

روش استاندارد انجام آزمایشهای اندازه گیری
هموگلوبین ، PCV و شمارش سلولی

Measurement of Blood Hemoglobin using Hemiglobincyanide(HiCN) Method

- ابتدا آهن هموگلوبین توسط فری سیانید پتاسیم اکسیده شده (همی گلوبین)
- سپس همی گلوبین توسط سیانید پتاسیم تبدیل به همی گلوبین سیانید میشود.
- واکنش در حرارت اتاق
- زمان لازم برای ایجاد واکنش ۵ دقیقه یا کمتر

معرف

KCN	0.05g
K₃Fe(CN)₆	0.2g
KH₂PO₄(Anhydrous)	0.140g
Detergent	0.5-1ml
Reagent water(Type 1)	1000ml

مشخصات معرف

- شفاف و زرد رنگ
- زمان لازم برای ایجاد واکنش ۵ دقیقه یا کمتر
- دترژانها لیز گلبول های قرمز و رسوب پروتئین ها را افزایش می دهند.
- در طول موج بیشتر از ۴۸۰ نانومتر جذب نوری ندارد.
- pH=7-7.4
- در صورت کدورت دور ریخته شود.
- هر ماه بصورت تازه تهیه شود.

Sampling

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

مواد؛ وسایل و تجهیزات

- کلیه وسایل شیشه ای مثل پی پتها ولوله ها استاندارد وکالیبره
- از لحاظ شیمیایی تمیز باشند.
- اسپکتروفتومتر کالیبره
- استاندارد دهموگلوبین

Reference Method

Macrodilution

- ۱۰۰ میکرو لیتر خون با ۲۵ میلی لیتر معرف
- ۴/۰ یا ۵/۰ میلی لیتر خون با ۱۰۰ میلی لیتر معرف
- ۰۴/۰ میلی لیتر خون با ۱۰ میلی لیتر معرف

Routin procedure

• ۲۰ میکرو لیتر خون + ۵ میلی لیتر معرف

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 استاندارد یا با کمک منحنی استاندارد محاسبه میشود.
- واحد اندازه گیری گرم در لیتر

تداخلات

Lipoproteinemia •

Lipemia •

WBC > $20 \times 10^9/L$ •

Plt > $700 \times 10^9/L$ •

Hb S •

خطا ها

- خطا هاي نمونه گيري
- خطا هاي روش انجام آزمايش
- خطا هاي مربوط به مواد و تجهيزات
- خطا هاي آزمايشگر



Procedure For Determining Packed Cell Volume By Microhematocrit Method

PCV نسبت حجم گلبولهای قرمز به حجم خون کامل میباشد.

اصول آزمایش

- خونگیری مویرگی؛ وریدی و شریانی
- K2EDTA ضد انعقاد مناسب جهت کالیبراسیون
- K3EDTA به علت ایجاد چروکیدگی در گلبول های قرمز MCV را ۲% کاهش و MCHC را به همین میزان افزایش میدهد.

اصول آزمایش

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

مشخصات لوله

- جنس از شیشه مخصوص
- طول لوله 75 ± 0.5 میلیمتر
- ضخامت جداره 2.0 میلیمتر
- قطر داخلی 0.85 ± 0.05
- دارای باند آبی در یک انتها

مشخصات دستگاه میکروسانتریفوژ

- شعاع چرخش بیشتر از ۸ سانتیمتر
- 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
- دارای زمان سنج اتوماتیک. (با قابلیت تنظیم حداقل ۳۰ ثانیه)

RCF=Relative Centrifugal Field •

RPM=Relative Per Minute •

$RCF=0.00001118 \times r \times N^2$ •

روش آزمایش

- ۵۰ میکرولیتر خون
- ۳/۲ - ۴/۳ طول لوله از خون پر شود.
- طول خمیر مسدود کننده کمتر از ۴ میلیمتر نباشد.
- نمونه ها بصورت مضاعف آزمایش شوند.
- نتایج حداکثر پس از ۱۰ دقیقه خوانده شوند.
- تفاوت نمونه های مضاعف از ۰/۵ بیشتر نباشد.

میانگین و دامنه مرجع

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

منابع خطا

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

• **افزایش کاذب:**

هیپو ناترمی

بدام افتادن پلاسما

• **کاهش کاذب:**

ضد انعقاد اضافی

همولیز

هیپر ناترمی

کالیبراسیون و کنترل کیفی دستگاه میکروهماتوکریت

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

روش غیر مستقیم بررسی کالیراسیون

- چند نمونه خون با PCV کمتر 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 .



Blood Cell Counting

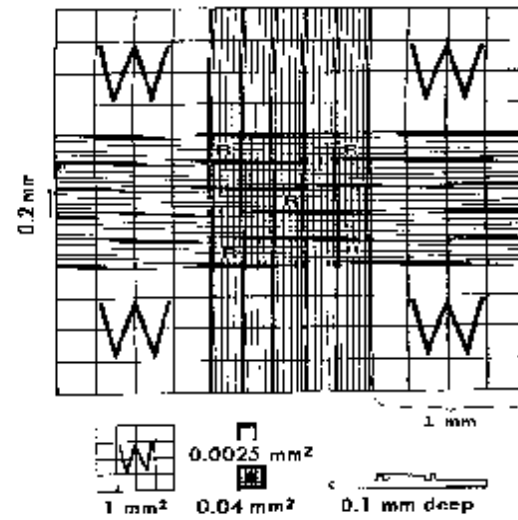
Leukocyte Counting By Manual method

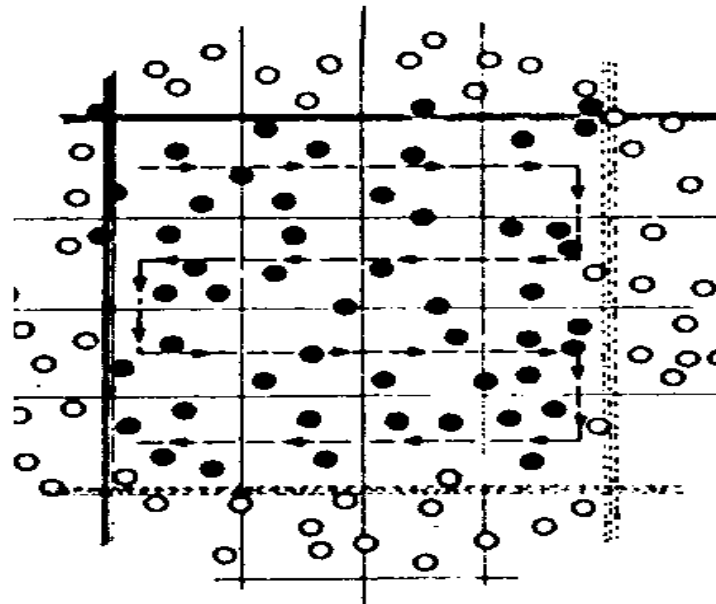
- عدم دقت این روش $5/6\%$ که در موارد لکوپنی به 15% میرسد.
- از خون حاوی EDTA استفاده میشود.
- مایع رقیق کننده اسید استیک 2% (رقت $20/1$) گلبولهای قرمز را لیز میکند.
- در موارد لکوسیتوز رقت $100/1$ یا $200/1$
- در موارد لکوپنی رقت $10/1$

منابع خطا

- مخلوط نکردن به میزان کافی
- خطاي آزمایش کننده
- خطاي ناشي از وسایل
- خطاي میدان دید
- هر چه تعداد سلولهاي شمارش شده بیشتر باشد میزان خطا کمتر میشود.

Improved Neubauer Hemacytometer





● *COUNTED*
○ *NOT COUNTED*

Platelet counting By Manual Method

منابع خطا

- جمع آوري نمونه
- تهيه رقيق کننده(فاقد ذرات خارجي مزاحم)
- تكنيك رقيق سازي
- پاكيژه نبودن لام

- عدم دقت این روش وقتی که حداقل ۱۰۰ سلول شمارش شود ۱۱٪ و اگر ۴۰ پلاکت شمارش شود ۱۵٪
- به دلیل تمایل پلاکتها به چسبیدن به یکدیگر؛ جسم خارجی و شیشه شمارش مشکل میباشند.
- نمونه: خون وریدی حاوی ضد انعقاد EDTA
- محلول رقیق کننده اگزالات آمونیوم ۱٪ با آب مقطر

- روش انتخابی شمارش پلاکتها استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست می باشد

• با تشکر از توجه شما