنانچه از كاليبراسيون يك آناليزر اطمينان داشته باشيم مي‌توانيم با استفاده از پاسخ‌هاي آن، كاليبراسيون دستگاه‌هاي ديگر را ارزيابي نماييم. بدين منظور از روش آماري تحليل واريانس يا نسبت F استفاده مي‌شود.
- روش نسبت F، واريانس دو سنجش را با هم مقايسه مي‌كند
- اين نسبت نبايد كمتر از ۱ باشد. بنابراين مجموعه‌اي را كه واريانس بزرگتري دارد در صورت كسر قرار مي‌دهيم.
- نتايج حاصل از نسبت F با عدد بحراني موجود در جدول f (با درجه آزادي n-1) مقايسه مي‌گردد.
- چنانچه نسبت F بزرگتر از عدد بحراني موجود در جدول f باشد اختلاف واريانس‌ها معني‌دار مي‌باشد. در اين حالت آناليزر دوم خارج از كاليبراسيون بوده و بايستي كاليبره گردد.

$$F\text{-ratio} = \frac{s^2 \text{ of set A}}{s^2 \text{ of set B}}$$

هنگامیکه ۱۰ بار شمارش WBC در دو دستگاه نتایج زیر را داشته باشد:

	Counters I	Counters II
Mean ($\bar{x}$)	12.04	11.48
$\sum(x - \bar{x})^2$	7.28	2.156
Variance (s^2) $= \frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n - 1}$	0.81	0.24
F-ratio $= \left[\frac{s^2 \text{ Set A}}{s^2 \text{ Set B}}\right]$	3.37	

واریانس پاسخهاي دستگاه اول

واریانس پاسخهاي دستگاه دوم

عدد بحراني براساس جدول F با درجه آزادي ۹ به احتمال ۹۵% برابر ۱۸/۳ است.

d.f. Numerator

ν_2 \ ν_1	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38
3	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.60	3.44	3.39
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18

F= 3.37

از آنجا كه ۱۸/۳ < ۳۷/۳ است بنابراين اختلاف پاسخهاي دو دستگاه معني‌دار مي‌باشد.

آزمون‌های دوتایی بر روی نمونه بیماران

- مي‌توان نمونه‌هاي بيماران را هر كدام دوبار به آناليزر داد و پاسخ‌ها را با هم مقايسه نمود
- حدود ۵-۴ نمونه متوالی مجدداً مورد آزمایش قرار می‌گیرند

- اين روش ساده‌ترين راه كنترل كيفی است ولي داراي معايبي نيز مي‌باشد:

- تنها مي‌تواند عدم دقت دستگاه را نشان دهد (خطاهاي تصادفي).
- وقت گير بوده و به علت حجم كاري زياد آزمايشگاه انجام مداوم آن امكانپذير نيست
- درصورت انجام نادرست آزمایش بصورت مداوم، SD عریض می‌شود ⇦ نسبت به خطاهای منفرد حساس نخواهد بود
- نسبت به انحرافات تدریجی یا کالیبراسیون نادرست حساس نیست

$$SD = \sqrt{\frac{\Sigma\ of\ d^2}{2n}}$$

تفسير: هيچكدام از آزمايش‌هاي دوتايی نبايد بيش از 2SD با هم اختلاف داشته باشند.

- اين آزمون نسبت به خطاهاي تصادفي (RE) حساس است .

نمونه‌ای از آزمون دوتایی بر روی نمونه بیماران

First count	Second count	d	d^2
5.4	5.8	-0.4	0.16
8.3	10.5	-2.2	4.84
17.2	18	-0.8	0.64
5.4	5.4	0	0
12.2	11.8	0.4	0.16
			$\sum = 5.8$

$$sd = \sqrt{\frac{5.8}{10}} = 0.76$$

$$sd = \sqrt{\frac{\sum d^2}{2n}}$$

$$sd = \sqrt{\frac{5.8}{10}} = 0.76$$

2sd=1.5

d >2 SD → Random Error

آزمون بازبيني (Check test)

- اين روش را مي‌توان جهت شناسايي فساد معرف‌ها يا خرابي آناليزر در فاصله زماني انجام دو آزمايش بكار برد.

روش انجام:

- ۵-۴ نمونه از مجموعة قبلي انتخاب شده و مجدداً مورد ارزيابي قرار مي‌گيرند.

☜ توصيه بر اين است كه همان نمونه‌هاي مورداستفاده براي آزمون مضاعف بلافاصله در ٤ درجه سانتي‌گراد قرار گرفته و روز بعد از آنها جهت آزمون بازبيني استفاده شود.

تفسير:

- نتايج بدست آمده بايستي در محدودة ۲ SD همديگر باشند (در صورت نگهداري نمونه‌ها در شرايط مناسب).

☜ اطمينان از شرايط مطلوب نگهداري نمونه‌ها امري ضروري است در غير اينصورت تغييرات رخ داده قابل تفسير نخواهند.

☜ در صورتي كه فاصله زماني بين دو آزمايش بيش از ۶ ساعت در دماي آزمايشگاه باشد، اين روش جهت هموگلوبين مناسب، جهت پارامترهاي PLT، WBC و RBC نسبتاً مناسب و براي هماتوكريت MCV نامناسب است.

نكته:

☜ بهتر است نمونه‌هايي كه براي آزمايش بازبيني و دوتايي آزمايش مي‌شوند، يكسان باشند.

- مقدار SD همانند آزمون دوتايی محاسبه مي‌گردد.
- چنانچه SD آزمون‌هاي بازبيني بزرگتر از SD محاسبه شده براي آزمون دوتايی باشد (به شرط نگهداري نمونه‌ها در شرايط مناسب)، خرابي نمونه‌ها و يا اشكال در عملكرد آناليزر مسجل مي‌شود.

پايش عملكرد آناليزرها با استفاده از آزمون ميانگين متحرك يا الگوريتم XB

- تنها در بخش هماتولوژي آزمايشگاه قابل اجرا است
- اين روش براساس ثبات انديس‌هاي وينتروب در جمعيت مراجعين به آزمايشگاه طراحي شده است.
- مكانيسمهاي فيزيولوژيك دقيقي مسئول كنترل و حفظ اندازة سلولي و غلظت هموگلوبين در اريتروسيتها بوده و باعث ثبات اين پارامترها در يك محدودة كنترلي باريك مي‌شوند.
- در هر آزمايشگاه مقدار متوسط اين انديسها ـ كه از گروههاي بزرگي از افراد سالم و بيمار بدست مي‌آيد ـ نه تنها از يك روز به روز ديگر مشابه است بلكه مي‌توان گفت كه حتي داراي يك ثابت جهاني مي‌باشد.

آزمون ميانگين متحرك يا الگوريتم XB

- هر آزمايشگاه مي‌تواند از انديسهاي اريتروسيتي جمعيت بيماران خود به عنوان يك استاندارد داخلي جهت پايش كاليبراسيون آناليزرهاي هماتولوژي استفاده نمايد.

- به عنوان مثال پارامتري نظير MCHC فاقد تغييرات جغرافيايي بوده ونيز در حالت سلامت و بيماري تغييرات آن اندك است.
- بنابراين پايش ميانگين اين پارامتر در روزهاي مختلف مي‌تواند انحراف احتمالي سنجشهاي آناليزر را نشان دهد.

آزمون ميانگين متحرك يا الگوريتم XB

- براساس اين واقعيت بول و همكاران الگوريتم ويژه‌اي جهت كنترل كيفي داخلي آناليزرهاي هماتولوژي ارائه نمودند كه تحت عنوان آزمون آماري ميانگين متحرك يا آناليز XB خوانده مي‌شود.

- اين الگوريتم تنها جهت پارامترهاي اريتروسيتي ـ و نه پارامترهاي لكوسيتي و پلاكتي ـ بكار مي‌رود

- جهت آزمايشگاههايي كه روزانه تعداد زيادي بيمار پذيرش مي‌كنند
- در آزمايشگاههايي كه تقريباً داراي مراجعه‌كنندگان ثابتي هستند

- به دليل وجود ماشين حسابهاي قابل برنامه‌ريزي و نيز نرم‌افزارهاي رايانه‌اي، استفاده از آن در غالب آزمايشگاهها قابل دستيابي است.

- اين الگوريتم به عنوان بخشي از برنامه نرم‌افزاري در رايانه آناليزرهاي جديد هماتولوژی وجود داد.

مزایای الگوریتم میانگین متحرک

- آشکار کردن خطاهايي كه در جمع‌آوري يا فرآوري نمونه‌ها وجود دارند

- میانگین نتایج بیماران نشان‌دهندة روند کلي آزمایش است.
  - گفتني است نمونة خون كنترل در مرحلة انجام آزمايش وارد روند كاري مي‌شود و قادر به آشكارسازي خطاهاي قبل از انجام آزمايش نمي‌باشد.

- در این روش از خون تازه جهت ارزيابي كاليبراسيون آناليزر و يا صحت پاسخها استفاده مي‌شود.

- بدون هزینه است.

معايب الگوريتم ميانگين متحرک

- اگرچه با اين روش استفاده از کنترل‌هاي سلولي در ارزيابي کاليبراسيون دستگاهها محدود مي‌شود ولي نياز به اين کنترل‌ها به‌طور کامل برطرف نمي‌گردد.

- ميانگين‌هاي بدست آمده به هر حال مقداري واريانس دارند.

- ممکن است چند روز طول بکشد تا از تغيير در روند کار آگاه شويم.

- اين روش محدود به انديس‌هاي اريتروسيتي بوده و نمي‌توان آن‌را جهت شمارش‌هاي لکوسيتي و پلاکتي (بدليل توزيع گسترده جمعيتي آنها) بکار گرفت

برقراري روش ميانگين متحرك

- بسته به مدل آناليزر آزمايشگاه متفاوت مي‌باشد.
- جهت استقرار اين سيستم حداقل روزانه بايد ٦٠ نمونه بيمار توسط دستگاه آناليز شود (سه ران كاري ٢٠ تايی) و داده‌هاي بدست آمده مورد استفاده قرار گيرد.
- چنانچه نرم‌افزار رايانه آناليزر مجهز به سيستم كنترلي XB باشد
  ⇦ بر اساس كتابچه دستگاه عمل مي‌شود

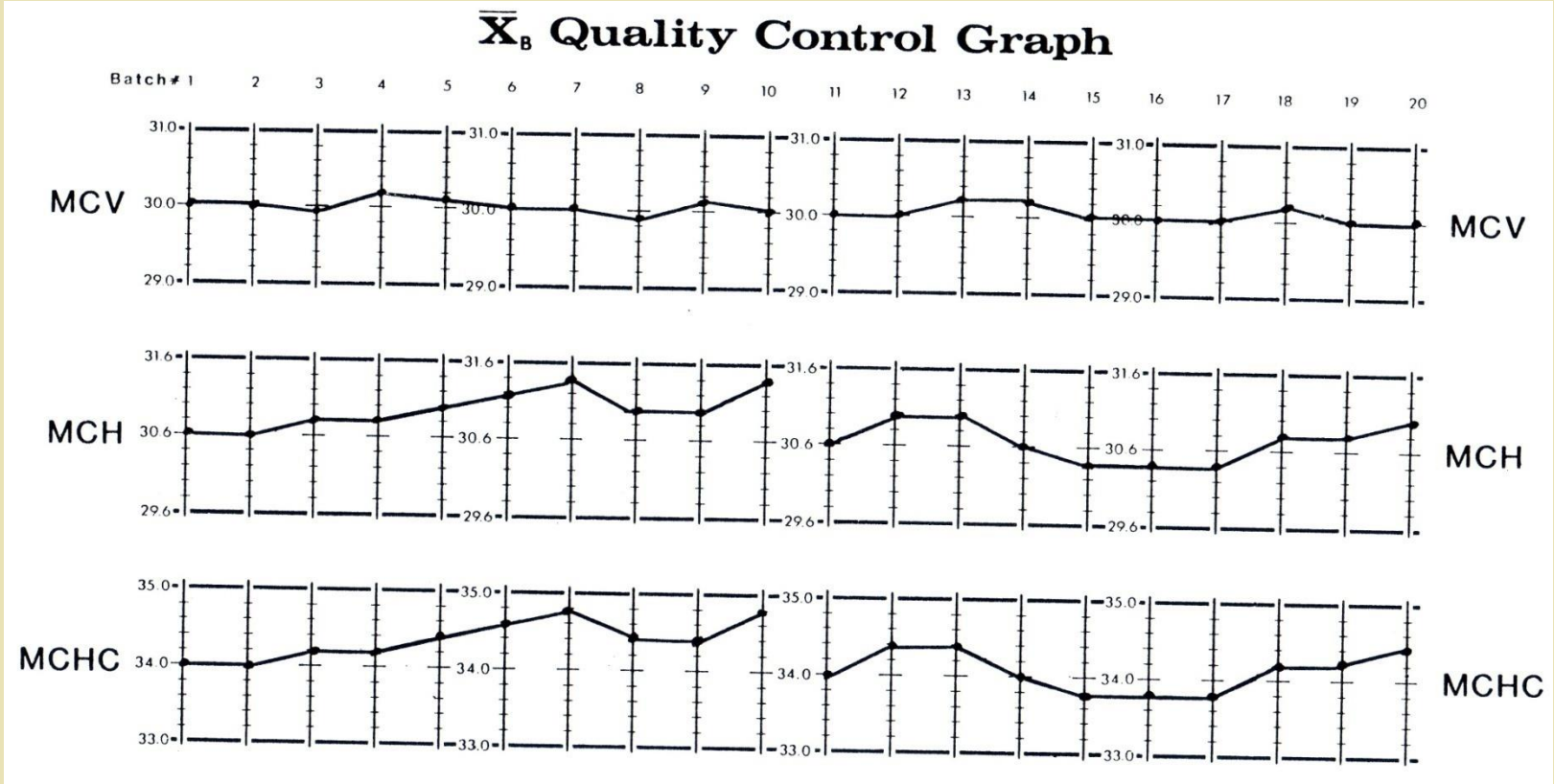
برقراري روش ميانگين متحرك

- اگر آناليزر مجهز به سيستم كنترلي XB نباشد به ترتيب زير اقدام مي‌نماييم:

- ميانگين پاسخهاي ۱۰ روز كاري متوالي براى هر پارامتر محاسبه مى‌شود.
  - توصيه مي‌شود در محاسبه اين ميانگين، اعداد انحرافي (اعداد بسيار پايين و يا بسيار بالا) حذف شوند.
- آناليز XB با استفاده از دسته‌هاي ۲۰ تايي نمونه‌هاي بيماران آغاز مى‌شود.
  - معمولاً انديس‌هاي اريتروسيتي در محدودة ۱% ميانگين جمعيت ثابت هستند.
- چنانچه مقادير ميانگين پارامترها كه به ازاء هر ۲۰ نمونه بدست مي‌آيد كمتر از ۳% ميزان پايه (ميانگين اوليه) تغيير كرده باشد عملكرد آناليزر تحت كنترل مي‌باشد.
- چنانچه درصد انحراف اين ميانگين بيشتر از ۳% ميزان پايه باشد، بايستي كاليبراسيون آن موردارزيابي قرارگيرد.

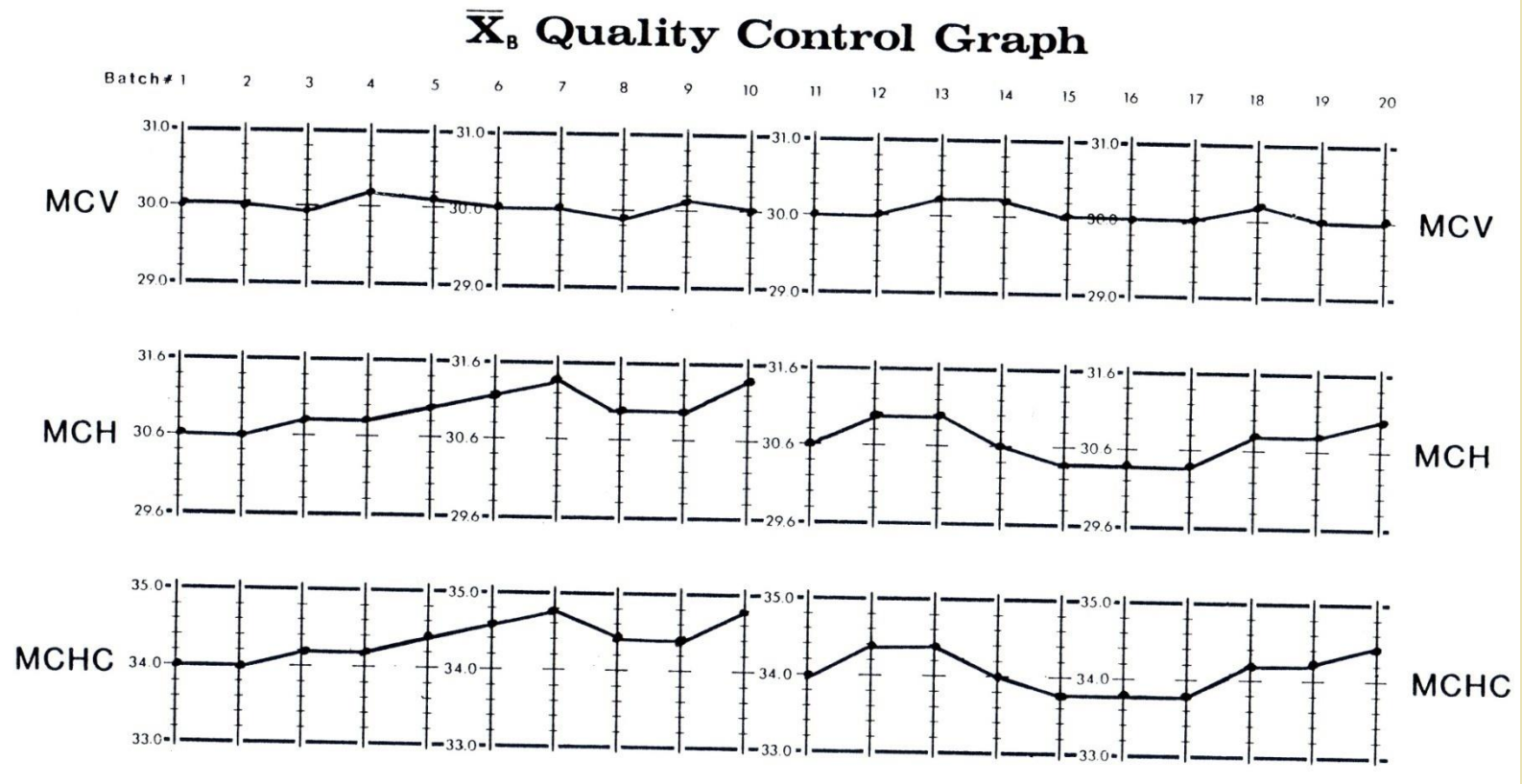
MCV طبيعي همراه با افزايش همزمان MCH و MCHC (بچ‌هاي ۱ تا ۱۰)

- افزايش همزمان MCH و MCHC با عدم تغيير MCV همراه بوده است.
- در آناليزرهايي كه HCT را به‌طور مستقيم اندازه‌گيري مي‌كنند، تنها حالتي كه مي‌تواند مسبب اين الگو باشد، افزايش كاذب هموگلوبين است (مثلاً به علت كدر شدن محلول سنجش هموگلوبين).
- در سيستمهايي كه MCV را به‌طور مستقيم اندازه‌گيري مي‌كنند، در دو حالت احتمال شكل‌گيري اين الگو وجود دارد، يكي افزايش كاذب ميزان Hb و ديگري كاهش كاذب شمارش RBC .
- در برخورد با چنين حالتي نخست بايد كاليبراسيون كانال هموگلوبين ارزيابي گردد چنانچه در اين مورد مشكلي مشاهده نشود، محتمل‌ترين عامل، عملكرد نادرست مجراي Sampling آناليزر خواهد بود. چنانچه اين قسمت به هنگام تهيه رقت ثانويه نمونه خون جهت شمارش RBC به خوبي عمل نكند شمارش اين سلولها به‌طور كاذب كاهش مي‌يابد.



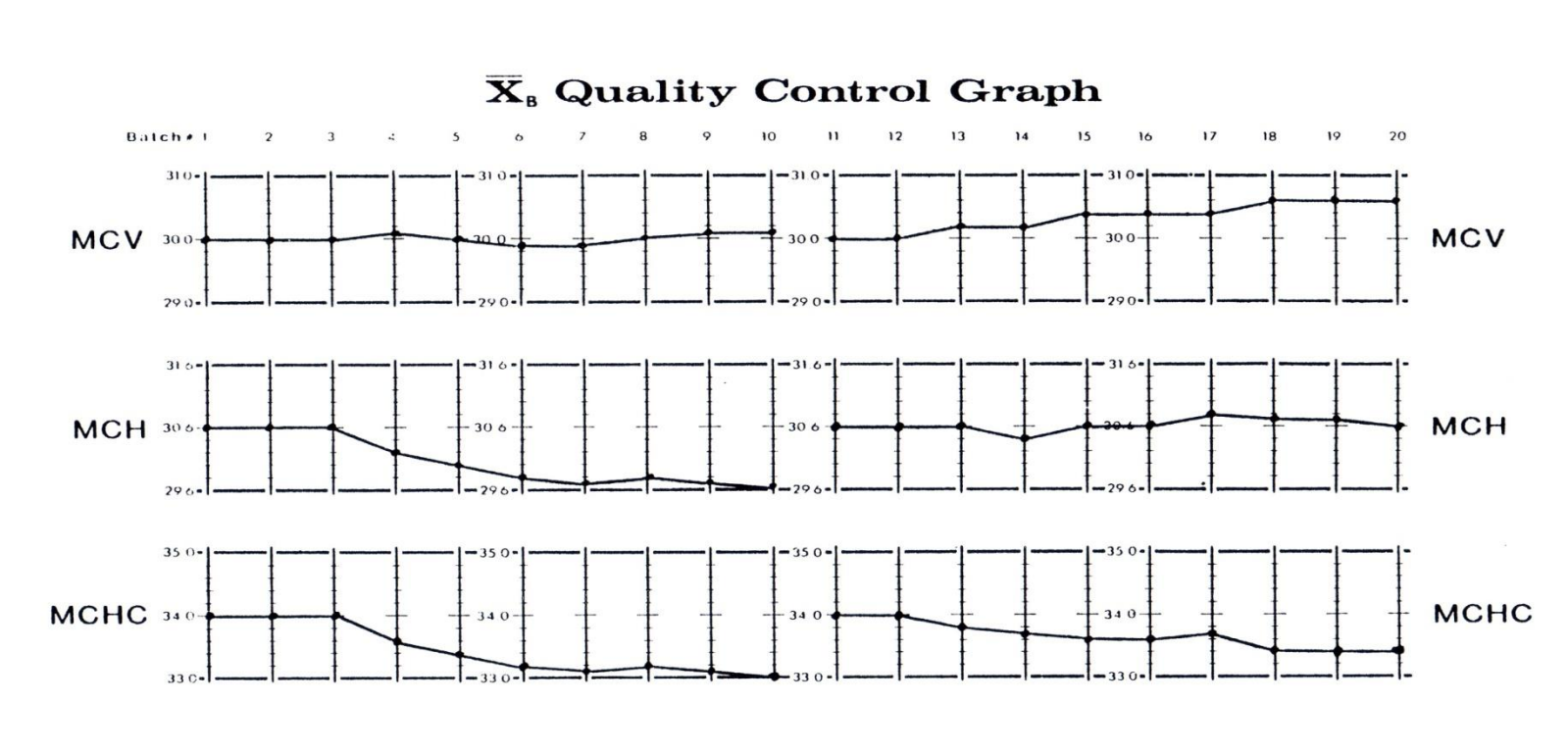
MCV طبيعي به همراه تغييرات بالا رونده و پايين رونده MCH و MCHC (بچ‌هاي ۱۱ تا ۲۰)

- وقوع اين الگو به معني عدم كاليبراسيون كانال RBC يا Hb است.
- عملكرد نامناسب بخش هيدروليكي يكي از عوامل شايع خطا در اندازه‌گيري هموگلوبين است. چنانچه انتقال محلول حاوي هموگلوبين رقيق شده به‌طور كامل صورت نگيرد وقوع چنين الگويي را در پي خواهد داشت.



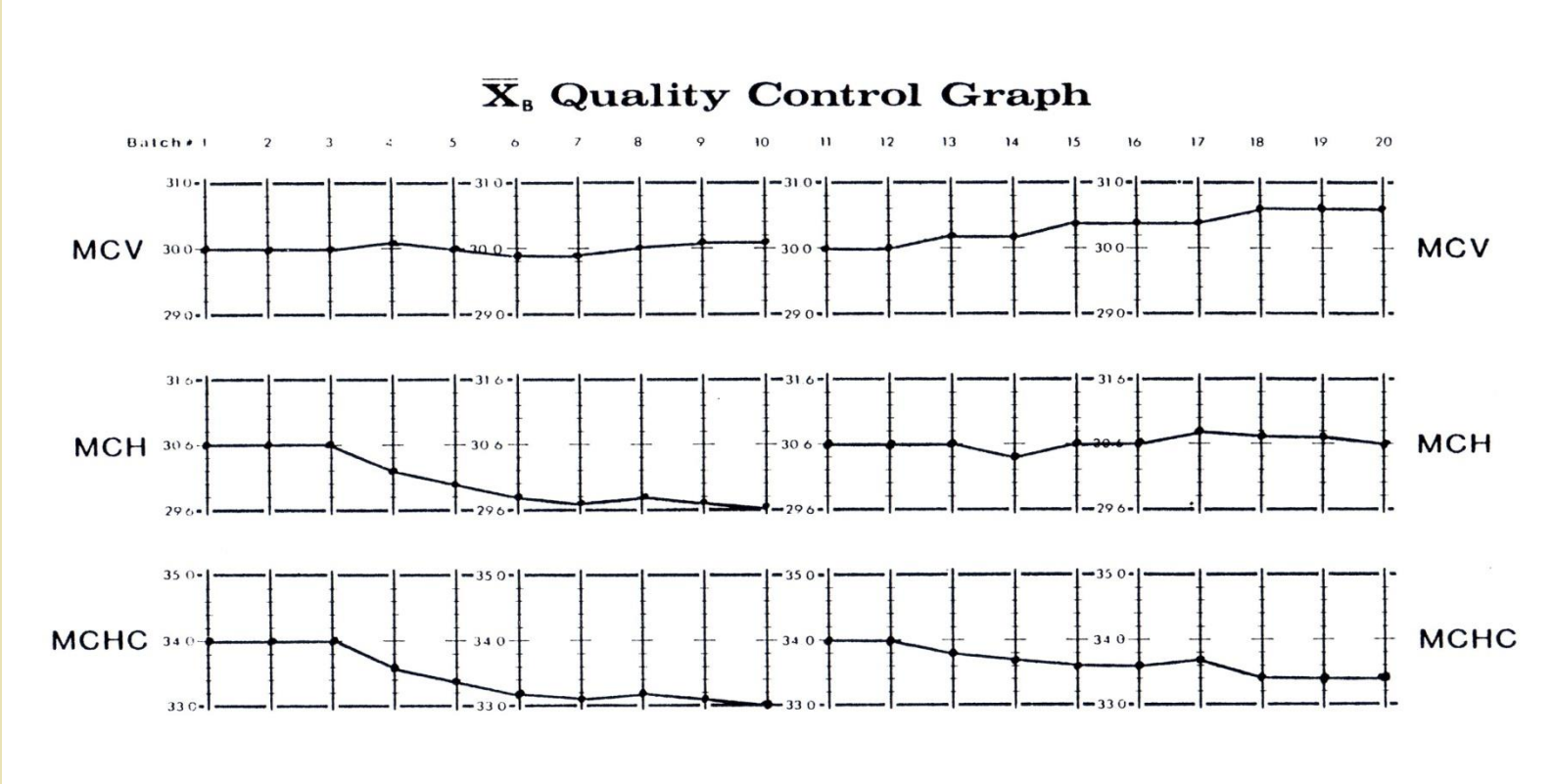
MCV طبيعي همراه با MCH و MCHC كاهش يافته (بچ‌هاي ۱ تا ۱۰)

- كاهش كاذب در سنجش هموگلوبين مي‌تواند عامل اين الگو باشد.
- چنانچه بدنبال روند نگهداري يا تعمير آناليزر، منبع نوري در سنجش Hb به خوبي تنظيم نشود، مقدار هموگلوبين به‌طور كاذب كاهش يافته و نتيجتاً كاهش انديس‌هاي MCH و MCHC را در پي خواهد داشت



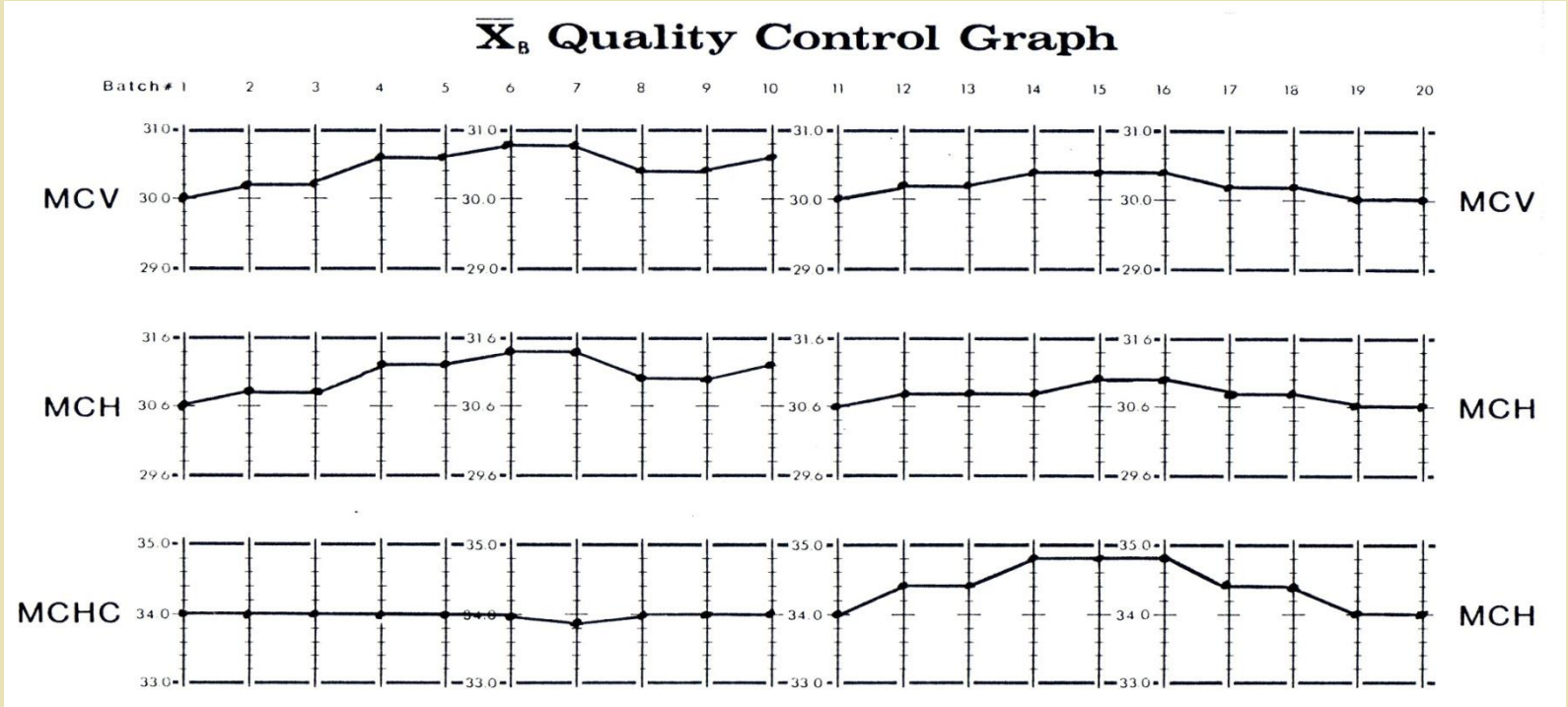
MCV افزايش يافته همراه با كاهش MCHC (بچ‌هاي ۱۱ تا ۲۰)

- عامل مسبب اين الگو عدم كاليبراسيون واحد آناليتيك MCV است كه شايع‌ترين علت آن بد قرارگرفتن تيوب‌هاي روزنه مي‌باشد.
- چنانچه اين تيوب‌ها در جايگاهي بسيار نزديك به بچ شمارش قرار گيرند، جريان داخل روزنه را تحت‌تأثير قرار داده و باعث تغيير MCV مي‌شوند.



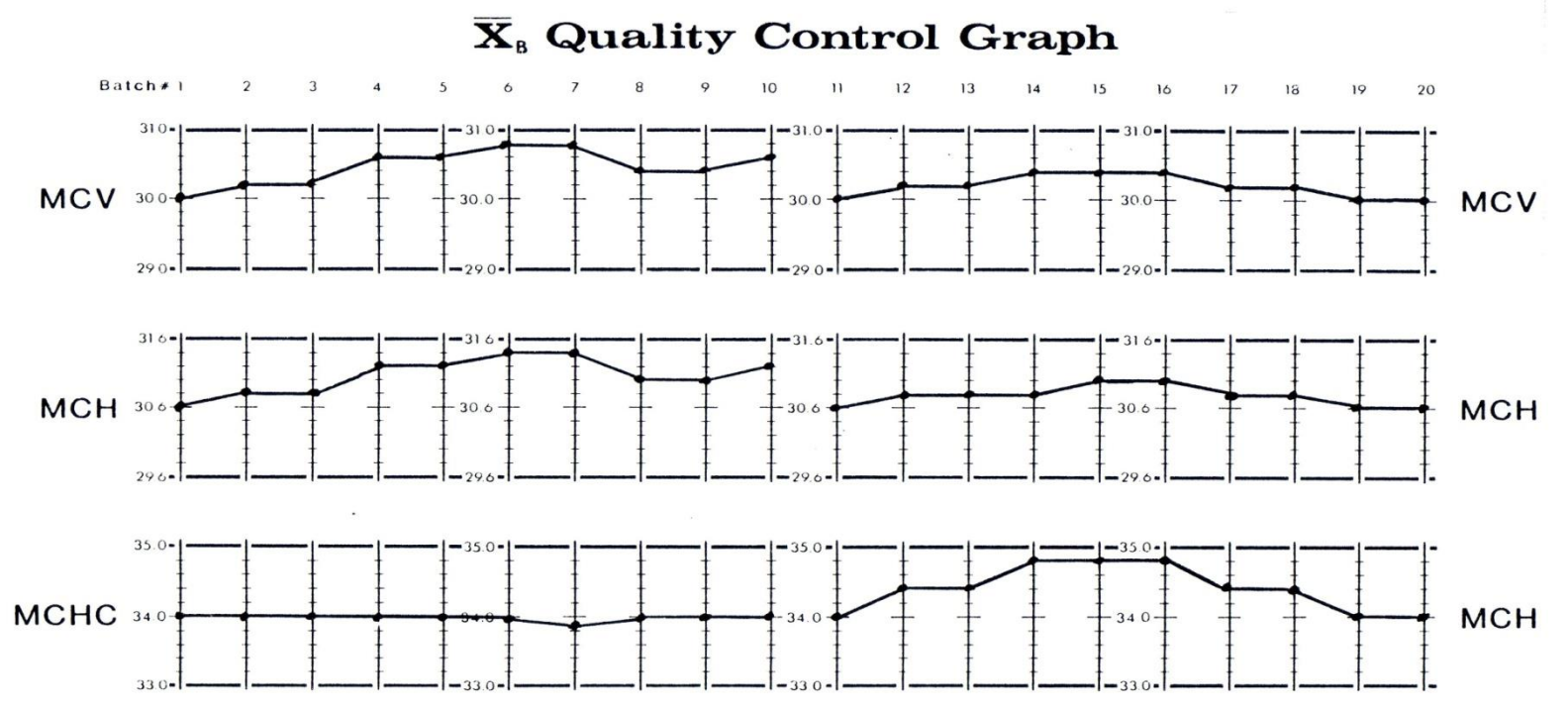
MCHC طبيعي همراه با افزايش همزمان MCV و MCH (بچ‌هاي ۱ تا ۱۰)

- در آناليزرهايي كه هماتوكريت را بصورت مستقيم اندازه‌گيري مي‌كنند، كاهش شمارش RBC ها مي‌تواند عامل اين الگو باشد.
- در آناليزرهايي كه MCV را به‌طور مستقيم اندازه‌گيري مي‌كنند، اين الگو مي‌تواند در نتيجه كاهش شمارش RBC ها و يا افزايش كاذب MCV ايجاد گردد.
- رسوب تدريجي پروتئين در روزنه شمارش باعث كاهش شمارش RBC ها به شكل كاذب مي‌گردد.
- به‌علاوه رسوب پروتئين در روزنه مذكور باعث كاهش قطر روزنه مي‌شود. بنابراين گلبولهاي قرمز به هنگام عبور از اين روزنه ظاهراً حجم بيشتري را اشغال كرده و حجم آنها بيشتر از ميزان واقعي برآورد مي‌شود. نتيجه آنكه دو انديس MCV و MCH به‌طور همزمان افزايش مي‌يابند.



افزايش همزمان انديس‌هاي MCV ، MCH و بويژه MCHC (بچ‌هاي ۱۱ تا ۲۰)

- اين حالت يك الگوي غيرمعمول است كه طي آن هر سه انديس وينتروب افزايش مي‌يابند ولي افزايش انديس MCHC تقريباً دوبرابر دو انديس ديگر است.
- اين پديده زماني رخ مي‌دهد كه نقص در بخش پنوماتيكي آناليزر اجازه مي‌دهد تعداد زيادي حباب هم اندازة سلول در محفظه‌هاي شمارش حضور يابند بگونه‌اي كه اين حباب‌ها به‌عنوان سلول شمارش مي‌گردند.



Moving Averages

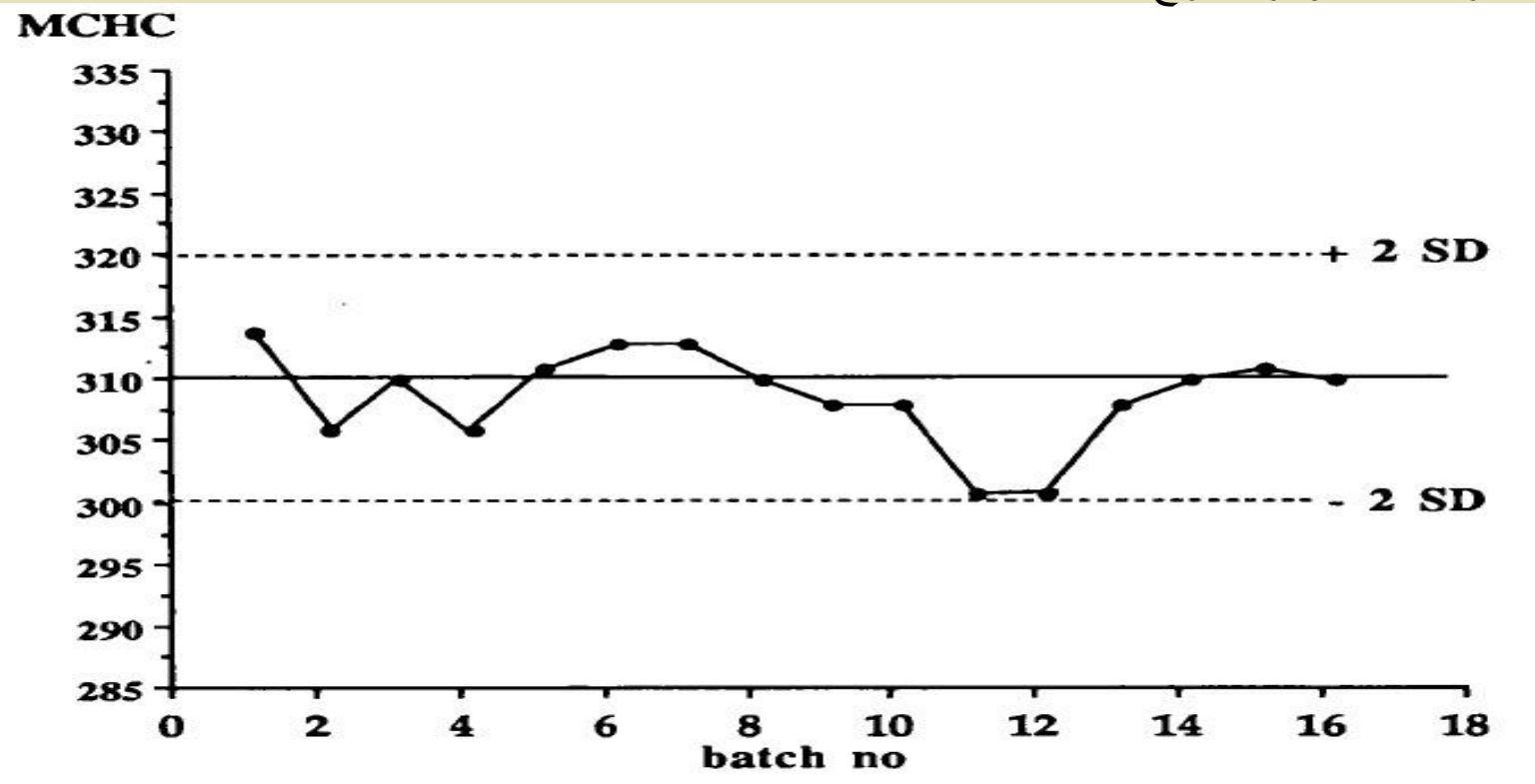
CAUSE	MCV	MCH	MCHC
Low Hb	no change	low	low
High Hb	no change	high	high
Low RCC	high	high	no change
High RCC	low	low	no change
Low Hct	low	no change	high
High Hct	high	no change	low

استفاده از MCHC در کنترل کيفي

- پارامتر MCHC ويسكوزيته داخل سلولي را منعكس مي‌كند
- از لحاظ فيزيولوژيك افزايش ميزان آن به بيش از ٤٠% امكان‌پذير نيست.
- در حقيقت سطح ٣٧ g/dL اين پارامتر آخرين حد محلول بودن پروتئين‌هاي داخل سلولي (هموگلوبين) بوده و در مقادير بالاتر از آن، هموگلوبين سلولي كريستاليزه مي‌شود.
- اين روش به خطاهاي اندازه‌گيري هموگلوبين و هماتوكريت به ويژه در ارتباط با وضعيت صحيح نمونه‌گيري حساس است.

استفاده از MCHC در كنترل كيفي

- در اين روش براي چند روز پياپي ميانگين MCHC بصورت روزانه از نمونه‌ها گرفته مي‌شود.
- سپس ميانگين كلي و انحراف معيار آن از ميانگين‌هاي آنها محاسبه شده و با توجه به مقادير بدست آمده نمودار كنترلي L-J در محدودة ۲ SD رسم مي‌گردد
- سپس ميانگين MCHC در پايان هر روز كاري محاسبه و بر روي گراف منتقل مي‌شود.
- چنانچه جوابهاي روزانه در محدودة ۲ SD قرار گيرند، عملكرد آزمايشگاه رضايت بخش است.
- پاسخ‌هايي كه خارج از محدودة ۲ SD- نمودار قرار مي‌گيرند به علت كاهش هموگلوبين و يا افزايش هماتوكريت رخ داده است.



پايش عملكرد آناليزرها با استفاده از پاسخ‌هاي بيماران ....

همبستگي نتايج

الف ـ همخواني پاسخ‌ها با وضعيت باليني بيمار

نتایج غیرمنتظره بایستی با یافته‌های بالینی مطابقت داده شوند

ب ـ ارتباط با ساير يافته‌هاي آزمايشگاهي

ارزیابی گستره خونی جهت مطابقت

ج ـ ارزيابي گروهي آزمايش‌ها (گزارش تجمعي نتايج بيمار)

ثبت داده‌های شمارش خونی به صورت گزارش تجمعی یک عملکرد مطلوب است

همبستگي نتايج

الف ـ همخواني پاسخ‌ها با وضعيت باليني بيمار

- در اين روش نتايج آزمايشگاهي بيمار با شرايط باليني وي مقايسه شده و در صورت مطابقت، پاسخهاي بيمار گزارش مي‌شوند.

- پزشكي كه درخواست انجام آزمون خاص را مي‌دهد بهترين فرد جهت ارزيابي پاسخ آزمونها مي‌باشد.

- پزشك آزمايشگاه و يا مسئول فني آزمايشگاه نيز بايد قادر به ارتباط دادن پاسخ‌هاي آزمايشگاه با شرايط باليني بيمار باشند.

- از جمله معايب اين روش آن است كه:
- فقط در آزمايشگاههاي كوچك قابل انجام بوده
- نيازمند داشتن اطلاعات باليني كافي و توانايي ارتباط دادن نتايج با يافته‌هاي باليني و يا امكان تبادل نظر با پزشك معالج بيمار است.

- مثال: یک Hb غیرمنتظره پایین یا بالا بایستی با خونریزی یا تزریق خون توصیف شود

همبستگي نتايج ....

ب ـ ارتباط با ساير يافته‌هاي آزمايشگاهي

- مجموع نتايج آزمايشگاهي يك بيمار بايستي از يك تناسب خاص برخوردار باشد.
- در اين روش كنترلي، تركيب‌هاي غيرمحتمل در نتايج چند آزمون بررسي مي‌شود.
- چنانچه آزمون‌ها در يك زمان انجام شده باشند، مقايسه نتايج آنها منجر به شناسايي خطاهاي احتمالي و اصلاح آنها قبل از گزارش جوابها مي‌شود.
- توجه به همخواني نتايج حاصل از شمارش آناليزر و آزمونهاي ديگر ازجمله يافته‌هاي گستره خون محيطي از اهميت بارزي برخوردار است.
- مثال: افزايش MCV را با ماكروسيتوز، كاهش MCV را با ميكروسيتوز، كاهش MCH را با هيپوكروم بودن گلبولهاي قرمز و... بايستي مشاهده نمود.
- موارد ديگري نظير لكوسيتوز، لكوپني، ترومبوسيتوز و ترومبوسيتوپني را مي‌توان با بررسي اسميرخون محيطي تأييد و يا رد نمود.

☜ اين روش براي بيماراني كه تنها يك آزمايش دارند و نيز در مورد آزمايش‌هايي كه ارتباط محسوسي با هم ندارند، قابل استفاده نيست.

همبستگي نتايج ....

ج - ارزيابي گروهي آزمايش‌ها (گزارش تجمعي نتايج بيمار)

- توجه به گزارش تجمعي نتايج بيمار روشي ساده، بدون هزينه و بدون نياز به وسيله يا معرف خاص است كه در واقع تمامي پاسخهاي بيمار را يكجا مورد ارزيابي قرار مي‌دهد.

- در اين روش، مجموعه‌ای از تست‌هاي يا پانل‌های وابسته به يكديگر موردنظر مي‌باشند

- هر چند كه تستهاي محدودي وجود دارند كه ارتباط كلينيكي دقيقي با هم داشته باشند ولي استفاده از اين روش براي شناسايي برخي خطاها مفيد است.

- مثال: در پانل هماتولوژي، در افراد طبيعي درصد هماتوكريت بايد حدوداً سه برابر ميزان هموگلوبين باشد.
- اين گونه روش‌هاي كنترلي در كشف خطاهاي مهم آناليز نظير اشتباه در نشانه‌گذاري نمونه‌ها، مخلوط نكرده كافي نمونه، حضور تكه‌هاي‌ريز لخته در خون، نگهداري نامناسب خون،آلودگي‌هايي كه برخي از اجزاء يك پانل تستي را بصورت تصادفي متأثر مي‌سازند، خطاهاي مربوط به تايپ پاسخ‌ها و... بسيار مؤثر مي‌باشند.

Correlation system

True leucocyte count=	*MCV* *Micro / macro*
WBC (obj40) × 2000= *WBC count* $\frac{TOTAL \quad COUNT \times 100}{NRBC + 100}$	*MCH* *hypo / hyper*
Plat (obj100) × 20000= *Plat count*	*Hg × 3=Hct* *Hg / 3=RBC*

Haematology Blood Count

			CASE No.		DATE OF BIRTH	
			SURNAME		SEX	
CONSULTANT			FIRST NAMES		WARD	
DATE						
WBC $x10^9$/L						
RBC $x10^{12}$/L						
Hb g/dL						
PCV						
MCV fL						
MCH pg						
MCHC g/dL						
Retics $x10^9$/L %	$x10^9$/L %	$x10^9$/L %	$x10^9$/L %	$x10^9$/L %	$x10^9$/L %	
Platelets $x10^9$/L						
	% $x10^9$/L	% $x10^9$/L		% $x10^9$/L	% $x10^9$/L	
Blasts			% $x10^9$/L			
Promyelocytes						
Myelocytes						
Metamyel						
Neutrophils						
Eosinphils						
Basophils						
Lymphocytes						
Monocytes						
Film morphology						
Signature						

For Lab. use only

آزمون دلتا Delta test

- اختلاف بين آزمونهاي متوالي بيمار را در حالت ثابت دلتا گويند. اين اختلاف بايستي اندك بوده و از حد خاصي تجاوز نكند.
- حداقل نياز به دوسري آزمايش از يك بيمار است. در اين روش نتايج كنوني آزمايشهاي بيمار با نتايج قبلي وي (حدود ۳-۲ هفته قبل) مقايسه مي‌گردد.
- در صورتيكه شرايط بيمار ثابت باشد، نتايج حاصل از آزمون‌هاي وي بايد ثابت باشد.
- چنانچه اختلاف بين دو پاسخ متوالي از يك محدودة مشخص بيشتر باشد نمونة بيمار جهت بررسي بيشتر كنار گذاشته مي‌شود.
- اختلاف در دلتا چك در اثر خطاهاي تكنيكي و يا اختلالات دستگاهها ايجاد مي‌شود.
- در اين روش داشتن محدودة تغييرات يا محدودة دلتا ضروري است. محدودة دلتا از تغييرات فيزيولوژيك و ضريب تغييرات (CV) محاسبه مي‌شود.

☜ در موارد زير استفاده از روش دلتاچك جهت كنترل كيفي امكانپذير نيست:

☝ بيماراني كه فقط يك بار به آزمايشگاه مراجعه مي‌كنند و يا فواصل زماني مراجعة آنها بسيار طولاني است.

✌ بيماراني كه تحت درمان فعال بوده و به آن پاسخ مي‌دهند.

☠ بيماراني كه سير بيماري در آنها فعال بوده و باعث تغيير در پاسخهاي آنها مي‌شود.

مقادير دلتا براي برخي از پارامترهاي هماتولوژي

Hb	*2 g/dl (<10%)*
PCV	*0.05*
MCV	*>6 fl*
MCH	*>5 pg*
RBC	*<10%*
WBC	*Normal to abnormal (20-25%)*
Platelets	*Reduced or increased by more than 50%*

برنامه‌های کنترل کیفیت از نظر زمانی

حداقل برخی از برنامه‌های زیر بایستی به شکل دائمی انجام گیرند

سیستم همبستگی

- گزارش‌های تجمعی
- همبستگی گستره خونی با شمارش سلولی
- همبستگی تغییرات شمارش خونی با وضعیت بالینی

حداقل برخی از برنامه‌های زیر بایستی به شکل روزانه انجام گیرند

آزمایش نمونه‌های کنترلی

- استفاده از نمونه‌های کنترل با هر بچ از نمونه‌ها
- ترسیم نمودار های کنترلی برای هریک از نمونه‌های کنترلی
- انجام آزمایش‌های مضاعف (دوتایی) بر روی نمونه‌های تعدادی از بیماران
- انجام آزمایش بازبيني (Check Test) برروي تعدادي از نمونه هاي بيماران
- بازبینی اختلاف بین دو سری نتایج بیمار (بازبینی دلتا)
- محاسبه میانگین متحرک برای MCV ، MCH ، MCHC در صورت استفاده از سل‌کانتر
- محاسبه میانگین MCHC در صورت استفاده از روشهای دستي

حداقل برخی از برنامه‌های زیر بایستی به شکل ماهیانه انجام گیرند

- بازبینی معرف‌ها و کیت‌ها (از نظر نحوه نگهداری و تاریخ انقضاء)
- تکرارپذیری عملکرد سل‌کانتر
- نمونه‌گیری (از نظر نگهداری نمونه و ضد انعقاد)

حداقل برخی از برنامه‌های زیر بایستی هر ۶ ماه یکبار انجام گیرند

- کالیبراسیون سل‌کانتر و هموسیتومتر
- کالیبراسیون سمپلر و پی‌پت

Calibration check of blood cell counters & hemoglobinometers

- ***Hemoglobin*** - ***HiCN reference preparation***
  - ***lysate***
- ***RBC*** - ***preserved blood***
  - ***stablized blood***
- ***WBC*** - ***Stablized human blood***
  - ***Stablized avian blood***
- ***Platelets*** - ***Stablized human plat. Prep.***

كنترل كيفي غيرمستقيم در آزمايشگاه هماتولوژي

- اقدامات صورت گرفته در كنترل كيفي غيرمستقيم اهميت و ارزش زيادي در تضمين كيفيت آزمايشگاه دارند.
- معمولاً اين اقدامات در پروتكل‌هاي عملي آزمايشگاه (SOP) گنجانده شده‌اند.
- يك روش مهم IQC ، اطمينان از كارايي دستگاههاست.

☜ بايد با دقت به تمامي روشهاي نگهداري دستگاه و نيز روش هايي كه از طرف كارخانه سازنده جهت كنترل عملكرد دستگاه ارائه شده است توجه نمود.

☜ هرگونه فعاليت مراقبت روزمره، تنظيم و يا تعمير دستگاه بايستي توسط فرد مسئول و با ذكر تاريخ در يك دفتر ويژه ثبت گردد.

- گاهي بررسي خون بيمار مي‌تواند از خطاهاي حين انجام آزمايش پيشگيري كند. به عنوان مثال بررسي چشمي نمونة بيمار و ترجيحاً استفاده از اپليكاتورهاي چوبي در اين عمل مي‌تواند وجود لخته را در نمونه آشكار سازد
- يك روش تأييدي مهم در آزمايشگاه هماتولوژي، مقايسه نزديك اسمير خون محيطي با پاسخهاي حاصل از آناليزر است.

ارزيابي عملكرد آناليزرها از طريق شركت در برنامه‌هاي كنترل كيفي خارجي

- كنترل كيفي خارجي عبارت است از ارزيابي نتايج حاصل از يك نمونة خاص كه توسط آزمايشگاههاي مختلف ارائه مي‌گردد.

- در اين حالت وضعيت كاليبراسيون يك آناليزر با مقايسه نتايج آن براي نمونه‌هاي خاص و نتايج بدست آمده در آزمايشگاههاي ديگر روي همان نمونه مشخص مي‌شود.

- اين روش كنترلی به دو شكل انجام می‌گيرد:
  - الف ـ روش تطبيق جوابها
  - ب ـ روش ارزش اختصاص داده شده

روش تطبيق جوابها (Consensus Method)

- ۱ ـ نمونه‌هاي كنترلي يكسان جهت اندازه‌گيري هموگلوبين به تمامي آزمايشگاهها فرستاده شده و پاسخهاي گزارش شده آنها دريافت مي‌گردد.
- ۲ ـ ميانگين ($\overline{X}$) و انحراف معيار (SD) اين پاسخها تعيين مي‌شود.
- ۳ ـ آن دسته از نتايجي كه در خارج از محدودة $\overline{X}\pm 2SD$ هستند حذف مي‌گردند.
- ٤ ـ از مابقي نتايج ميانگين سنجيده يا وزين و انحراف معيار سنجيده بدست آمده و شاخص انحراف از رابطة زير محاسبه مي‌گردد:

انحراف معيار سنجيده / ميانگين سنجيده ـ جواب آزمايشگاه = شاخص انحراف (DI)

تفسير شاخص انحراف (Deviated Index):

- چنانچه ميزان DI<0.5 باشد نمره آزمايشگاه عالي است.
- اگر DI بين ۱-۰/۵ باشد پاسخها رضايت‌بخش هستند.
- اگر DI بين ۲-۱ باشد، هنوز پاسخ‌ها قابل قبول هستند.
- چنانچه بيش از ۲ باشد غيرقابل قبول بوده و بايد كاليبراسيون آناليزر بررسي شود.
- در حالت DI>3 يك نقص جدي وجود داشته و بايد علت آن مشخص شود.

روش ارزش اختصاص داده شده (Assigned Value Method)

- ۱- در اين روش خون كنترلي (مثلاً كنترل Hb) ساخته شده و ميزان واقعي آن با روشها و مواد مرجع تعيين مي‌گردد.
- ۲- سپس اين نمونة كنترلي به آزمايشگاههاي شركت‌كننده فرستاده شده و پاسخهاي آنها دريافت مي‌گردد.
- ۳- اين پاسخها را مي‌توان با دامنه يا انحراف معيار از ميانگين اختصاص داده شده قضاوت نمود.

تفسير

- چنانچه نتايج آزمايشگاهها كوچكتر از SD ۱ باشد، پاسخها عالي محسوب مي‌شوند.
- نتايج بين SD ۲-۱ نيز رضايت‌بخش هستند.
- اگر نتايج آزمايشگاهها بين SD ۳-۲ باشند داراي نقص بوده و نياز به دقت دارند.
- چنانچه نتايج بيشتر از SD ۳ باشند بايد علت امر بررسي شود.

منابع:

- ۱- علی ملکی. **اصول کار ومنابع خطا در آنالیزرهاي هماتولوژي (سلکانترها)**، چاپ اول، انتشارات اندیشه رفیع، تهران، ۱۳۸۴.
- ۲- علی ملکی، دکتر سعید کاویانی، کامران منصوری. **کنترل کیفي در آزمایشگاه هماتولوژي**، چاپ اول، انتشارات اندیشه رفیع، تهران، ۱۳۸۸.
- ۳- علی ملکی. **قابلیتها و محدودیتهای کنترلهای سلولی در کالیبراسیون آنالیزرهای هماتولوژی.** نشریه پزشك و آزمایشگاه، شماره ۲۷، ۱۳۸۶.
- ۴- علی ملکی. **اتوماسیون در آزمایشگاه هماتولوژی، اهمیت و ضرورت.** نشریه پزشك و آزمایشگاه، شماره ۲۸، ۱۳۸۶.
- ۵- علی ملکی، دکتر سعید کاویانی. **تشخیص و پیگیری منابع خطا در شمارش اتوماتیک پلاکتها (موارد افزایش کاذب).** نشریه پزشك و آزمایشگاه، شماره ۳۴، ۱۳۸۷.
- ۶- علی ملکی، دکتر سعید کاویانی. **رویکردي نوین به گسترة خون محیطي و اهمیت آن در تشخیص‌هاي افتراقي.** نشریه تشخیص آزمایشگاهی، شماره های ۵۸ و ۶۱، ۱۳۸۷ و ۱۳۸۸.
- ۷- علی ملکی، دکتر سعید کاویانی. **تشخیص و پیگیری منابع خطا در شمارش اتوماتیک پلاکتها (موارد کاهش کاذب).** نشریه پزشك و آزمایشگاه، شماره ۳۵، ۱۳۸۷.
- ۸- علی ملکی، دکتر سعید کاویانی. **ترومبوسیتوپنی کاذب (اهمیت و راهکارهای تشخیص و تصحیح آن).** نشریه پزشکی تامین اجتماعی، شماره ۴۴، ۱۳۸۷.
- ۹- علی ملکی. **راهکاری کارآمد در کنترل کیفی هماتولوژی (قوانین وستگارد مرتبط با سه سطح کنترل).** نشریه پزشك و آزمایشگاه، شماره ۳۶، ۱۳۸۷.
- ۱۰- دکتر گل افشان، حبیب اله: **روش‌هاي آزمایشگاهي و کنترل کیفي در خون‌شناسي**، شیراز: انتشارات دانشگاه علوم پزشکي شیراز، ۱۳۸۰.
- ۱۱- دکتر کریمي شهیدي، سید مهدي: **ریاضي، آمار و کنترل کیفي در طب آزمایشگاهي**، تهران: موسسه فرهنگي انتشاراتي تیمورزاده، ۱۳۸۱.
- ۱۲- دکتر پوپك، بهزاد: **کنترل کیفي داخلي در هماتولوژي**. تهران: نشریه تخصصي آزمایشگاهي و تشخیص، شماره یك، پائیز ۱۳۸۳.
- ۱۳- فریزان، مصطفي: **روش کالیبراسیون دستگاههاي شمارشگر خودکار سلولهاي خون**. تهران: نشریه تشخیص آزمایشگاهي، شماره ۱۱، آذر و دي ۱۳۷۹.
- ۱۴- پاورپوینتهای آموزشی آزمایشگاه رفرانس.

References:

- 1. James O. Westgard: Basic QC Practices. 2th ed. (2002). www.westgard.com
- 2. S.M. Lewis, B.J. Bain, I. Bates: Dacie and Lewis practical Haematology. Churchill Living stone, 9th ed, (2001).
- 3. John A. Koepke: Laboratory Hematology. Churchil Livingstone, 1th ed, (1984).
- 4. Chanarian, Laboratory Hematology. Churichil Livingstone, 1th ed, (1989)
- 5. World Health Organization. Biological Substances: International Standards and Reference Reagents, Geneva: WHO, 1991.
- 6. S.M. Lewis: Quality Assurance in Haematology. World Health Organization/LAB.98.4.

کنترل کیفی در آزمایشگاه هماتولوژی

نگارش:

علی ملکی

کارشناس ارشد هماتولوژی

دکتر سعید کاویانی

عضو هیأت علمی هماتولوژی دانشگاه تربیت مدرس

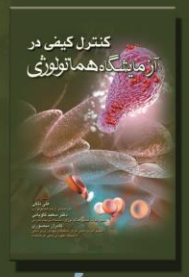
کامران منصوری

عضو هیأت علمی مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی
دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

کنترل کیفی در آزمایشگاه هماتولوژی

نگارش: علی ملکی / دکتر سعید کاویانی / کامران منصوری

H.foolad@hotmail.com 0912 179 6537



Quality Control in Hematology lab

Ali Maleki
Msc of Hematology
Dr. Saeed Kaviani
Ph.D. of Hematology
Kamran Mansouri
Msc of Hematology

با سپاس فراوان از توجه شما