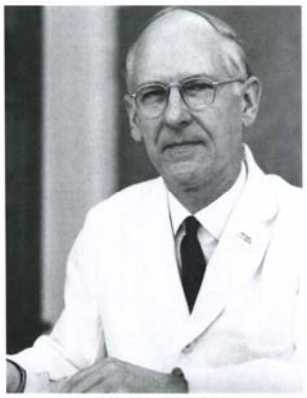
روش استاندارد انجام آزمایشهای اندازه گیری هموگلوبین و شمارش سلولی

N.Shirani



Sir John V Dacie, MD, FRCPath, FRS
1912-2005

Measurement of Blood Hemoglobin using Hemiglobincyanide(HiCN) Method

معرف درابکین

KCN	0.05g
K3Fe(CN)6	0.2g
KH2PO4(Anhydrous)	0.140g
Detergent sterox-SE(Herleco) or Triton X-100	0.5or1ml
Reagent water(Type 1)	1000ml

قبلا بجای دی هیدروژن مونوپتاسیم فسفات از بیکربنات استفاده میشد که زمان واکنش در آن '10 بود.
سیانید پتاسیم سمی بوده و عموماً در برخورد با اسید آزاد شده و عوارض خاص تنفسی خود را ایجاد میکند. البت مقدار آن به قدری رقیق است که مصرف ۴ لیتر آن مرگ زا خواهد بود.

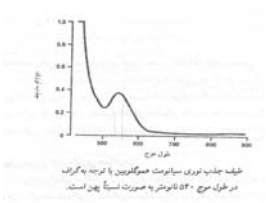
مشخصات معرف

- شفاف و زرد رنگ
- زمان لازم برای ایجاد واکنش ۵ دقیقه یا کمتر
- دترژانها لیز گلبول های قرمزورسوب پروتئین ها و غشاء گلبولهای قرمز و لیپوپروتئین ها را افزایش می دهند.
- در طول موج ۵۴۰نانومتر در مقابل DWجذب نوری ندارد.
- PH=7-7.4 و کنرل ماهانه آن
- در صورت کدورت دور ریخته شود.
- چند ماه پایدار است ولي بهتر است هرماه بصورت تازه تهیه شود.
- در ظروف شیشه ای رنگی و دور از آفتاب و در RT
- در صورت انجماد، کدورت و تغییر PH باید اوت شود

- ابتدا ۲۰لااندا خون با ۵سی سی خون مخلوط و ۳دقیقه در RT انکوبه می شود.(۱/۲۵۱)
- آهن همه هموگلوبین ها بجز SHb توسط فری سیانید پتاسیم ($K_3Fe(CN)_6$)اکسیده می شود وهمی گلوبین یا مت هموگلوبین Hi تشکیل می شود.
- سپس همی گلوبین توسط سیانید پتاسیم(KCN) تبدیل به همی گلوبین سیانید یا سیانومت هموگلوبین می شود.
- واکنش در حرارت اتاق
- زمان لازم برای ایجاد واکنش ۵ دقیقه یا کمتر به شرط استفاده از نمک مونوپتاسیم بی آب KH_2PO_4 با وزن مولکولی ۱۳/۱۳۶است که با کاهش PH باعث افزایشسرعت واکنش می شود.

Hb(g/dl)=OD540TxCONstd X 251/Odstd X1000

- سرعت تبدیل کربوکسی هموگلوبین به سیانومت هموگلوبین در مقایسه به بقیه کمتر بوده و گاهی در افراد سیگاری با ۲۰٪ کربوکسی هموگلوبین به دلیل جذب بیشتر در 540nm باعث افزایش کاذب Hb میشود.



طیف جذب نوری سیانومت هموگلوبین با ترجمه به گزارش در طول موج ۵۴۰ نانومتر به صورت نسبتاً پهن است.

مواد؛ وسایل وتجهیزات

- کلیه وسایل شیشه ای مثل پی پتها ولوله ها استاندارد وکالیبره
- از لحاظ شیمیایی تمیز باشند.
- اسپکتروفتومتر کالیبره
- استانداردهموگلوبین تازه تجاری و پایدار
- بهتر است با توجه به رقتهای ۲ و۳ و۴ استاندارد، نمودار OD بر هموگلوبین آن از قبل ترسیم شود که نموداری خطی خواهد بود

Sampling

- K2EDTA or Na2EDTA(1.5-2.2mg/ml blood)
- K3EDTA
- Fresh sample
- Solution of sample &Reagent is stable until 3h

روش آزمایش

- غلظت هموگلوبین نمونه با استفاده از جذب نوری نمونه در طول موج ۵۴۰ نانومتر در مقابل بلانک با کمک جذب نوری و غلظت استانداردو یا با کمک منحنی استاندارد محاسبه میشود.
- $test_{con}\ g\% = T_{OD} x St_{con} / St_{OD}$
- واحد اندازه گیری گرم در لیتر
- $Hb\ g/dl = St_{con}\ mg\% (251/1000)$

Reference Method

Macrodilution and micro dilution

- ۱۰۰میکرولیتر خون با ۲۵ میلی لیتر معرف
- ۲۰میکرو لیتر خون با ۵ میلی لیتر معرف ۱به۲۵۱

خطا ها

- خطا های نمونه گیری
- خطا های روش انجام آزمایش
- خطا های مربوط به مواد و تجهیزات کالیبره نشده
- خطا های آزمایشگر

تداخلات

- proteinemia (MM,WM,CID)
- Lipemia and Lipoproteinemia
- WBC>$50\times10^{9/L}$ and Plt>$700\times10^{9/L}$
- Hb S,C, target cells, Agg (lysing resistant)
- Hemolysis

Psedo elevation of Hb,MCH,MCHC

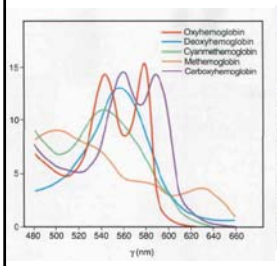


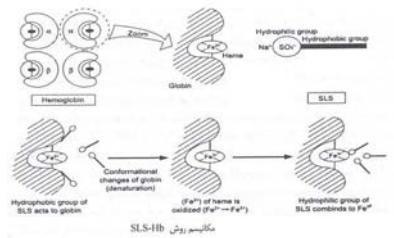
Table 29–1 Nomenclature and Absorption Maxima of Hemoglobins

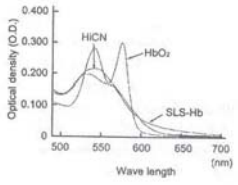
Term	Symbol	Absorption peak 1 λ	Absorption peak 1 ε	Absorption peak 2 λ	Absorption peak 2 ε	Absorption peak 3 λ	Absorption peak 3 ε
Hemoglobin	Hb	431	(140)	555	(13.04)		
Oxyhemoglobin	HbO_2	415	(131)	542	(14.37)	577	(15.37)
Carboxyhemoglobin	HbCO	420	(192)	539	(14.36)	568.5	(14.31)
Hemiglobin (methemoglobin)	Hi	406	(162)	500	(9.04)	630	(3.70)
Hemiglobincyanide (cyanmet Hb)	HiCN	421	(122.5)	540	(10.99)		

The wavelength (λ) in nanometers for each maximum is followed by the extinction coefficient (ε) placed in parentheses.
After van Assendelft OW, 1970.

- در سال ۱۹۶۶ توسط ICSH به دلیل ثبات و پایداری معرفهایش به عنوان روش انتخابی اندازه گیری Hb معرفی شد.
- در سال ۱۹۶۸ سازمان WHO نیز آن را به عنوان روش مرجع معرفی نمود.
- معرف استروماتولایزرC سیسمکس براین اساس کار میکند.
- باید دفع آن در فاضلاب جاری صورت بگیرد و خطرات زیست محیطی نیز دارد.
- لذا روشهای فاقد سیانید مثل روش اکسی هموگلوبین و روشهای SDS و SLS ابداع شد.

- در روش HbO2 هموگلوبین به محض رهایی از سلول به اکسی هموگلوبین تبدیل میشود که دارای ماکزیمم جذب در ۵۴۲ و ۵۷۷ نانومتر است و در نتیجه به طور اختصاصی سنجش میشود.
- محلول RHEMOX-XB سیسمکس بر این اساس کار می کند و قدرت لیزانت بالایی حتی برعلیه لکوسیتها دارد و لذا با لیز آنها لکوسیتوز تاثیری بر مقدار Hb نخواهد داشت.





SLS-Hb

- سدیم لوریل سولفات C12H25SO4Naیک سورفاکتانت آنیونی است که گروه لوریل آن قدرت اتصال به پروتئین را داشته و پایدار و غیرسمی است.
- بدون نیاز به اکسیداسیون قدرت اتصال به هموگلوبین را دارد و واکنش آن ۱۰ثانیه طول میکشد.
- معرف سولفولایزر سیسمکس براین اساس کار میکند که هم لایزر است و هم عامل سنجش هموگلوبین .
- طی ۴ مرحله میتواند همه انواع هموگلوبین را بسنجد و حداقل اثرات تداخلی را دارد.
- ۱-ابتدا با اتصال هیدروفوبی و یونی به غشا متصل و سپس با تغییر در ساختارهای پروتئینی و حل فسفاتیدهای غشاء باعث لیز RBC میشود.
- ۲- سپس با اتصال به گلوبین باعث تغییر فضایی در آن میشود.
- ۳- این تغییر باعث اکسید شدن آهن و تبدیل آن به مت هموگلوبین میشود.
- ۴- در مرحله آخر با اتصال گروه هیدروفیل SLS به آهن سه ظرفیتی فرم پایدار SLS-Hb تشکیل میشود که یک مشتق رنگی همی گلوبینی بوده و ماکزیمم جذب آن در ۵۳۵ نانومتر است و در کنار آن پیک کوتاهی در ۵۶۰ دارد.
- پایداری دایمر حدود۱/۵ ساعت است و لی دستگاه در عرض ۱۵ ثانیه آن را می شمارد.

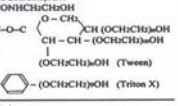
- **سورفاکتانتها**
- ۴دسته سورفاکتانت وجود دارد که آنیونی، کاتیونی، آمفوتریک و غیریونی هستند و از ترکیب آنها هزاران نوع محلول ساخته شده است.
- دارای قدرت پاک کنندگی، لیزانت،کاهش کشش سطحی، ضد میکروبی، حلالیت، انتشار، امولیسه کردن، رسوب پروتئینها و غشا گلبولها و از هم پاشیدن شبح های سلولی را داشته و مانع از تشکیل حباب در کاپیلاریها میشود.
- اغلب در ترکیب با لیزانت ها هستند.
- انواع کاتیونیک با اتصال الکترواستاتیک به غشا منفی و حل فسفولیپید غشاء باعث نفوذ در غشاء جداکردن پروتئین غشا و لیز RBC میشود. ۱۰برابر انواع آنیونیک
- انواع آنیونی دارای زنجیره ۸ آلکیلی یا بیشتر هستند که قدرت لیز دارند. این مواد به دلیل قدرت کاهش کشش سطحی قوی بر شارژ منفی RBCها غلبه کرده و به غشا و پروتئینهای آن متصل می شوند و با تغییر ساختار آنها باعث لیز میشوند.
- انواع غیریونی مثل تریتون X-100 نیز وجود دارند که حاوی گروههای هیدروفیل کوچک بوده و با نفوذ به غشاء باعث لیز آنها میشوند.
- در دستگاههای 3PART مثل سیسمکس معمولی از محلولهای با لیز متوسط مثل استروماتولایزر 3WP و در کولتر S-plusIV از محلول LyseIIdiffاستفاده میشود ولی در کانال RBC/PLTاز لیزانتهای با قدرت بالا استفاده میشود.
- در کانال بازوفیل H1، در دستگاههای امپدانس 5PARTو در دستگاههای 6,7PART از سورفاکتانت غیریونی با ph برابر با۱/۹ اسیدی به همراه اسید فتالیک استفاده میشود که محلول لوبولاریتی نام داشته و دارای قدرت لیز با تاخیر زمانی برای لکوسیتها بوده و به ترتیب باعث لیز M<L<Eo<N می شود و بازوفیل با مقاومت در برابر آن به طور مجزا شمارش می شود.
- به این محلول در کولتر ATC 5diff WBC Lyseمیگویند.
- محلول مشابهی نیز برای اثوزینوفیل وجود دارد. سلولهای باقی مانده با اساس امپدانس شمارش و از تعداد گرانولوسیتها کم می شوند.

محلولها

- ۳ نوع هستند: ایزوتونها لیزانتها سورفاکتانتها

- **ایزوتونها**
- مایع ایزوتون مثل CELL PACK سیسمکس حاوی گلوکوز، کلرور سدیم، تترابورات سدیم، فسفاد دی سدیم، اسید بورات، K2EDTA و سدیم آزاید است.
- دمای بالا باعث کاهش رسانایی آن میشود.
- ترکیب نمکی، قدرت یونی، PH، قابلیت نفوذ، سمیت، فشاراسمزی، مواد آنتی سپتیک و نگهدارنده، آلودگی زیست محیطی، ایمنی بیولوژیک و قدرت فیکساتیوی آنها مختلف و مهم است.
- ایزوتون H1 حاوی SDSبوده و همه گلبولها را به شکل کروی در می آورد.
- این مواد باعث حفظ شکل و ساختار و اندازه و استحکام سلول میشود.

- **لیزانتها**
- قدرت لیزانتها باید خیلی زیاد نباشد تا حتی لکوسیتها را لیز کامل کند یا به سلولهای ریز تبدیل کند.
- Fسلها و سلولهای بیماریهای یرقان، MDS، هموگلوبینوپاتیهای S,D,C به لیز مقاوم هستند و باید قدرت یا زمان لیز را بالا برد.
- قدیمی ترین آنها مشتق گیاهی ساپونین بودکه قدرت و انواع متغیری داشت و جای خود را به سورفاکتانتها داد.
- باعث تغییر فشار اسمزی، کاهش کشش سطحی، انحلال و تخریب ساختارهای غشایی، واکنشهای فیزیکوشیمیایی متقابل و لیز سلولها میشوند.

Group	Structure
Anionic	$R.COO^-Na^+$ $ROSO_3^-Na^+$ $R_1OCO-CH_2$ $\vert$ (Aerosol) $R_2OCO-CH-SO_3^-Na^+$
Cationic	$RN^+(R_1R_2H)X^-$ $RN^+(R_1R_2R_3)X^-$ $C_2H_5OOC-CH-(CH_2)_3-N=N^+H_2X^-$ $\vert$ $\vert$ NHCOR NH_2
Amphoteric	$RCONHCH_2CH_2SO_3^-Na^+$ $R-CH-COOH$ $\vert$ $N(CH_3)_2$
Nonionic	$R(OCH_2CH_2)_nOH$ $RCONHCH_2CH_2OH$  (Tween) (Triton X)

R, R1, R2, R3 : Alkyl
X : Halogen

چهار گروه اصلی سورفکتانت‌ها و ساختارهای مولکولی این گروه‌ها

Table 2.3 Haematological values for normal infants (amalgamation of data derived from various sources; expressed as mean ±2SD or 95% Range)*

	Birth	Day 3	Day 7	Day 14	1 Month	2 Months	3–6 Months
Red blood cell count (RBC) × 10^{12}/l	6.0 ± 1.0	5.3 ± 1.3	5.1±1.2	4.9±1.3	4.2 ± 1.2	3.7 ± 0.6	4.7 ± 0.6
Haemoglobin g/l	180 ± 40	80 ± 30	175±4	165±4	140 ± 25	112 ± 18	126 ± 15
Packed cell volume (PCV) l/l	0.60 ± 0.15	0.56 ± 0.11	0.54 ± 0.12	0.51 ± 0.2	0.43 ± 0.10	0.35 ± 0.07	0.35 ± 0.05
Mean cell volume (MCV) fl	110 ± 10	105 ± 13	107 ± 19	105 ± 19	104 ± 12	95 ± 8	76 ± 8
Mean cell Hb (MCH) pg	34 ± 3	34 ± 3	34 ± 3	34 ± 3	33 ± 3	30 ± 3	27 ± 3
Mean cell Hb conc (MCHC) g/l	330 ± 30	330 ± 40	330 ± 50	330 ± 50	330 ± 40	320 ± 35	330 ± 30
Reticulocytes × 10^9/l	120–400	50–350	50–100	50–100	20–60	30–50	40–100
White blood cell count (WBC) × 10^9/l	18 ± 8	15 ± 8	14 ± 8	14 ± 8	12 ± 7	10 ± 5	12 ± 6
Neutrophils × 10^9/l	4–14	3–5	3–6	3–7	3–9	1–5	1–6
Lymphocytes × 10^9/l	3–8	2–8	3–9	3–9	3–16	4–10	4–12
Monocytes × 10^9/l	0.5–2.0	0.5–1.0	0.1–1.7	0.1–1.7	0.3–1.0	0.4–1.2	0.2–1.2
Eosinophils × 10^9/l	0.1–1.0	0.1–2.0	0.1–0.8	0.1–0.9	0.2–1.0	0.1–1.0	0.1–1.0
Lymphocyte subsets (× 10^9/l)**							
CD3		3.1–5.6				2.4–6.5	2.0–5.3
CD4		2.2–4.3				1.4–5.6	1.5–3.2
CD8		0.9–1.8				0.7–2.5	0.5–1.6
CD4/CD8 ratio		1.1–4.5				1.1–4.4	1.1–4.2
Platelets × 10^9/l	100–450	210–500	160–500	170–500	200–500	210–650	200–550

*There have been some reports of WBC and platelet counts being lower in venous blood than in capillary blood samples, although still within these reference ranges. In one study venous blood from a newborn gave lower values for haemoglobin, RBC, and WBC than capillary blood but gave higher values for platelets and lymphocytes.[30]
**Approximations because wide variations have been reported in different studies.

Table 2.4 Haematological values for normal children (amalgamation of data derived from various sources; expressed as mean ±2SD or 95% Range)

	1 Year	2–6 Years	6–12 Years
Red cell count × 10^{12}/l	4.5 ± 0.6	4.6 ± 0.6	4.6 ± 0.6
Haemoglobin g/l	126 ± 15	125 ± 15	135 ± 20
Packed cell volume (PCV) l/l	0.34 ± 0.04	0.37 ± 0.03	0.40 ± 0.05
Mean cell volume (MCV) fl	78 ± 6	81 ± 6	86 ± 9
Mean cell Hb (MCH) pg	27 ± 2	27 ± 3	29 ± 4
Mean cell Hb conc (MCHC) g/l	340 ± 20	340 ± 30	340 ± 30
Reticulocytes × 10^9/l	30–100	30–100	30–100
White cell count × 10^9/l	11 ± 5	10 ± 5	9 ± 4
Neutrophils × 10^9/l	1–7	1.5–8	2–8
Lymphocytes × 10^9/l	3.5–11	6–9	1–5
Monocytes × 10^9/l	0.2–1.0	0.2–1.0	0.2–1.0
Eosinophils × 10^9/l	0.1–1.0	0.1–1.0	0.1–1.0
Lymphocyte subsets (x10^9/l)*			
CD3	1.5–5.4	1.6–4.2	0.9–2.5
CD4	1.0–3.6	0.9–2.9	0.5–1.5
CD8	0.6–2.2	0.6–2.0	0.4–1.2
CD4/CD8 ratio	1.0–3.0	0.9–2.7	1.0–3.0
Platelets × 10^9/l	200–550	200–490	170–450

*Approximations because wide variations have been reported in different studies.

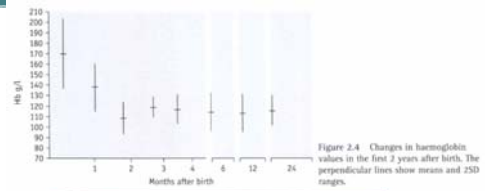


Figure 2.4 Changes in haemoglobin values in the first 2 years after birth. The perpendicular lines show means and 2SD ranges.

Table 2.5 Haemoglobin values in pregnancy

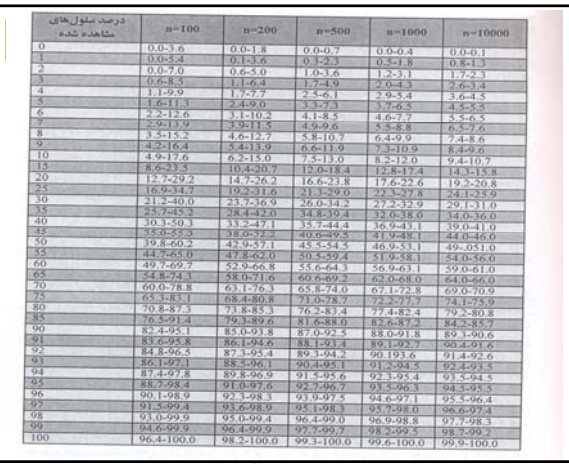
1st trimester	124–135 g/l
2nd trimester	110–117 g/l
3rd trimester	106–109 g/l*
Mean values postpartum	
Day 2	104 g/l
Week 1	107 g/l
Week 3	116 g/l
Month 2	119 g/l

*Normal values (120 g/l or higher) may be found when supplementary iron is being given.

Blood Cell Counting

Leukocyte Counting By Manual method

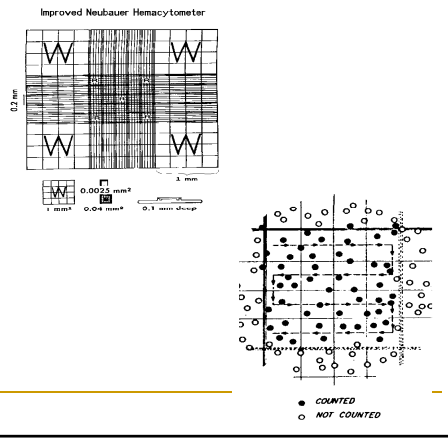
- عدم دقت این روش ۵/۶٪ که در موارد لکوپنی به ۱۵٪ میرسد.
- NRBCها نیز شمارش میشوند.
- از خون حاوی EDTA استفاده میشود.
- مایع رقیق کننده اسید استیک ۲٪ یا محلول تورک(رقت ۲۰/۱) گلبولهای قرمز را لیز میکند.
- در موارد لکوسیتوز رقت ۱۰۰/۱ یا ۲۰۰/۱
- در موارد لکوپنی رقت ۱۰/۱



درصد سلول‌های مشاهده شده	n=100	n=200	n=500	n=1000	n=10000
0	0.0-3.6	0.0-1.8	0.0-0.7	0.0-0.4	0.0-0.1
1	0.0-5.4	0.1-3.6	0.3-2.1	0.5-1.8	0.8-1.3
2	0.0-7.0	0.6-5.0	1.0-3.6	1.2-3.1	1.7-2.3
3	0.6-8.5	1.1-6.4	1.7-4.9	2.0-4.3	2.6-3.4
4	1.1-9.9	1.7-7.7	2.5-6.1	2.9-5.4	3.6-4.5
5	1.6-11.3	2.4-9.0	3.3-7.3	3.7-6.5	4.5-5.5
6	2.2-12.6	3.1-10.2	4.1-8.5	4.6-7.7	5.5-6.5
7	2.9-13.9	3.9-11.5	4.9-9.6	5.5-8.8	6.5-7.6
8	3.5-15.2	4.6-12.7	5.8-10.7	6.4-9.9	7.4-8.6
9	4.2-16.4	5.4-13.9	6.6-11.9	7.3-10.9	8.4-9.6
10	4.9-17.6	6.2-15.0	7.5-13.0	8.2-12.0	9.4-10.7
15	8.6-23.5	10.4-20.7	12.0-18.4	12.8-17.4	14.3-15.8
20	12.7-29.2	14.7-26.2	16.6-23.8	17.6-22.6	19.2-20.8
25	16.9-34.7	19.2-31.6	21.3-29.0	22.3-27.8	24.1-25.9
30	21.2-40.0	23.7-36.9	26.0-34.2	27.2-32.9	29.1-31.0
35	25.7-45.2	28.4-42.0	34.8-39.4	32.0-38.0	34.0-36.0
40	30.3-50.3	33.2-47.1	35.7-44.4	36.9-43.1	39.0-41.0
45	35.0-55.3	38.0-52.2	40.6-49.5	41.9-48.1	44.0-46.0
50	39.8-60.2	42.9-57.1	45.5-54.5	46.9-53.1	49.-051.0
55	44.7-65.0	47.8-62.0	50.5-59.4	51.9-58.1	54.0-56.0
60	49.7-69.7	52.9-66.8	55.6-64.3	56.9-63.1	59.0-61.0
65	54.8-74.3	58.0-71.6	60.6-69.2	62.0-68.0	64.0-66.0
70	60.0-78.8	63.1-76.3	65.8-74.0	67.1-72.8	69.0-70.9
75	65.3-83.1	68.4-80.8	71.0-78.7	72.2-77.7	74.1-75.9
80	70.8-87.3	73.8-85.3	76.2-83.4	77.4-82.4	79.2-80.8
85	76.5-91.4	79.3-89.6	81.6-88.0	82.6-87.2	84.2-85.7
90	82.4-95.1	85.0-93.8	87.0-92.5	88.0-91.8	89.3-90.6
91	83.6-95.8	86.1-94.6	88.1-93.4	89.1-92.7	90.4-91.6
92	84.8-96.5	87.3-95.4	89.3-94.2	90.193.6	91.4-92.6
93	86.1-97.1	88.5-96.1	90.4-95.1	91.2-94.5	92.4-93.5
94	87.4-97.8	89.8-96.9	91.5-95.6	92.3-95.4	93.5-94.5
95	88.2-98.4	91.0-97.6	92.7-96.7	93.5-96.3	94.5-93.5
96	90.1-98.9	92.3-98.3	93.9-97.5	94.6-97.1	95.5-96.4
97	91.5-99.4	93.6-98.9	95.1-98.3	95.7-98.0	96.6-97.4
98	93.0-99.9	95.0-99.4	96.4-99.0	96.9-98.8	97.7-98.3
99	94.6-99.9	96.4-99.9	97.7-99.7	98.2-99.5	98.7-99.2
100	96.4-100.0	98.2-100.0	99.3-100.0	99.6-100.0	99.9-100.0

•منابع خطا

- مخلوط نکردن به میزان کافی
- خطای آزمایش کننده
- خطای ناشی از وسایل
- خطای میدان دید
- هر چه تعداد سلولهای شمارش شده بیشتر باشد میزان خطا کمتر میشود.



Platelet counting By Manual Method

- عدم دقت این روش وقتی که حداقل ۱۰۰سلول شمارش شود ۱۱٪ واگر ۴۰ پلاکت شمارش شود ۱۵٪
- به دلیل تمایل پلاکتها به چسبیدن به یکدیگر؛جسم خارجی و شیشه، شمارش مشکل می باشد.
- نمونه: خون وریدی(نه مویرگی) حاوی ضد انعقاد EDTA
- در صورت پلاکت اقماری یا اتواگرگاسیون ناشی از EDTA از سیترات و اگزالات استفاده میشود.
- محلول رقیق کننده اگزالات آمونیوم ۱٪ با آب مقطر با قدرت لیز بالای RBC حاوی مقدار اندکی رنگ برلیان کریزل بلو

منابع خطا

- جمع آوری نمونه
- تهیه رقیق کننده (فاقد ذرات خارجی مزاحم)
- تکنیک رقیق سازی
- پاکیزه نبودن لام

روش انتخابی شمارش پلاکتها استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست می باشد

PCV نسبت حجم گلبولهای قرمز به حجم خون کامل میباشد.

- بدون احتساب بافی کوت
- با اصلاح پلاسمای بدام افتاده

.

Procedure For Determining Packed Cell Volume By Microhematocrit Method

اصول آزمایش

- نگهداری نمونه در دمای° ۲۶-۱۸
- آزمایش حد اکثر ۶ ساعت پس از نمونه گیری انجام شود.
- خطای قابل قبول دراین روش ۱٪ ± میباشد.
- انجام آزمایش بصورت دو تایی

اصول آزمایش

- خونگیری مویرگی؛ وریدی وشریانی
- K2EDTA ضد انعقاد مناسب جهت کالیبراسیون
- K3EDTAبه علت ایجاد چروکیدگی در گلبول های قرمز MCV را ۲٪ و هماتوکریت را ۳٪کاهش و MCHC را به همین میزان افزایش میدهد.
- افزایش نسبتEDTA نیز باعث چروکیدگی و کاهش کاذب هماتوکریت میشود

مشخصات دستگاه میکروسانتریفوژ

- شعاع چرخش بیشتر از ۸سانتیمتر
- در عرض ۳۰ ثانیه به حداکثر سرعت برسد
- RCF حدود ۱۰-۱۵ هزار g در محیط بمدت حداقل ۵ دقیقه بدون افزایش دما از ۴۵ درجه (برای نمونه پلی سایتمی ۸ دقیقه)
- دارای زمان سنج اتوماتیک (با قابلیت تنظیم حداقل ۳۰ثانیه)

مشخصات لوله

- جنس از شیشه مخصوص
- طول لوله ۰/۵± ۷۵میلیمتر
- ضخامت جداره ۲/۰ میلیمتر
- قطر داخلی ۱/۲۲ mm
- دارای باند آبی در یک انتها
- RCF=Relative Centrifugal Field
- RPM=Relative Per Minute
- RCF=0.00001118 × r × N

میانگین ودامنه مرجع

- مردان (۰.۵۴-۰.۴)۰.۴۷
- زنان (۰.۴۷-۰.۳۷)۰.۴۲

روش آزمایش

- ۱۵۰ میکرولیتر خون
- ۶۰-۵۵ میلی متر ازطول لوله باخون پرشود.
- طول خمیر مسدود کننده کمتراز ۴ میلیمتر نباشد.
- نمونه ها بصورت مضاعف آزمایش شوند.
- نتایج حداکثر پس از ۱۰دقیقه خوانده شوند.
- تفاوت نمونه های مضاعف از ۰/۰۵بیشتر نباشد.

- افزایش کاذب HCt,MCV و کاهش کاذب MCHC:
- هیپرناترمی، اورمی ودیابت
- بدام افتادن پلاسما
- میکروسیتوز، اسفروسیتوز و سلول داسی
- ماندن خون و تورم سلولها (6fl طی ۲۴ ساعت)

- کاهش کاذب:
- ضد انعقاد اضافی و نوع k3
- همولیز
- هیپوناترمی

منابع خطا

- خطاهای نمونه گیری
- خطاهای لوله
- خطای خواندن
- خطای بدام افتادن پلاسما

روش غیر مستقیم بررسی کالیبراسیون

- چند نمونه خون با PCVکمتر از ۵/۰ و حاوی ضدانعقاد (K2EDTA) را پس از بیست بار سروته نمودن به صورت دوتایی به مدت ۳ ، ۵ ، ۷، ۹ و ۱۱ دقیقه سانتریفوژ کرده و نتایج ثبت می گردد که در صورت مناسب بودن توان دستگاه (g) نتایج حاصله از دقیقه ۵ به بعد می بایست بدون تغییر باقی بماند .

کالیبراسیون و کنترل کیفی دستگاه میکروهماتوکریت

۱-بررسی سرعت
۲-بررسی زمان سنج
۳-بررسی صحت ابزار خوانش