مهندس درخشان نیا

# مقدمات، آشنایی، اصول فنی و کنترل کیفی سل کانتر

**به جرات می توان گفت که خون اولین بافتی است که توسط بشر مورد توجه، بررسی و تحقیق قرار گرفته است. از حدود سال ۱۹٦٦ مشخص شد که خون از دو قسمت تشکیل شده است و حاوی سلول ها و مایعی است که به طور منظم و یک طرفه در سیستم چرخش بسته ای در جریان است و توسط انقباضات ریتمیک قلب به جلو رانده می شود.**

- **مایع شفاف متمایل به زرد و نسبتاً چسبناکی که به هنگام سانتریفوژ خون در سطح قرار می گیرد و سرم خون نامیده می شود این جزء خون آبکی و حاوی بیش از ۹۰ درصد آب است. مواد محلول در آن هم از نظر تنوع و هم از نظر مقدار بسیار متفاوتندکه اعمال مختلفی را به عهده دارند.**
- **قسمت سلولی که حدود ٤٥ تا ٥٥ درصد از حجم کل خون را شامل شده و دارای سلول های خونی است. سلول های خونی نه تنها از نظر فعالیت های فیزیولوژیک بلکه از نظر شکل، اندازه، رنگ، همچنین خصوصیات متابولیسم با یکدیگر تفاوت هایی دارند.**

سلول های خونی به دو لایه تفکیک می شود که با سانتریفوژ به راحتی از یکدیگر قابل تشخیص اند. لایه زیرین که ٤٢ تا ٤٧ درصد حجم کل خون را تشکیل می دهد قرمز رنگ بوده و شامل گلبول های قرمز یا اریتروسیت ها است. لایه ای که بلافاصله روی آن قرار دارد و ۱ درصد حجم خون را به خود اختصاص می دهد و به رنگ سفید یا متمایل به خاکستری دیده شده و پوشش لیفی نام دارد که از گلبول های سفید یا لکوسیت ها تشکیل می شود. لایه نازکی از پلاکت ها که با چشم غیر مسلح قابل تشخیص نیست لکوسیت ها را می پوشاند.

گلبول های قرمز خون فاقد هسته و ارگانل های داخل سلولی بوده و حاوی پروتئین حامل اکسیژن یعنی هموگلوبین هستند که در شرایط طبیعی این سلول ها هرگز سیستم گردش خون را ترک نمی کنند. کاملاً انعطاف پذیرند و این خاصیت به آن اجازه می دهد تا خود را با شکل غیر منظم و قطر کوچک مویرگ ها تطابق دهد. مهم ترین وظیفه فیزیولوژیک گلبول قرمز انتقال اکسیژن از ریه به بافت ها و دفع $CO_2$ از بافت ها به ریه بوده و در نقل و انتقال اکسیژن نقش عمده ای را ایفا می نمایند. این سلول ها فاقد توانایی بیوسنتز مواد بوده و تشکیلات آنها در طول حیات غیرقابل ترمیم و جایگزینی است. تعداد طبیعی اریتروسیت ها در خون زنان حدود ۳/۹ تا ۵/۵ میلیون در هر میکرولیتر و در خون مردان ٤/۱ تا ٦ میلیون در هر میکرولیتر است.

گلبول های سفید یا لکوسیت ها، عملکردهای متنوعی در بدن دارد که یکی از اساسی ترین آنها سدهای دفاعی در برابر عفونت ها است و از طریق گردش خون در سراسر بدن گردش کرده و در موارد نیاز فعال شده و از دیواره عروق نفوذ کرده و قابلیت های دفاعی از خود نشان می دهند. لکوسیت ها یا سلول های سفید خون بر اساس نوع گرانول های موجود در سیتوپلاسم و شکل هسته به دو گروهِ گرانولوسیت ها و آگرانولوسیت ها تقسیم می شود. هم گرانولوسیت ها و هم آگرانولوسیت ها هنگامی که در پلاسمای خون معلق اند کروی شکل هستند. گرانولوسیت ها دو نوع گرانول دارند: گرانول های اختصاصی که به اجزای خنثی، قلیایی یا اسیدی متصل می شود و عملکرد های اختصاصی دارد و گرانول های آزوروفیل که به رنگ ارغوانی بوده و لیزوزوم هستند. هسته گرانولوسیت دو یا تعداد بیشتری لوب دارد. گرانولوسیت ها شامل نوتروفیل ها، ائوزینوفیل ها، و بازوفیل ها هستند. کلیه گرانولوسیت ها سلول های انتهایی غیر تقسیم شونده با طول عمری در حد چند روز هستند. آگرانولوسیت ها گرانول های اختصاصی ندارند ولی حاوی گرانول های آزوروفیل (لیزوزوم) هستند. هسته آنها گرد یا دندانه دار است. این گروه شامل لنفوسیت ها و منوسیت ها است. تعداد لکوسیت ها در خون بر حسب سن، جنس و شرایط فیزیولوژیک متغیر است در بالغان طبیعی تقریباً شش هزار تا ده هزار لکوسیت در میکرولیتر خون وجود دارد.

بنابراین خون یک بافت ثابت نیست بلکه یک مجموعه است. مصرف کننده خون یا همان بیمار، در موارد بسیار استثنایی به کل خون نیازمند است و بیشتر به سلولی خاص یا پروتئینی با کاربری ویژه احتیاج دارد. در صورت تجویز خون کامل، شاید به نوعی مشکل وی حل گردد ولی مطمئناً بدلیل سرباری بیش از حد مواد و سلول های غیرضروری، مشکلات زیادی برای بیمار ایجاد خواهد شد. به همین دلیل در سازمان های انتقال خون در سرتاسر جهان، بخشی به نام بخش تولید فراورده های سلولی و پلاسمایی وجود دارد که سلول های زنده خون را از

پلاسما جدا کرده و هر قسمت را به صورت جداگانه برای مصرف آماده می کنند.

یکی از آزمایش های معمول در آزمایشگاه های پزشکی، شمارش سلول های خون است. در گذشته از روش های دستی جهت شمارش سلول های خونی استفاده می شد، اما به دلیل آنکه این روش ها بسیار وقت گیر بوده و از دقت کمی نیز برخورداراست، محققان پس از سال ها تلاش توانستند دستگاه های شمارنده سلول های خونی یا همان سل کانتر را عرضه دارند که این دستگاه ها امروزه به صورت گسترده ای در جهان مورد استفاده قرار می گیرد. مزیت استفاده از این دستگاه، دقت و سرعت عمل آنها است. اما توجه به این نکته ضروری است که عدم اجرای کالیبراسیون صحیح و عدم بررسی کنترل کیفی این سیستم ها سبب محاسبات نادرست و ارائه نتایج نادرست و تشخیص اشتباه خواهند شد. مسئول آزمایشگاه موظف است با توجه به تعداد مراجعان ، تعداد و نوع تجهیزات، روش های آزمایشگاهی به کار رفته، تعداد کارکنان و...، با روش های مختلف ازجمله آموزش کارکنان ، استفاده از روش های استاندارد آزمایشگاهی و انتخاب روش های مناسب کنترل کیفیت از درست بودن نتایج اطمینان حاصل کنند.

## اساس کار و اصول عملکرد سل کانترها

اساس کار سل کانترها معمولا بر پایه یکی از اصول زیر است:

- اصل مقاومت الکتریکی – Impedance Electrical
- به کارگیر مجموعه ای از قوانین فیزیک نور
- فلوسایتومتری
- استفاده از آنزیم های سیتوشیمیایی یا واکنش سیتوشیمی به منظور شناسایی سلول ها

## روش مقاومت الکتریکی

امپدانس الکتریکی یا امپدانس روزنه ای از روش های بسیار رایج در سل کانترها است. این روش اولین بار توسط والاس کولتر در سال ۱۹۵٦ مطرح شد. سلول های خونی در برابر امواج مستقیم الکتریسیته به عنوان عایق بیولوژیک عمل می کنند. برای شمارش سلول های خونی، آنالیزور، در ابتدا خون را در چمبر– chamber شمارش، با محلول ایزوتون که هادی جریان الکتریسیته است، رقیق می کند. در داخل چمبر شمارش، لوله ای استوانه ای قرار دارد که از طریق یک روزنه با چمبر شمارش در ارتباط است. بین الکترود خارجی در چمبر و الکترود داخلی در لوله استوانه ای، یک جریان الکتریکی پیوسته با فرکانس پایین از طریق روزنه برقرار است. با نیروی مکش (خلاء) حجم خاصی از سوسپانسیون سلولی از چمبر شمارش به داخل لوله استوانه ای از طریق روزنه کشیده می شود. هر سلول در هنگام عبور از منطقه حساس شمارش )روزنه)، ایجاد مقاومت الکتریکی متناسب با حجم و اندازه خود می کند که به اصطلاح پالس یا نبض نامیده می شود. ارتفاع پالس متناسب با حجم سلول و تعداد آن نشان دهنده تعداد سلول هاست.

آنالیزور برای شمارش گلبول های سفید، ابتدا نمونه خون را رقیق کرده و به آن معرف Lysing اضافه می کند. لیزینگ گلبول های قرمز را لیز کرده، از محیط شمارش خارج می کند و همچنین هموگلوبین را به سیانومت هموگلوبین تبدیل می کند که با روش اسپکتروفتومتری توسط آنالیزور اندازه گیری می شود. شمارش گلبول های قرمز و پلاکت ها در محفظه جداگانه ای صورت می گیرد. نمونه خون با ایزوتون، رقیق شده و وارد چمبر می شود. در این مورد، رقیق سازی بسیار بیشتر از رقیق سازی گلبول های سفید است.

پالس های ایجاد شده برمبنای ارتفاع و دامنه پالس دسته بندی شده و به صورت نمودار یا هیستوگرام ترسیم می شوند. در چمبر RBC/PLT، پالس های زیر ۲ فمتولیتر <۲fL، به عنوان آشغال، پالس های ۲۰–۲ fL به عنوان پلاکت و پالس های ۳٦۰–۳٦ fL به عنوان گلبول قرمز در نظر گرفته می شود. در چمبر WBC/Hb، پالس های ۹۰–۳۵ fL به عنوان لنفوسیت، پالس های ۱٦۰–۹۰ fL به عنوان سلول های مخلوط (Mixed Cell) و پالس های ٤۵۰–۱٦۰ fL به عنوان سلول های بزرگ یا نوتروفیل قلمداد می شود (جدول۱) .

لازم به ذکر است که گلبول های سفید در حجم واقعی خود مورد آنالیز و شمارش قرار نمی گیرند، بلکه محلول لیز کننده ضمن حذف گلبول های قرمز، منفذهایی را نیز بر روی غشاء گلبول های سفید ایجاد کرده و موجب مچاله شدن غشاء بر روی هسته و کاهش اندازه سلول شود.

| نوع سلول | اندازه واقعی در خون (fL) | اندازه در سیستم امپدانسی(fL) |
|---|---|---|
| لنفوسیت | ۱۹۵–۱٤۰ | ۹۰–۳۵ |
| منوسیت | ۳۵۰–۳۰۰ | ۱۵۰–۹۰ |
| نوتروفیل | ۲۹۰–۲٤۵ | ٤۵۰–۱۵۰ |
| ائوزینوفیل | ۲۹۰–۲٤۰ | ۱۵۰–۹۰ |
| بازوفیل | ۲۹۰–۲٤۰ | ۱۵۰–۹۰ |
| سلول های غیرطبیعی | متغیر | متغیر |

جدول۱: مقایسه اندازه واقعی لکوسیت های خون و اندازه آنها در کانال لکوسیتی آنالیزورهای امپدانسی به دنبال لیز نسبی

در سل کانترها، هماتوکریت به طور غیرمستقیم و از حاصل ضرب MCV یا حجم متوسط گلبول های قرمز در میزان RBC به دست می آید.

$$MCV=\frac{HCT}{RBC}\times 10$$

$$MCH=\frac{Hb}{RBC}\times 10$$

$$MCHC=\frac{Hb}{HCT}\times 10$$

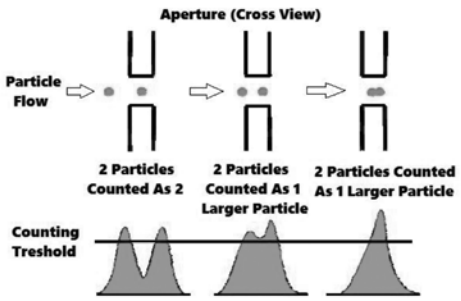
$$(1\ fL = 10^{-15}\ L)$$

با توجه به روابط فوق، چنانچه در اندازه گیری هموگلوبین و گلبول های قرمز، خطایی رخ دهد، بر روی سایر پارامترها نیز اثر می گذارد. برای مثال افزایش کاذب Hb موجب افزایش کاذب MCHC می شود و یا کاهش کاذب شمارش گلبول های قرمز موجب کاهش کاذب هماتوکریت خواهد شد.

## عوامل مداخله گر در آنالیزورهای امپدانسی

*** پدیده عبور همزمان**

عبور همزمان چند سلول از روزنه، ایجاد یک پالس الکتریکی پهن می کند که به عنوان یک سلول بزرگ شمارش می شود (شکل ۱). در آگلوتیناسیون سرد، لکوسیتوز و پلی سیتمی این پدیده رخ می دهد که نتیجه آن کاهش کاذب شمارش سلولی است. می توان با کاهش غلظت سلول ها و یا کوچک کردن اندازه روزنه، میزان خطای عبور همزمان را کاهش داد. با این وجود، کاهش غلظت سلول ها، خطای ناشی از رقیق کردن نمونه و خطای مربوط به شمارش را افزایش می دهد و نیز در صورت آلوده بودن محلول رقیق کننده با ذرات خارجی، شمارش کاذب را باعث می شود. با کوچک کردن روزنه، مشکل مسدود شدن نسبی یا کامل روزنه با مواد خرده ریز مانند لاشه سلولی، مسئله ساز خواهد شد.




شکل۱: عبور همزمان سلول ها از روزنه شمارش

*** عبور غیر مرکزی ذرات یا جریان غیرمحوری ذرات**

در سیستم امپدانس چنانچه سلولی دقیقاً از مرکز روزنه عبور کند، تولید ولتاژی متناسب با حجم خود خواهد کرد. عبور سلول ها از اطراف روزنه، تولید ولتاژ بیش از حد می کند که در نتیجه موجب گزارش اشتباه در شناسایی سلول ها می شود. برای رفع این پدیده، برخی از آنالیزورها با سیستم ویرایشگر، پالس های با ارتفاع بسیار بلند را که در اثر عبور ذرات از کناره های روزنه بوده، حذف کرده و در برخی دیگر با استفاده از محلول Sheath سلول های خونی را به طرف مرکز روزنه هدایت می کند.

*** پدیده گردابی یا بازگردشی**

گاهی اوقات سلول هایی که از روزنه خارج شده اند دچار حرکت گردابی یا بازگردشی شده و دوباره به روزنه نزدیک می شود و پالس های کوتاهی شبیه پالس های پلاکتی ایجاد می کنند که در نهایت منجر به افزایش کاذب در شمارش پلاکت ها خواهند شد. سلول های دارای حرکت گردابی حتی ممکن است وارد روزنه شده و از نو شمارش شود و بدین ترتیب شمارش کاذب اریتروسیت ها را نیز افزایش می دهد. در برخی از آنالیزورها یک جریان جاروب گر- Sweep flow در پشت ناحیه حساس روزنه قرار دارد که سلول های شمرده شده را از ناحیه روزنه دور کرده و از ایجاد پدیده گردابی جلوگیری می کند.

برای کاهش دادن پدیده عبور همزمان و پدیده بازگردشی، از تکنولوژی تمرکز هیدرودینامیک یا از محلول یا مایع غلاف- Sheath fluid استفاده می شود. مایع غلاف دارای دانسیته بالا بوده و مانند غلافی مسیر عبور سوسپانسیون را از روزنه احاطه می کند و از این رو موجب می شود که سلول ها در یک حرکت خطی از مرکز روزنه عبور کنند.

*** فاکتور شکل**

شکلی که سلول به هنگام عبور از روزنه به خود می گیرد، می تواند حجم ظاهری اندازه گیری شده توسط دستگاه را تحت تأثیر قرار دهد. عبور گلبول های قرمز از روزنه به صورت سیگار شکل یا لوله شکل (cigar-shaped forms)است، بنابراین چنانچه گلبول قرمز فوق العاده هیپوکروم یا رنگ پریده باشد، مانند مورفولوژی Anulocyte و یا Leptocyte که تنها غشای گلبول قرمز به صورت حلقه ای باقی است، در هنگام عبور از روزنه، سیگاری بسیار کشیده شده و در نهایت MCV کمتر از میزان واقعی گزارش می شود. متعاقب این حالت، میزان هماتوکریت نیز کاهش یافته و پارامتر MCHC به طور کاذب افزایش می یابد.

## روش های نوری

روش های نوری مختلفی در آنالیزورهای هماتولوژی جهت شمارش سلولی به کار گرفته شده است. عمده ترین روش مورد استفاده در سیستم های نوری، بر پایه خاصیت پراکنش نور (Electro-optical technology) توسط سلول عمل می کند. این روش در غالب اوقات با رنگ آمیزی سیتوشیمیایی سلول همراه است. به طور کلی اساس روش های پراکنش نور بدین صورت است که سلول های خونی رقیق شده (سوسپانسیون سلولی)

از یک لوله باریک کوارتز عبور داده می شوند. عبور سلول ها از لوله مذکور موجب آرایش سلول ها در یک ردیف پشت سر هم می شود که آن را Flow Cell می نامند. در کانال فلوسل، سلول ها در محل خاصی از مقابل منبع نوری عبور کرده و مورد اصابت پرتوهای نور )لیزری و یا غیر لیزری) قرار می گیرند. بسته به نور موجود و وضعیت سلول، نورِ اصابت کرده ممکن است جذب سلول شود، برگشت پیدا کند (بازتابش)، در جهت های گوناگون پراکنده شود و ... که در سیستم های مختلف برای هر مورد آشکارسازهای مناسبی تعبیه شده است. پارامترهای سلولی از قبیل اندازه، لوبولاسیون هسته و گرانول های سیتوپلاسمی روی میزان پراکنش نور در زوایای مختلف اثرگذار هستند.

علاوه بر پراکندگی، بخشی از نور تابشی به سلول، می تواند در طول موج های خاصی جذب شود. سیستم های اپتیکال به این جزء از نور نیز حساس بوده و می توانند آن را مورد ارزیابی و سنجش قرار دهند. در واقع جهت تقویت و افزایش این میزان جذب، در مدل های مختلف آنالیزورهای اپتیک، سلول ها به روش های مختلفی رنگ آمیزی می شود.

## بررسی برخی از منابع خطا در شمارش سلول ها و اندازه گیری پارامترها

### لکوسیتوز کاذب

- **لیز نشدن گلبول های قرمز:** مقاومت گلبول های قرمز در برابر لیز با محلول لیزینگ سل کانتر موجب افزایش کاذب گلبول های سفید می شود. در این صورت گلبول قرمز به عنوان لنفوسیت شمارش شده و درصد لنفوسیت بطور کاذب افزایش پیدا می کند. لیز نشدن گلبول های قرمز در موارد متعددی رخ می دهد، از جمله: حضور NRBC، تجمع پلاکتی، وجود پلاکت های غول آسا، گلبول های F دوران جنینی نوزادی، تارگت سل در بیماری های کبدی، گلبول های قرمز در هموگلوبینوپاتی ها ، کرایوگلوبولین و پاراپروتئین ها، و ...
- **خطای انتقالی** : در این حالت چنانچه نمونه یک بیمار مبتلا به لکوسیتوز به آنالیزور داده شود و سپس بدون شستشو نمونه بعدی به دستگاه داده شود، آلودگی محفظه شمارش با گلبول های سفید نمونه قبلی موجب انتقال آنها به نمونه جدید شده و باعث افزایش کاذب لکوسیت ها می شود. این مسأله ممکن است منجر به لکوسیتوز در بیمار طبیعی، یا نرمال شدن تعداد گلبول ها سفید در بیمار مبتلا به لکوپنی شود. در صورتی که نمونه دارای لکوسیتوز شدید است، دستگاه را باید چند مرتبه شستشو داده و سپس نمونه بعدی را مورد آزمایش قرار داد.
- وجود هموگلوبین های غیرطبیعی مانند: AS,SS,AC,AE,AD
- سندروم های میلودیسپلاستیک
- آنمی مگالوبلاستیک
- بعد از برداشتن طحال
- وجود رشته های فیبرین
- اورمی
- وجود هموگلوبین های ناپایدار

### لکوپنی کاذب

- **خطای خطی بودن** : گاهی شمارش زیاد گلبول های سفید، خارج از محدوده خطی بودن آنالیزور است که منجر به شمارش پایین گلبول های سفید می شود. در این حالت بایستی نمونه را ۱:۲ یا ۱:۳ با سرم فیزیولوژی رقیق کرد و به دستگاه داد.
- وجود سلول های smudge و ائوزینوفیل های ترد و شکسته شده که به عنوان سلول شمرده نمی شود.
- لیز سلول ها و از هم پاشیدگی آنها به دلیل ماندن خون بیش از ۳ روز
- نگهداری نمونه در دمای اتاق به مدت ۲٤ ساعت
- وجود آگلوتینین های سرد قوی
- لخته شدن خون

### اریتروسیتوز کاذب

- وجود پلاکت های غول آسا
- لکوسیتوز شدید: (بیش از ۵۰۰۰۰) که باعث افزایش کاذب Hb و MCV نیز می شود. لازم به ذکر است که گلبول های سفید در هنگام شمارش گلبول های قرمز، لیز نمی شوند زیرا که خون تنها با ایزوتون، رقیق شده و آسیبی به گلبول های سفید وارد نمی شود.
- وجود کرایوگلوبولین و کرایوفیبرینوژن و همچنین هیپرلیپیدمی که به صورت ذرات سلولی شمارش می شود.

### اریتروپنی کاذب

- میکروسیتوز شدید موجب کاهش شمارش گلبول های قرمز و در مقابل شمارش آنها به عنوان پلاکت می شود.
- همولیز (در محیط آزمایشگاه(
- لخته شدن

### افزایش کاذب هموگلوبین

- حضور کربوکسی هموگلوبین
- وجود کرایوگلوبولین و کرایوفیبرینوژن
- لکوسیتوز (بالای ۵۰۰۰۰ در میکرولیتر)

- هیپرلیپیدمی
- هیپربیلیروبینمی
- هیپر پروتئینمی
- عدم لیز RBCها

**کاهش کاذب هموگلوبین**

- افزایش سولفوهموگلوبین که به سیانومت هموگلوبین تبدیل نشده و باعث کاهش میزان هموگلوبین بطور کاذب می شود.
- لخته شدن

**افزایش کاذب MCV**

- لکوسیتوز شدید (بالای ۵۰۰۰۰)
- ماندن خون در دمای اتاق باعث تورم گلبول های قرمز و افزایش حجم به میزان ٦ fL در ٢٤ ساعت و۹ fL در ٤٨ ساعت می شود.
- وجود آگلوتینین های سرد باعث چسبیدن گلبول های قرمز به یکدیگر، کاهش کاذب RBC و هماتوکریت و در نهایت افزایش MCV ، MCH و MCHC می شود. میزان هموگلوبین تحت تأثیر آگلوتینین های سرد قرار نمی گیرد و بنابراین نسبت به تعداد گلبول قرمز دارای تناقض آشکار است. با گرم کردن نمونه خون و یا محلول ایزوتون، این مشکل برطرف می شود.
- کاهش قابلیت ارتجاعی گلبول های قرمز: همانگونه که پیشتر ذکر شد، گلبول قرمز جهت عبور از روزنه، به صورت سیگاری شکل در می آید. در گلبول های قرمز اسفروسیت بدلیل مقاومت سلول، تغییر شکل صورت نمی گیرد و بطور کاذب MCV بالا گزارش می شود.
- **پدیده تورم حاد:** با افزایش کاذب MCV و کاهش کاذب MCHC همراه است. این حالت در موارد هیپراسمولاریتی مانند هیپرگلیسمی شدید، هیپرناترمی و هیپراورمی دیده می شود. در این حالت گلبول قرمز که از اسمولاریته بیشتری نسبت به محلول ایزوتون برخوردار است، با قرار گرفتن در مجاورت آن، آب را جذب کرده و متورم شده و باعث افزایش کاذب MCV می شود.
- رسوب تدریجی پروتئین در اطراف روزنه دستگاه موجب تنگ شدن دریچه و کاهش سرعت جریان سلولی به داخل آن می شود که این امر منجر به افزایش کاذب MCV می شود. شستشوی روزانه دستگاه با محلول cell clean به رفع این مشکل کمک می کند.

**کاهش کاذب MCV**

- در هیپواسمولاریتی پلاسما عکس پدیده تورم رخ می دهد و میزان MCV و هماتوکریت به طور کاذب پایین و میزان MCHC به طور کاذب افزایش می یابد. این حالت در الکلیسم مزمن، هیپوناترمی و ترشح نامناسب ADH دیده می شود.
- در هیپوکروم شدید مانند گلبول های آنولوسیت و لپتوسیت، گلبول های قرمز در هنگام عبور از روزنه، سیگاری بسیار کشیده شده و میزان MCV آنها به طور کاذب پایین و میزان MCHC به طور کاذب بالا گزارش می شود.
- حضور کرایوگلوبولین و کرایوفیبرینوژن
- وجود پلاکت های غول آسا

## اجزای اصلی سل کانتر

سل کانترها معمولا از سه بخش اصلی هیدرولیک، نوماتیک و الکترونیکی تشکیل می شود که در ادامه به طور خلاصه به وظایف این بخش ها می پردازیم.

## وظایف سیستم هیدرولیک

وظایف سیستم هیدرولیک شامل موارد زیر است :

- برداشت محصول های مورد نیاز دستگاه و نمونه خون یا Aspirating
- تخلیه محلول ها یا خون برداشت شده یا Dispensing
- رقیق سازی نمونه یا Diluting
- مخلوط کردن نمونه و محلول ها یا Mixing
- افزایش محلول لیز کننده یا Lysing

## وظایف سیستم نوماتیک

وظیفه اصلی سیستم نوماتیک ایجاد خلاء برای تولید فشار منفی جهت کنترل دریچه ها و همچنین کنترل حرکت محلول ها و نمونه در داخل سیستم هیدولیک است .

## وظایف سیستم الکترونیکی

این سیستم توسط ریز پردازنده (میکروپروسسور) کنترل می شود و وظایف زیر را به عهده دارد:

- پردازش و تحلیل اطلاعات
- محاسبه و انتقال نتایج به چاپگر یا هر خروجی دلخواه در سیستم
- ترسیم گراف پارامترهای اصلی
- کنترل زمان اندازه گیری و توالی تست ها
- اجرای برنامه Q.C و کالیبراسیون سیستم
- ذخیره و بازیابی نتایج – Save and Load

## کالیبراسیون سل کانتر

سل کانترها دستگاه هایی قابل تنظیم بوده و باید با روش های مرجع کالیبره شود. البته این دستگاه های نسبتاً پایدار نیازی به کالیبراسیون پیوسته ندارد. راه اندازی اولیه دستگاه، تعویض قطعاتی که در اندازه گیری پارامترها نقش دارند، استفاده از معرف های با سری ساخت متفاوت، وقوع خطاهای سیستمیک در نمودار کنترل کیفی و سفارش شرکت سازنده، مواردی هستند که نیاز به کالیبراسیون دستگاه را مطرح می سازد. در واقع کالیبراسیون به منظور تصحیح هرگونه عدم صحت ناشی از عملکرد سیستم های نوماتیک، هیدرولیک و الکتریک سل کانتر انجام می گیرد.

قبل از اقدام به کالیبراسیون سل کانتر، باید از صحت عملکرد قسمت های مختلف دستگاه اطمینان حاصل کرد. برخی از اقداماتی که انجام آنها پیش از آغاز کالیبراسیون ضرورت دارد، به شرح زیر است:

- ارزیابی کلی دستگاه و معرف ها: بایستی از عملکرد طبیعی دستگاه، کافی بودن معرف ها و دسترسی به تمام مواد مورد نیاز اطمینان حاصل شود.
- ارزیابی شمارش زمینه ای دستگاه: لازم است که Background count سل کانتر در محدوده های قابل قبول باشد.
- ارزیابی میزان دقت (تکرار پذیری) دستگاه: تا زمانی که سل کانتر قابلیت تکرار پذیری نتایج را نداشته باشد، نمی توان آن را به شکل مناسبی کالیبر کرد.

برای کالیبراسیون دستگاه، کالیبراتورهای تجاری وجود دارد که مقادیر مورد نظر در آنها با روش های مرجع اندازه گیری شده است. در صورتی که این سوسپانسیون ها دارای تاریخ انقضای معتبر و تأییدیه های لازم باشند و به شرطی که دستورالعمل های شرکت سازنده رعایت شوند، جهت کالیبراسیون مناسبند. در صورت عدم دسترسی به کالیبراتور تجاری و یا شک به اعتبار آنها، می توان از خون کامل و تازه جهت انجام کالیبراسیون استفاده کرد.

لازم به ذکر است که سل کانترها از نظر پارامترهای قابل کالیبراسیون توسط کاربر، متفاوت است. در برخی از این دستگاه ها پارامترهای متعددی نظیر WBC، PLT، RBC، Hb، MCV و حتی MPV یا حجم متوسط پلاکتی توسط کاربر قابل کالیبراسیون هستند و در برخی دیگر، نظیر مدل های K دستگاه های سیسمکس، تنها دو پارامتر Hb و HCT توسط کاربر کالیبر می شود و کالیبراسیون سایر پارامترها از طریق کارخانه سازنده و شرکت پشتیبان صورت می گیرد.

جهت انجام کالیبراسیون به روش دستی، نیاز به محاسبه فاکتور تصحیح یا ضریب کالیبراسیون (Correction Factor–CF) داریم. CF عددی است که به صورت درصد محاسبه شده و در حقیقت ضریبی است که به مقادیر اندازه گیری شده داده می شود تا آنها را به مقادیر واقعی نزدیک نماید. این فاکتور در روش اتوماتیک کالیبراسیون، توسط خود دستگاه محاسبه شده و در کالیبراسیون اعمال می شود. برای محاسبه CF ، پارامترهای حداقل سه نمونه خون کامل طبیعی حداقل دوبار با روش دستی و دوبار با روش دستگاهی اندازه گیری شده و پس از محاسبه میانگین نتایج هر پارامتر با روش دستی و دستگاهی، ضریب کالیبراسیون جدید با استفاده از فرمول زیر تعیین می شود. بدیهی است با افزایش تعداد نمونه ها، دقت کالیبراسیون بیشتر می شود.

**ضریب کالیبراسیون** = (میانگین روش دستگاهی − میانگین روش دستی) / میانگین روش دستگاهی × ۱۰۰

برای مثال داریم:

برای کالیبراسیون هماتوکریت، ۵ نمونه خون تازه را هر کدام سه بار با روش دستیِ مرجع و روش دستگاهی به شرح زیر اندازه گیری کرده ایم:

| | روش دستیِ مرجع | | | | روش دستگاهی | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | بار اول | بار دوم | بار سوم | میانگین | بار اول | بار دوم | بار سوم | میانگین |
| نمونه ۱ | ٤٥ | ٤٦ | ٤٥ | ٤٥.٣ | ٤٣ | ٤٣ | ٤٤ | ٤٣.٣ |
| نمونه ۲ | ٤٠ | ٣٩ | ٤١ | ٤٠ | ٣٨ | ٣٩ | ٣٨ | ٣٨.٣ |
| نمونه ۳ | ٤٧ | ٤٧ | ٤٨ | ٤٧.٣ | ٤٥ | ٤٦ | ٤٥ | ٤٥.٣ |
| نمونه ٤ | ٣٨ | ٣٦ | ٣٦ | ٣٦.٧ | ٣٤ | ٣٥ | ٣٤ | ٣٤.٣ |
| نمونه ٥ | ٥٢ | ٥٣ | ٥٤ | ٥٣ | ٥٠ | ٥١ | ٤٩ | ٥٠ |

$$CF_1=\frac{45.3-43.3}{43.3}\times 100 = \%4.6$$

$$CF_2=\frac{40-38.3}{38.3}\times 100 = \%4.4$$

$$CF_3=\frac{47.3-45.3}{45.3}\times 100 = \%4.4$$

$$CF_4=\frac{36.7-34.3}{34.3}\times 100 = \%7$$

$$CF_5=\frac{53-50}{50}\times 100 = \%6$$

XCF=(4.6+4.4+4.4+7+6)/5= 26.4/5=%5.28

میانگین فاکتور تصحیح در مثال فوق برای هماتوکریت است و چون علامت آن مثبت است، نشان می دهد که سل کانتر میزان هماتوکریت را کمتر از روش مرجع دستی گزارش می کند و بنابراین فاکتور هماتوکریت در دستگاه باید به میزان افزایش پیدا کند. در بعضی از انواع سل کانترها، ضریب کالیبراسیون جدید با استفاده از فرمول کالیبراسیون زیر محاسبه می شود:

**ضریب کالیبراسیون قبلی** × (میانگین روش دستی / میانگین روش دستگاهی) = **ضریب کالیبراسیون**

## کنترل کیفیت دستگاه های سل کانتر

علاوه بر آنچه تا کنون در این باره گفته شد ، تا حدودی احساس می شود به علت آنکه این دستگاه های گران قیمت اطلاعات چاپ شده و زیبایی بدست می دهند خیلی ها ممکن است تصور کنند که اطلاعات به دست آمده از آنها نیز دقیق و درست است. در صورتی که اگر این دستگاه ها کالیبره و تنظیم نباشد، اطلاعات غلطی چاپ می کنند که نه تنها کمکی به بیمار ننموده بلکه باعث خطاهای تشخیصی شده و مشکلات زیادی ایجاد می نمایند.

آزمایشگاه، برای کنترل کیفیت دستگاه های سل کانتر در بخش هماتولوژی باید دستورالعمل مکتوبی داشته باشد و سوابق انجام برنامه های کنترل کیفی نیز به نحو مقتضی نگهداری شود. توصیه مراجع معتبر بین المللی برای انجام این مهم، استفاده از خون کنترل است که بسیاری از آزمایشگاه های کشور به دلایل مختلف ازجمله دسترسی نداشتن به این نمونه، از روش های دیگری برای کنترل کیفیت دستگاه سل کانتر استفاده می کنند.

در هر صورت ، هر آزمایشگاه ملزم به استفاده از روش های کنترل کیفی بوده چراکه این روش ها انواع خطاهای سیستماتیک و تصادفی را مشخص می نمایند. در ادامه بحث، در خصوص روش های مختلف کنترل کیفیت سل کانتر توضیحاتی ارائه خواهد شد.

- **آزمون پایداری کالیبراسیون**

به منظور کامل شدن روند کنترل کیفیت دستگاه، علاوه بر استفاده از خون کنترل، می توان از نمونه های خون تازه استفاده کرد. با توجه به پایداری پارامترهایی نظیر WBC ، RBC ، Hb ، HCT و اندکس های خونی در نمونه خون حاوی ضد انعقاد، به مدت ۲٤ ساعت در دمای $4^{\circ}C$، می توان در روز اول حداقل ۵ نمونه که دارای مقادیر طبیعی هستند را پس از آزمایش در یخچال نگهداری کرد و روز بعد، مجدداً مورد آزمایش قرارداد و وجود اختلاف معنی دار بین مقادیر نمونه های جفت (مقادیر اندازه گیری شده در روز اول و دوم ) را با استفاده از آزمون آماری پایداری کالیبراسیون محاسبه کرد.

$$SD=\sqrt{\frac{\sum d^2-\frac{(\sum d)^2}{n}}{n-1}}$$

$$tn=\frac{\bar{d}}{SD}\sqrt{n}$$

که در اینجا، n ، تعداد جفت های مورد بررسی (همان طور که در بالا ذکر شد حداقل ۵ تا پس n=۵) ، d ، اختلاف بین دو خوانده (روز اول و روز دوم) ، SD ، انحراف معیار اختلافات و میانگین اختلافات است . مقدار t باید برای هر متغیر محاسبه شود اگر مقدار آن برای ۵ نمونه از عدد ۲,۷۸ بیشتر باشد، با اطمینان بالای ۹۰ درصد می توان گفت که بین مقادیر شمارش شده در دو روز، اختلاف معنی دار وجود دارد لازم به ذکر است که وجود این اختلاف برای یک متغیر، بیان کننده اشکالی احتمالی است که درصورت تداوم، برای رفع آن باید اقدام مناسب صورت گیرد.

- **آزمون دوتایی یا دوبل**

درصورت نبود امکان انجام تمام آزمایش ها به صورت دوتایی، باید در هر بار شروع کار ، حداقل ۲ تا ۳ نمونه به صورت دوتایی آزمایش شود تا با بررسی اختلاف خوانده ها ازطریق محاسبات آماری، از وجود خطاهای تصادفی آگاه شد (هدف از آزمایش دوتائی شناسائی خطای اتفاقی یا رندوم است). افزایش اختلاف بین دو خوانده بیش از ۲SD محاسبه شده، احتمال وجود خطای تصادفی را مطرح می کند. فرمول زیر طریقه محاسبه SD نمونه های دوتایی را نشان می دهد.

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

به عنوان مثال برای روشن تر شدن موضوع، برای سه نمونه (n=۳) اگر داشته باشیم:

| مقدار هموگلوبین g/L (خوانده اول) | مقدار هموگلوبین g/L (خوانده دوم) | d | $d^2$ |
|---|---|---|---|
| 120 | 122 | -2 | 4 |
| 161 | 163 | -2 | 4 |
| 110 | 100 | 10 | 100 |
| | | | ۱۰۸ = (جمع) |

$$SD=\sqrt{\frac{\sum d^2}{2n}}=\sqrt{\frac{108}{6}}=4.24$$

**۲SD = 8.48**

همان طور که مشاهده می شود تفاوت یا اختلاف بیشتر از ۲SD (d > ۲SD) بین دو نتیجه آزمایش در نمونه آخر رخ داده (d=۱۰) و این مهم نمایانگر بروز خطای تصادفی و لزوم تکرار آزمایش روی همان نمونه است.

- **آزمون بازبینی**

یکی دیگر از روش های کنترل کیفیت، آزمون بازبینی است که درصورت نگهداری نمونه ها در دمای مناسب مثلاً در یخچال، قابل اجراست. برای این کار باید در زمان شروع کار (مثلا در صبح، چون این آزمون ها باید روزانه برروی دستگاه ها انجام شوند) دو تا سه نمونه را پس از آزمایش بلافاصله با درِ بسته در یخچال قرارداد و حدود ٦ تا ۸ ساعت بعد یا بعد از ظهر، آنها را مجدداً مورد آزمایش قرارداد. پیش از آزمایش، نمونه ها باید به دمای اتاق رسیده و کاملاً مخلوط شود. نتایج

این دو آزمایش را می توان با استفاده از فرمول آزمون دوتایی مقایسه نمود که اختلاف نتایج در محدوده ۲SD قابل قبول است. درصورت نگهداری نمونه ها در شرایط مناسب، هرگونه تغییر در نتایج خارج از این محدوده، نشان دهنده اشکال در عملکرد دستگاه یا معرف ها است. این آزمایش برای بررسی تغییرات هموگلوبین و گلبول های قرمز مناسب است و به میزان کمتر برای گلبول های سفید و پلاکت ها کاربرد دارد ولی برای هماتوکریت، به ویژه اگر فاصله زمانی بین دو آزمایش ٦ ساعت یا بیشتر باشد، کارایی ندارد. لازم به ذکر است که بهتر است برای آزمون بازبینی و آزمون دوتایی، نمونه های یکسانی انتخاب شود.

- **آزمون دلتا**

مقایسه مقادیر به دست آمده از یک نمونه با نتایج قبلی نمونه همان فرد به عنوان روشی برای کنترل کیفیت به کار می رود ؛ با درنظر گرفتن این نکته که فاصله زمان بین دو آزمایش بیش از دو تا سه هفته نباشد. درصورت استفاده از این روش، باید به نکاتی نظیر تغییرات فیزیولوژیک طبیعی و روزانه پارامترهای خونی و همچنین، مواردی نظیر ابتلای فرد به بیماری و یا استفاده از دارو به دلایل مختلف که باعث تغییر شمارش سلولها می شوند، توجه داشت. با توجه به تغییرات روزانه طبیعی پارامترهای خونی در یک فرد، تنها وجود اختلافات واضح بین مقادیر به دست آمده، نشان دهنده بروز خطا است.

اختلاف بین نتایج به دو روش محاسبه می شود:

**اختلاف درصدی:**

**۱۰۰× ( اول پاسخ – دوم پاسخ)/( دوم پاسخ) = درصد دلتا**

**اختلاف عددی**

**مقادیر قبلی – مقادیر کنونی = اختلاف دلتا**

- **آزمون بررسی عدم دقت (CV)**

این بررسی به دو شکل انجام پذیراست. درصورت استفاده از خون کنترل، می توان با استفاده از نتایج نمونه کنترل که طی روزهای متوالی با دستگاه آزمایش شده، عدم دقت هر پارامتر را محاسبه کرد و درصورت دسترسی نداشتن به خون کنترل، باید از نمونه های روزانه برای این امر استفاده کرد. به این ترتیب، هر ماه دو نمونه یا بیشتر را حداقل ۱۰ بار به صورت متوالی با دستگاه آزمایش کرده و از نتایج به دست آمده، عدم دقت هر پارامتر را محاسبه کرد. توصیه می شود که عدم دقت دستگاه به ویژه هنگام نصب و راه اندازی، با استفاده از نمونه هایی با دامنه های طبیعی و غیرطبیعی بررسی شود. برای تهیه نمونه غیرطبیعی پایین، می توان از نمونه رقیق شده استفاده کرد، به این ترتیب که پلاسمای نمونه را جدا کرده و سپس حجمی از نمونه را با این پلاسمای به دست آمده مخلوط کرد. نمونه خون با دامنه غیرطبیعی بالا را نیز می توان با غلیظ کردن نمونه تهیه کرد. برای این کار باید ظرف نمونه را به مدت ۲ ساعت با زاویه ٤٥° نگهداری کرد و سپس با برداشتن نیمی از پلاسمای ایجاد شده و مخلوط کردن کامل، از آن به عنوان نمونه غیرطبیعی بالا استفاده کرد. درصورت مطابقت نداشتن عدم دقت هر پارامتر با ادعای سازنده که در بروشور درج شده است، ضروری است به شرکت پشتیبان گزارش شود.

به عنوان مثال، محاسبه عدم دقت دستگاه برای شمارش گلبول های سفید (برای ۱۰ بار شمارش متوالی n=۱۰) در زیر آمده است:

| شمارش WBC | $x-\bar{x}$ | $(x-\bar{x})^2$ |
|---|---|---|
| ۷/۶ | −۰/۰۳ | ۰/۰۰۰۹ |
| ۷/۵ | −۰/۱۳ | ۰/۰۱۷ |
| ۷/۸ | ۰/۱۷ | ۰/۰۲۹ |
| ۷/۶ | −۰/۰۳ | ۰/۰۰۰۹ |
| ۷/۵ | −۰/۱۳ | ۰/۰۱۷ |
| ۷/۹ | ۰/۲۷ | ۰/۰۷۳ |
| ۷/۵ | −۰/۱۳ | ۰/۰۱۷ |
| ۷/۶ | −۰/۰۳ | ۰/۰۰۰۹ |
| ۷/۵ | −۰/۱۳ | ۰/۰۱۷ |
| ۷/۸ | ۰/۱۷ | ۰/۰۲۹ |

اگر هر بار شمارش های اندازه گرفته شده (در اینجا گلبول های سفید) را x بنامیم داریم:

$\sum x = 76.3$

$\bar{x}$ **(میانگین شمارش ها) = 7.63**

$\sum(x-\bar{x})^2 = 0.201$

بنابراین برای محاسبه SD و عدم دقت یا CV داریم :

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n-1}} = 0.148$$

$$CV\% = \frac{SD \times 100}{\bar{x}} = 1.19\%$$

- **آزمون ارزیابی دقت ماهیانه**

هر ماه یک بار ۲ نمونه را ۱۱ بار، پس از خوب مخلوط کردن، برای شمارش به دستگاه داده و Mean، SD ، CV را مانند آزمون قبل ارزیابی می کنیم. نهایتاً CV به دست آمده باید کمتر از مقدار اعلام شده توسط شرکت سازنده باشد.

## جدول مشکل یابی دستگاه سل کانتر

| مشکل | راه حل |
|---|---|
| دستگاه توانایی برداشت نمونه را ندارد | سوزن نمونه بردار باید تمیز شود. اگر ایراد رفع نشد پمپ ساکشن باید تعمیر شود. |
| آزمایشی انجام نمی شود | ایراد می تواند از نمونه خون تحویلی به دستگاه و یا گرفتگی ترانسدیوسر باشد که باید مجاری ترانسدیوسر باز شود. |
| خطای نتایج در RBC | تمامی مجاری منتهی به کاپ RBC چک شود. |
| خطای نتایج در WBC | تمامی مجاری منتهی به کاپ WBC چک شود. |
| خطای نتایج در RBC و WBC | قسمت های مشترک و سیستم عمومی بین دوکاپ RBC و WBC چک شود. |
| شمارش سلول ها قطع نمی شود | تعمیر برد الکتریکی زمان سنج که طبق زمان مشخص ، شمارش سلول ها را قطع می کند. |
| عدم نمایش صحیح نتایج | این ایراد می تواند ناشی از عدم شستشوی صحیح دستگاه باشد. با تعویض محلول شستشو این مشکل حل می شود. |

### برخی از منابع


- اصول کار و منابع خطا در آنالیزور های هماتولوژی (سل کانترها) ، علی ملکی ، انتشارات اندیشه رفیع
- روش اجرایی بکارگیری دستگاه سل کانتر ، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران ، اداره امور آزمایشگاههای بهداشتی
- کنترل کیفی در خون شناسی ، دکتر عبدالعلی شمس برهان
- کنترل کیفیت در آزمایشگاه های پزشکی ، دکتر فریده رضی ، انتشارات نوید شیراز
- دستگاه های خودکار شمارنده سلولی (اساس کار ، کالیبراسیون ، کنترل کیفیت و خطاها) ، دکتر پریسا داهیم
- دستورکار آزمایشگاه خون شناسی آزمایشگاه رفرانس قم
- اصول هماتولوژی و روش های آزمایشگاهی ، دکتر آزرم ، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
- کتاب جامع تجهیزات آزمایشگاهی و فرآورده های تشخیصی ۱۳۸۱ دکتر سقا

-Practical Hematology; Dacie & Lewis; ۱۰th edition; Churchill-Livingston; ۲۰۰٦.

و غیره .