Imagine life as a game in which you are juggling some 5 balls in the air.
You name them - work, family, health, friends n spirit
And you are keeping all of these in the air.
You will soon understand that work is a rubber ball.
If you drop it; it will bounce back.

But the other 4 balls - family, friends, health and spirit are made of glass.
if you drop one of these,
they will be irrevocably scuffed or damaged or even shattered.
And they will never be the same.

You must understand that and strive for balance in your life.

pravsworld.com
inspiring you for a better tomorrow

بخش اول :
مقدمه ای بر تضمین کیفیت هماتولوژی

تهیه و تنظیم: دکتر مهرداد ونکی

طرح اجرائی تضمین کیفیت در هماتولوژی

- برنامه کنترل کیفی داخلی هماتولوژی
- برنامه کنترل کیفی خارجی هماتولوژی
- استقرار سیستم مدیریت کیفیت در بخش هماتولوژی

هدف نهائی سیستم تضمین کیفیت در هماتولوژی استحصال نتایج صحیح با قابلیت اطمینان بالا و تکرار پذیری و دقت بالا است

Quality Assurance hematology
برنامه تضمین کیفیت در خون شناسی

- ۱- برنامه کنترل کیفی داخلی خون شناسی
- **Internal Quality Control , IQC**
- ۲- برنامه کنترل کیفی خارجی خون شناسی
- **External Quality Control , EQC**
- 3-آزمون مهارتی در خون شناسی
- **Proficiency Examination**
- 4-استاندارد سازی در بخش خون شناسی
- **Standardization**

برنامه اجرائی کنترل کیفی داخلی هماتولوژی
IQC (Internal Quality Control)

- انجام روزانه برنامه در طول ردیف کاری روتین
- فراهم نمودن یک سیستم کنترل فوری و ضروری در برنامه
- اصلاح فوری خطا های حادث شده

External Quality Assessment(EQA)

برنامه ارزیابی کیفیت خارجی هماتولوژی

- ارزیابی عملکرد گذشته بخش هماتولوژی
  Evaluates past performance
- انجام آزمایش بر روی نمونه های مجهول
  Testing of unknown samples
- مقایسه وضعیت عملکرد مرکز با سایر مراکز
  Compare performance with others
- فراهم نمودن یک میدان جهت اصلاح و بهبود خطا های عملکردی
- **Provides a forum forimprovements and correction of errors**

Quality Management
مدیریت کیفیت در بخش هماتولوژی

- آموزش کارکنان با صلاحیت فنی بالا در هماتولوژی
- Training of laboratory staff
- کاربرد دستورالعمل های استاندارد کاری مستند در بخش هماتولوزی
- The use of SOPs
- مدیریت منابع (تدارکات) استاندارد
- Standard supply management
- مدیریت استاندارد تجهیزات بخش هماتولوزی
- Standard equipment management
- نظارت و سازماندهی در بخش هماتولوزی
- Supervision and organization

Internal Quality Assurance hematology
برنامه تضمین کیفیت داخلی در خون شناسی

- جهت دستیابی به صحت و دقت مطلوب در آزمایشات خون شناسی آشنائی کامل با منابع خطا در خون شناسی و راههای رفع و پیشگیری از آنها اهمیت فراوانی دارد که در سه حوزه قبل از آزمایش و آزمایش و پس از آزمایش قابل ارزیابی و بررسی است.
- **Preanalysis errors in hematology**
- **Analysis errors in hematology**
- **Postanalysis errors in hematology**

Quality Assurance Targets
اهداف تضمین کیفیت

Preanalytical Process .۱

Patient preparation, .۱

Specimen collection, Anticoagulant, labeling, storage, transportation .۲

Postanalytical Process .۲

How report, speed of report,... .۱

*never rely on a single value (out of reference range) to make a diagnosis(1 sample for report of low plat count or low Hb) .۲

*oslers rule: Try to attribute all abnormal findings to a single case(correlation of wbc count & ESR & Diff & CRP) .۳

Analytical Process .۳

Internal QC .۱

External QC .۲

Classification of Error in laboratory
طبقه بندی انواع خطا در آزمایشگاه بالینی

Random error: ⟶ **variance**

- Increase scatter of value about the true value
- Results of chance(eg.sampling error)
- Don't affect an entire batch of specimens
- Are not be detected by control samples

Systematic error: ⟶ **bias**

- not due to chance
- eg.deteriorating reagents

- **خطا تصادفی** منجر به تغییر واریانس و انحراف معیار تست می گردد و مهمترین مثال آن خطا های حین برداشت نمونه (دستی یا اتومیشن) می باشد/ تاثیری در کل نتایج یک ردیف کاری ندارد و توسط نمونه های کنترل روزانه شناسائی نمی گردد .
- **خطا سیستماتیک** منجر به تغییر میزان بایاس یا عدم صحت تست می گردد واز مهمترین دلایل بروز آن در آزمایشگاه تخریب و فساد تدریجی معرف ها و راژنت ها می باشد

common Random Error in hematology
چند نمونه خطا های شایع ماژور در بخش هماتولوژی

- مهمترین و اولین منبع خطا تصادفی در هماتولوژی Incomplete mixing:
- : اختلاط ناقص یا عدم اختلاط نمونه قبل از تحویل نمونه به دستگاه یا برداشت خون جهت آزمایشات دستی هماتولوژی
- دومین دلیل شایع خطاهای راندوم دربخش هماتولوژیBubble or particle in reagent :
- حضور پارتیکل یا حباب در ایزوتون یا معرف های سیستم سل کانتر
- سومین دلیل خطا تصادفی در بخش هماتولوژی Probe and syringe variation :
- حضور میکرو کلات یا ماکرو کلات که می تواند علاوه بر نوسان در نتایج دستی منجر به انسداد ناقص یا کامل پروب سل کانتر و بروز خطا های تصادفی و سیستماتیک گردد
- چهارمین خطای شایع راندوم دربخش هماتولوژی Optical problem :
- مشکلات و نوسانات سیستم اپتیکال یا نوری سل کانتر یا فتومتر.

بخش دوم :
برنامه اجرائی کنترل کیفی داخلی هماتولوژی

تهیه و تنظیم: دکتر مهرداد ونکی

Reference:

1- Infobase NCCLS 2000

2-Henry 21st Ed 2007

3- PRACT1CAL HAEMATOLOGY Dacie and Lewis TENTH ED1T10N 2006

Validation method & instrument in hematology

هدف از صحه گذاری :

۱- تشخیص منابع و مقدار خطا های بالقوه

۲- متد بکار رفته مناسب آزمایشگاه است

۳- براورده سازی الزامات و مقررات قانونی

سود ما از صحه گذاری :

۱- مقررات قانونی رعایت شده

۲- آزمایشگاه مطمئن می شود که تست های قابل اعتماد و جوابهای قابل قبول و صحیحی دارد

Validation method & instrument in hematology

چه زمان صحه گذاری یک ضرورت است؟

۱- زمانی که روش جدید در آزمایشگاه وارد شود

۲- شرایط در آزمایشگاه تغییر کند

۳- از تجهیز جدید استفاده شود

۴- مواد و معرف ها تغییر کنند

۵- هر زمان که متد خارج از الگوی طراحی شده در آزمایشگاه مورد استفاده قرار می گیرد .

۶- هر چند وقت یکبار به عنوان کنترل کیفی یک دستگاه با یک سیستم دیگر در یک محل یا محل دیگر.

۷- گاهی دچار مشکل می شویم و خروجی یک دستگاه از مقدار واقعی انحراف پیدا می کند و باید با یک روش رفرانس چک شود .

آزمون F

(صحه گذاری در حوزه ارزیابی دقت)

این آزمون راهی برای ارزیابی دقت دو روش می باشد و برای این منظور از واریانس یا مربع انحراف معیار استفاده می شود . میزان F به صورت زیر محاسبه می شود :

$$F \text{ میزان} = \frac{\text{واریانس بزرگتر}}{\text{واریانس کوچکتر}} = \frac{(SD_1)^2}{(SD_2)^2}$$

Table for Significance of F Test*

DEGREES OF FREEDOM (DENOMINATOR)	DEGREES OF FREEDOM (NUMERATOR)				
	10	12	14	16	20
10	2.97	2.91	2.86	2.82	2.77
	4.85	**4.71**	**4.60**	**4.52**	**4.41**
11	2.86	2.79	2.74	2.70	2.65
	4.54	**4.40**	**4.29**	**4.21**	**4.10**
12	2.76	2.69	2.64	2.60	2.54
	4.30	**4.16**	**4.05**	**3.98**	**3.86**
13	2.67	2.60	2.55	2.51	2.46
	4.10	**3.96**	**3.85**	**3.78**	**3.67**
14	2.60	2.53	2.48	2.44	2.39
	3.94	**3.80**	**3.70**	**3.62**	**3.51**
15	2.55	2.48	2.43	2.39	2.33
	3.80	**3.67**	**3.56**	**3.48**	**3.36**
16	2.49	2.42	2.37	2.33	2.28
	.69	**3.55**	**3.45**	**3.37**	**3.25**
17	2.45	2.38	2.33	2.29	2.23
	3.59	**3.45**	**3.35**	**3.27**	**3.16**
18	2.41	2.34	2.29	2.25	2.19
	3.51	**3.37**	**3.27**	**3.19**	**3.07**
19	2.38	2.31	2.26	2.21	2.15
	3.43	**3.30**	**3.19**	**3.12**	**3.00**
20	2.35	2.28	2.23	2.18	2.12
	3.37	**3.23**	**3.13**	**3.05**	**2.94**

*Values for 0.05 probability level are in regular type and values for 0.01 probability level are in boldface type.

major Preanalysis errors in hematology
خطاهای شایع قبل از آنالیز در خون شناسی

منابع خطا شایع در حوزه قبل از آنالیز :

۱- پذیرش نادرست نمونه خون شناسی (ناخوانا بودن درخواست / پذیرش نادرست مشخصات بیمار)

۲ - عدم تناسب خون و ضدانعقاد /

۳- میکسینگ نادرست /

۴- لیبل نادرست یا ناقص/

۵- حجم ناکافی نمونه خون شناسی /

۶- لخته ریز و درشت در نمونه حاوی ضدانعقاد /

۷- نمونه کهنه در خون شناسی /

۸- نمونه همولیز در خون شناسی (میکسینگ شدید / تکنیک نامناسب /حرارت بالا محیط)

۹- نگاه داری نامناسب نمونه قبل از آنالیز (درمعرض نور و حرارات بودن و تاخیر در انجام آنالیز)

فرم گزارش روزانه عدم انطباق های تعریف شده هماتولوژی

تاریخ ..... گزارش دهنده و اقدام کننده.....

کد	عدم انطباق تعریف شده	تعداد عدم انطباق روزانه	نمونه گیر مسئول عدم انطباق	اقدام آنی و فوری
H1	عدم انطباق های لیبلینگ : H1a فاقد لیبل (عدم انطباق ماژور) H1b لیبل ناخوانا (ماژور) H1c لیبل با اطلاعات ناقص (ماژور) H1d لیبل جابجا (ماژور) H1e چسبندگی پایین لیبل (مینور) H1f کاربرد ماژیک وایت برد (ماژور)	H1a (1) H1e (2)	H1a اقای.. H1e خانم.	تماس تلفنی یا حضوری فوری با نمونه برداری و پذیرش جهت ارسال لیبل کامل و صحیح و تکمیل اطلاعات

شرح اقدام اصلاحی و پیشگیرانه و نتیجه حاصله H1 :

پیشنهاد دهنده طرح.....

مسئول پیگیری و اجرای اقدام اصلاحی .....

مدت زمان تعیین شده جهت اجرا طرح و اصلاح فر آیند معیوب.....

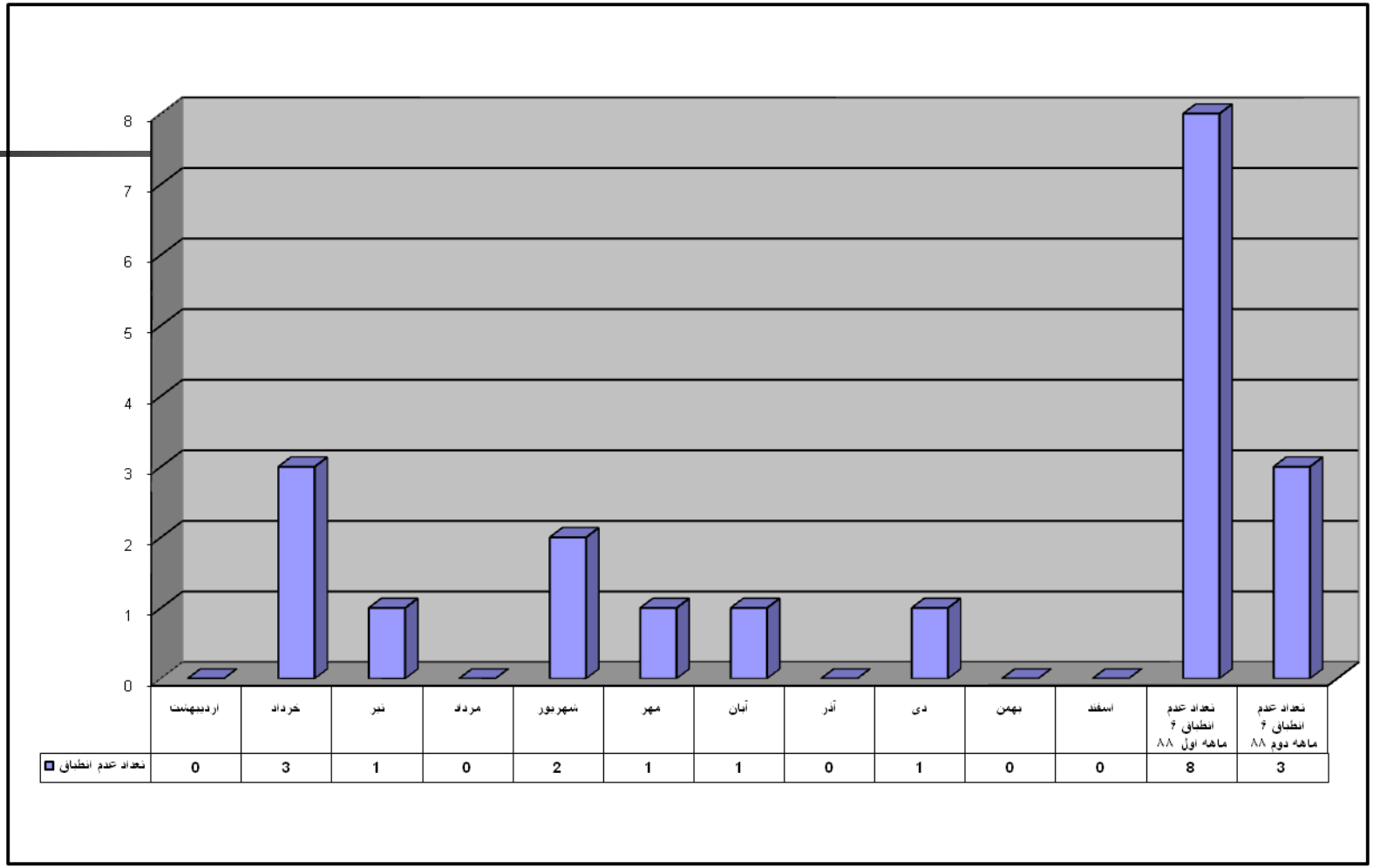
چند نمونه از اقدام اصلاحی و پیشگیرانه : ۱- آموزش کامل پرسنل نمونه برداری و پذیرش در حوزه لیبلینگ صحیح و کامل ۲- بازنگری دقیق نحوه تعیین هویت بیمار توسط پذیرش و نمونه بردار در موارد لیبل های جابجا ۳- استفاده از لیبل های استاندارد با کیفیت و چسبندگی مناسب ۴- استفاده از سیستم لیبلیگ مکانیزه و سیستم بارکد خوان ۵- بازنگری در تعداد پذیرش و نمونه گیری انجام شده در ساعت توسط کادر پذیرش و نمونه برداری(تزریق نمونه گیر و سیستم کمکی به گروه در صورت نیاز) و تعریف حجم کار استاندارد جهت قا نونمند شدن نحوه تزریق نیروی کمکی

فرم گزارش تحلیلی ماهانه و سالانه عدم انطباق های تعریف شده هماتولوژی در سال ۱۳۸۸

گزارش دهنده و تحلیل کننده نتایج : مسئول فنی / سوپروایزر / مسئول بخش هماتولوژی

عدم انطباق تعریف شده	تعداد عدم انطباق فروردین	تعداد عدم انطباق اردیبهشت	تعداد عدم انطباق خرداد	تعداد عدم انطباق تیر	تعداد عدم انطباق مرداد	تعداد عدم انطباق شهریور	تعداد عدم انطباق مهر	تعداد عدم انطباق آبان	تعداد عدم انطباق آذر	تعداد عدم انطباق دی	تعداد عدم انطباق بهمن	تعداد عدم انطباق اسفند	تعداد عدم انطباق ۶ ماهه اول ۸۸	تعداد عدم انطباق ۶ ماهه دوم ۸۸	درصد اثربخشی اقدامات اصلاحی در مقایسه دو نیمسال
H1a	۲	۰	۳	۱	۰	۲	۱	۱	۰	۱	۰	۰	۸	۳	۶۳% بهبود و اصلاح شاخص
H1b															
H1c															
H1d															
H1e															
H1f															

نمودار مقایسه ای درصد تعداد عدم انطباق H1a در ماه های سال ۸۸ و مقایسه مجموع ۶ ماهه اول و دوم سال ۸۸



فرم گزارش روزانه عدم انطباق های تعریف شده هماتولوژی

تاریخ ..... گزارش دهنده و اقدام کننده.....

کد	عدم انطباق تعریف شده	تعداد عدم انطباق روزانه	نمونه گیر مسئول عدم انطباق	اقدام آنی و فوری
H2	عدم انطباق حجم ناکافی خون : H2a : کمتر از ۰,۵ سی سی (ماژور) H2b : ۰,۵ تا ۱ سی سی (مینور)	H2a(1) H2b(2)	آقا خانم	تماس تلفنی یا حضوری فوری با نمونه برداری و پذیرش جهت اطلاع رسانی سریع به بیمار جهت نمونه گیری مجدد (در شرایط عدم انطباق ماژور و حجم کمتر از ۰,۵ سی سی)

شرح اقدام اصلاحی و پیشگیرانه و نتیجه حاصله H2 :

پیشنهاد دهنده طرح.....

مسئول پیگیری و اجرای اقدام اصلاحی .....

مدت زمان تعیین شده جهت اجرا طرح و اصلاح فر آیند معیوب.....

۱- آموزش نحوه توزیع استاندارد خون در لوله ها به نمونه گیر ۲- آموزش منابع خطا حاصل عدم رعایت نسبت خون به ضد انعقاد به نمونه بردار جهت افزایش میزان آگاهی و سطح حساسیت نمونه بردار به موضوع عدم انطباق مرتبط با حجم نمونه

فرم گزارش روزانه عدم انطباق های تعریف شده هماتولوژی

تاریخ ..... گزارش دهنده و اقدام کننده.....

کد	عدم انطباق تعریف شده	تعداد عدم انطباق روزانه	نمونه گیر مسئول عدم انطباق	اقدام آنی و فوری
H3	عدم انطباق لخته در CBC : H3a لخته درشت (عدم انطباق ماژور) H3b لخته ریز (ماژور) H3c لخته ریز در جدار درب (ماژور)	H3b(1) H3c(2)	خانم.... آقا...	تماس تلفنی یا حضوری فوری با نمونه برداری و پذیرش جهت اطلاع رسانی سریع به بیمار جهت نمونه گیری مجدد

شرح اقدام اصلاحی و پیشگیرانه و نتیجه حاصله H1 :

پیشنهاد دهنده طرح.....

مسئول پیگیری و اجرای اقدام اصلاحی .....

مدت زمان تعیین شده جهت اجرا طرح و اصلاح فر آیند معیوب.....

چند نمونه از اقدام اصلاحی و پیشگیرانه :

۱- کنترل اولیه وجود ضد انعقاد در ظروف CBC قبل از شروع به کار نمونه بردار به همراه کنترل تک به تک ظروف در هر نوبت نمونه برداری ۲- الزام نمونه برداران به استفاده از خطوط مدرج حجم روی سرنگ جهت عدم تخلیه حجم اضافی خون به لوله ها ۳- تعویض نمونه بردار با سطح دقت و صبر و حوصله مناسب در هنگام توزیع خون ۳- آموزش کامل نمونه بردار در ارتباط با علل تشکیل لخته های ریز و درشت در نمونه CBC با هدف افزایش آگاهی علمی و سطح حساسیت نمونه بردار به موضوع تشکیل لخته در نمونه (تخلیه حجم استاندارد / میکسینگ کافی و آرام ظرف به طور کامل جهت اختلاط کافی خون با ضد انعقاد / عدم جایگزینی کامل میکسر هماتولوژی با روش میکسینگ دستی در بخش نمونه برداری / تاخیر زمانی طولانی در جمع آوری نمونه به دلیل اشکال در سیستم وکیوم سرنگ یا رگ یابی نامناسب یا موقعیت نامناسب سر سوزن در محل نمونه برداری)

۴- اصلاح حجم کار نمونه بردار و مسئول انتقال نمونه اورژانس با نیرو کمکی در ساعات پیک کار

فرم گزارش روزانه عدم انطباق های تعریف شده هماتولوژی

تاریخ ..... گزارش دهنده و اقدام کننده.....

کد	عدم انطباق تعریف شده	تعداد عدم انطباق روزانه	نمونه گیر مسئول عدم انطباق	اقدام آنی و فوری
H4	عدم انطباق تحویل با تاخیر نمونه CBC اورژانس به بخش: H4a : نمونه CBC اورژانس بدون ثبت زمان روی لیبل (ماژور) H4b : تحویل نمونه به بخش با تاخیر ۱۰ تا ۳۰دقیقه (مینور) H4c : تحویل نمونه با تاخیر بیش از ۰,۵ ساعت (ماژور) H4d :تحویل نمونه ارسالی بدون ثبت زمان نمونه گیری روی ویال(ماژور)	H4a(2) H4b(3)	آقا خانم	تماس تلفنی یا حضوری فوری با نمونه بردار جهت ثبت زمان جمع آوری نمونه و مسئول حمل نمونه جهت دلیل تاخیر در تحویل نمونه و مسئول پذیرش جهت اطلاع رسانی سریع به بیمار به جهت اصلاح ساعت جوابدهی اورژانس

شرح اقدام اصلاحی و پیشگیرانه و نتیجه حاصله H1 :

پیشنهاد دهنده طرح.....

مسئول پیگیری و اجرای اقدام اصلاحی .....

مدت زمان تعیین شده جهت اجرا طرح و اصلاح فر آیند معیوب.....

چند نمونه از اقدام اصلاحی و پیشگیرانه : ۱- تعریف مجدد و دقیق گردش کار و شرح وظایف نمونه بردار در ارتباط با الزام به ثبت زمان جمع آوری نمونه های اورژانس و همچنین در ارتباط با مسئول حمل نمونه ۲- آموزش و تشریح عواقب و خطرات جانی احتمالی ناشی از تاخیر در جوابدهی نمونه CBCاورژانس جهت صاحبان فرآیند ثبت زمان و انتقال نمونه اورژانس ۳- اصلاح حجم کار نمونه بردار و مسئول انتقال نمونه اورژانس با نیرو کمکی در ساعات پیک کار

فرم گزارش روزانه عدم انطباق های تعریف شده هماتولوژی

تاریخ ..... گزارش دهنده و اقدام کننده.....

کد	عدم انطباق تعریف شده	تعداد عدم انطباق روزانه	نمونه گیر مسئول عدم انطباق	اقدام آنی و فوری
H5	عدم انطباق			

شرح اقدام اصلاحی و پیشگیرانه و نتیجه حاصله H1 :

پیشنهاد دهنده طرح.....

مسئول پیگیری و اجرای اقدام اصلاحی .....

مدت زمان تعیین شده جهت اجرا طرح و اصلاح فر آیند معیوب.....

چند نمونه از اقدام اصلاحی و پیشگیرانه : ۱-

فرم گزارش روزانه عدم انطباق های تعریف شده هماتولوژی

تاریخ ..... گزارش دهنده و اقدام کننده.....

منابع خطا در ضد انعقاد EDTA

- منابع خطا ناشي از افزايش غلظت EDTA:
- ۱- چروكيدگي گلبول هاي قرمز و كاهش كاذب هماتوكريت به روش دستي (املاح دي پتاس اثرات چروكيدگي سلولي كمتري نسبت به املاح تري پتاس دارا مي باشند).
- ۲- ترومبوسيتوپني كاذب به دليل چسبندگي پلاكت ها به جدار خارجي نوتروفيل ها / ترومبوسيتوزيس كاذب به دليل شكستن و ليز پلاكت ها به قطعات كوچك تر
- ۳- تبديل پلاكت از حالت ديسكوئيد به كروي و افزايش حجم پلاكتي(MPV)
- خون حاوي EDTA حداكثر در مدت ۶ ساعت پس از نمونه برداري بايستي آناليز گردد/گسترش خوني بهتر است همزمان با نمونه برداري يا حداكثر ۱ ساعت پس از نمونه برداري صورت گيرد تا كمترين تغييرات مرفولوژيك حاصل گردد

Anticoagulant/Additive Effect on Various Blood Tests

اثرات ضد انعقاد ها بر روی آزمایشات بالینی

- **EDTA**:Alkaline phosphatase(Inhibits) /Creatine kinase (Inhibits) /Calcium and iron(Decrease) /PT and PTT (Increase) / Sodium and potassium (Increase) / Platelet aggregation Prevents
- **Oxalate** :Acid phosphatase Inhibits / Alkaline phosphatase Inhibits / Amylase Inhibits / LDH Inhibits / Calcium Decrease /Sodium and potassium Increase / Cell morphology Distorts
- **Citrate** : ALT, ASTInhibits / Alkaline phosphatase Inhibits / Acid phosphatase Stimulates / Amylase Decrease / Calcium Decrease / Sodium and potassium Increase / Labile coagulation factors Preserves
- **Heparin** : Triiodothyronine Increase / Thyroxine Increase / PT and PTT Increase / Wright's stain Causes blue background / Lithium (LiHep tubes only) Increase / Sodium (NaHep tubes only) Increase
- **Fluorides** : Acid phosphatase Decrease / Alkaline phosphatase Decrease / Amylase Decrease / Creatine kinase Decrease / ALT and AST Decrease / Cell morphology Distorts.

major analysis errors in hematology
خطاهای شایع حین آنالیز در خون شناسی

- منابع خطا شایع در حوزه آنالیز :
- ۱-منابع خطا پرسنلی (بی دقتی در دیف و گزارش دهی/ جابجائی نمونه در سمپلینگ نامناسب/ عدم آشنائی به کنترل کیفی و منابع خطا در حوزه خون شناسی / بی برنامگی جهت کنترل خطا ها / عدم اعتقاد به مستند سازی)
- ۲- منابع خطا در تجهیزات و ابزار در خون شناسی (سمپلر بدون کالیبر یا ملانژور با بایاس و ضریب تغییرات نامناسب / دستگاه سل کانتر بدون کالیبر یا دارای تکرار پذیری و دقت نامناسب / هموسیتومتر و لامل غیر استاندارد جهت شمارش دستی سلول / میکرو هماتوکریت با دور نامناسب به دلیل کوتاه شدن ذغال/میکروسکوپ نامناسب)
- ۳- منابع خطا در معرف ها و راژنت ها (لایز / ایزوتون / لایز دیف / کلین /درابکین / محلول های شمارش دستی نظیر مارکانو و اگزالات آمونیوم ۱%): کهنگی و کاهش قدرت لیز کنندگی / تغییر ترکیب شیمیائی معرف لایز هموگلوبین در اثر نور و کهنه شدن /تولید کدورت وذرات (پارتیکل) مزاحم در ایزوتون های رقیق کننده و تداخل در شمارش سلول های پلاکت و قرمز / آلودگی قارچی یا باکتریال معرف ها / تغییر پ هاش معرف ها / تغییر حرارت مناسب جهت نگاه داری معرف ها)

major postanalysis errors in hematology
خطاهای شایع پس از آنالیز در خون شناسی

- منابع خطا شایع در حوزه پس از آنالیز :
- ۱- خطاهای دفتری یا خطا های ناشی از رونویسی:
- Clerical or transcriptional errrors
- انتقال دستی اطلاعات از دستگاه به لیست کار و از لیست کار به کامپیوتر / ورود جابجا یا ناقص اطلاعات در انتقال دستی اطلاعات / خطا های صفر و ممیز در انتقال دستی اطلاعات به کامپیوتر / بروز خطای دفتری ناشی از خستگی و حجم نامتناسب و فراوان اطلاعات / خطای دفتری ناشی از بی مسئولیتی و بی دقتی کارکنان دفتری)
- ۲- خطا های پس از آنالیز در حوزه تایید اولیه و نهائی نتایج آزمایش و گزارش دهی:
- تکرار های نابجا / نداشتن دلتا چک / نداشتن کنترل مقایسه ای در نتایج پارامتر های سل کانتر با لام خون محیطی / عدم دقت در به هیستوگرام ها در نتایج سل کانتر ها / نداشتن کنترل راندوم بر لام های خون محیطی و نهایتا کاهش حساسیت کارکنان فنی هماتولوژی در گزارش دهی مرفولوژی ها در خون شناسی /عدم برنامه مکتوب در گزارش دهی نتایج بحرانی هماتولوژی / عدم اشراف به مقادیر مرجع و رفرانس در پارامتر های مختلف هماتولوژی / عدم اشراف تایید کننده به فرمول های تصحیح کننده شمارش در هماتولوژی / گزارش دهی غیر استاندارد در مرفولوژی گلبول قرمز یا سفید و سلول های غیر طبیعی / نداشتن الگوی لاتین یا فارسی استاندارد در گزارش دهی های خاص در هماتولوژی

Hematology IQC program
برنامه کنترل کیفی داخلی هماتولوژی

- ۱- کنترل همبستگی نتایج در هماتولوژی correlation results
- ۲- دلتا چک روزانه (مقایسه نتایج فعلی و قبلی) Delta check
- ۳- تست مضاعف(Duplicate test)(روزانه یا هفتگی)
- ۴- تست میانگین بیماران (Bull method)(روزانه یا هفتگی)
- ۵- چک تست (Check test)(روزانه)
- ۶- کنترل خون و رسم منحنی لوی جنینگ (روزانه)
- ۷- کالیبراسیون دستی دستگاهی سل کانتر (بر حسب ضرورت)
- ۸- مقایسه دستی دستگاهی(روزانه یا هفتگی)

correlation results

همبستگی و تطابق نتایج در خون شناسی (در هر زمان)

- ۱- کنترل همبستگی نتایج در هماتولوژی correlation results
- (بدون محدودیت زمانی) :
- گسترش خونی با شمارش سلولها / تطابق شمارش سلولها با یافته های بالینی نظیر خونریزی یا تزریق خون / تطابق MCHبا میزان هیپوکروم در لام خون محیطی / تطابق RDWبا میزان آنیزوسیتوزیس و پوئکیلوسیتوزیس لام خون محیطی / تطابق مرفولوژی گلبول قرمز با نتایج فریتین و آهن سرم و هموگلوبین /

Correlation Results
بررسی روزانه همبستگی نتایج

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

دلتا چک روزانه Delta check

- دلتا چک روزانه Delta check

- مقایسه نتایج قبلی و فعلی بیمار(در دو مراجعه متوالی).
  - نکات قابل توجه در دلتا چک
- ۱- فرد نباید دچار تغییرات بالینی شدید شده باشد(دارودرمانی ، تزریق خون .عفونت بیمارستانی / حمله قلبی یا مغزی ...)
- ۲- با توجه به تغییرات روزانه طبیعی مقادیر خون در یک فرد ، دامنه قابل قبول در دلتا چک در نظر مي گيريم.
- مثال اگر اختلاف دو Hb بیش از 2g/dl باشد (بدون تغییرات شدید بالینی) احتمال قوی دستگاه از کالیبر خارج است.

دامنه غیرقابل قبول دلتا چک روزانه check Delta

Hb	**>2gr/dl**
HCT	**>5%**
MCV	**>6fl**
MCH	**>5pg**
MCHC	**>2%(gr/dl)**
WBC, PLT, RBC	**Reduced or Increased >25%**

تست مضاعف (کنترل دقت روزانه)
Duplicate test

- روش اجرای تست مضاعف با هدف کنترل روزانه دقت دستگاه (روش ساده و کاربردی) .
- ۱۰-۵ نمونه متوالي ، بصورت مضاعف به دستگاه داده می شود. سپس بر اساس فرمول زیرمقدار **SD** را بدست می آوریم. تفسیر نتایج به این گونه است که هرگاه در نمونه ای **d < 2SD** باشد آن نتیجه برای آن نمونه قابل قبول است ، اما اگر بیش از این مقدار باشد دستگاه دچارخطاهاي منفرد و تصادفی(**Random Error**) است که باید شناسایي و رفع عیب شود.

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

- در اینجا **d** اختلاف بین دو تست مضاعف بوده و **n** تعداد نمونه آزمایش شده است.

Duplicate Test WBC
مثال کاربردی از تست مضاعف روزانه

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
			∑=5.8

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

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

2sd=1.5

d>2sd→random error

Check Test

تست کنترل عملکرد روزانه

تمام مراحل آزمایش شبیه Duplicate Test می باشد با این تفاوت که نمونه ها بجای اینکه پشت سرهم بصورت دوپلیکیت تست شوند بایستی در فاصله کمتر از 6 ساعت دوباره به دستگاه داده شوند.در صورت تاخیر >6hr بین دو تست در حرارت آزمایشگاه این روش جهت Hb و RBC واندکس ها و نسبتا WBC مناسب است و در حرارت یخچال تا ۱۲ ساعت

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

اگر d>2SD باشد به شناسايي خرابی دستگاه یا فساد معرف ها پي مي بريم.

Detection deterioration of apparatus and reagent between tests
Suitable for Hg & Rbc (4-5 samples)

Moving Average Test , Daily Mean Test (Bull`s Method)

تست مواج یا روش بال

در واقع کنترل کیفی از طریق اندیکس های خونی زیر است MCV,MCH,MCHC

* این آزمایش برای مراکزی است که حداقل ۱۰۰ نمونه CBC در روز دارند و نباید تغییرات فاحشي بطور روزانه در میانگین اندیکس ها وجود داشته باشد.

* بایستی از هر کدام از این اندیکس ها بصورت جدا ، بر روی بیش از ۱۰۰ نمونه در روز به مدت ۱۱روز متوالی آزمایش انجام داد (CBC). سپس بر اساس نتایج بدست آمده از میانگین ($\overline{X}$) و SD، منحنی کنترل را رسم می کنیم.

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

n تعداد روزها(۱۱روز) ، X میاگین نتایج درهر روز برای هر اندیکس، $\overline{X}$ میانگین نتایج در ۱۱ روز برای هر اندیکس.

* پس از رسم منحنی بصورت روزانه به ازای ۲۰ نمونه یک میانگین گرفته و در منحنی ثبت می کنیم چنانچه ۳ میانگین متوالی خارج از $\overline{X} \pm 2SD$ بخواند، دستگاه باید کالیبر شود.

* نکته دیگر در این تست بایستی روزهای خاص (مثلا روزهای مراجعه تالاسمی ها) را در نظر نگرفت.

* تغییرات مهمي که در این اندیکس ها ایجاد مي شود نشانه تغییر در کالیبراسیون یا طرز کار آنهاست.

نمونه خون کنترل و تهیه منحنی کنترل
Blood Control & QC Chart

از ۱۰-۳ ویال خون کنترل (با یك سری ساخت) به مدت ۷-۳ روز متوالی استفاده می شود، به گونه ای که بر روی هر نمونه(ویال) ۵ بار آزمایش انجام شود. بر اساس نتایج بدست آمده از میانگین ($\bar{X}$) و SD، منحنی کنترل را رسم می کنیم(منحني Levey & Jenning). پس از آن با هر ردیف کاری یک نمونه کنترل گذاشته و نتایج را براساس قوانین وستگارد جهت بررسی وضعیت دستگاه تفسیر می کنیم.

کنترل تکرار پذیری ماهانه سل کانتر

- **Replicated Tests:**
- از یک نمونه کنترل یا خون نرمال(CBC)، درآخر هر ماه یا اول ماه بعد ، ۱۰ بار آزمایش بعمل می آید. سپس $\overline{X}$ ، SD و CV محاسبه می گردد . CV بدست آمده با CV موجود در کاتالوگ برای هر پارامتر مقایسه می شود.
- چك كردن معرف ها؛ وضعيت نمونه گيري؛ وضعيت ضد انعقاد

بخش سوم :

منابع خطای شایع در سیتومرفولوژی

دکتر مهرداد ونکی

Reference:

1- hematology departement of SSO reference lab guideline(social security Organization)

2-Henry 21st Ed 2007

3- PRACT1CAL HAEMATOLOGY Dacie and Lewis TENTH ED1T10N 2006

4- dr popak training slides

نکات مهم در تهیه اسمیر خون

- ۱- کشیدن اسمیر حداکثر ۴ ساعت پس از نمونه گیری بایستی صورت گیرد
- ۲- فیکساسیون اسمیر خون با متانل حداکثر یک ساعت پس از کشیدن اسمیر اولیه بایست صورت گیرد .
- (متانل خالص یا حداکثر دارای ۳%آب)
- ۳- در نمونه خون غلیظ (بیمار پلی سیتمی) یک قطره خون را روی لام با یک قطره آلبومین (۲۲%) یا پلاسما گروه AB مخلوط می نماییم .

When blood film needed?

Blood count request:

Is it a first time count or repeat count?

1st time count: *Is it a routine screening test or* special category?

If Routine: *Analyzer report for blood count alone*

Film required if any ***flags*** *are signaled*

FLAGGING OF AUTOMATED BLOOD COUNTS

"**Flagging**" refers to a signal that the specimen being analyzed may have a ***significant abnormality*** because one or more of the blood count variables are outside specified limits (**usually 2SD**) or there is a ***qualitative abnormality*** that requires a quality control check and/or additional investigation.

This usually includes a blood film review. Although it is theoretically desirable for every blood count to include examination of a stained film, this is being challenged by increasing workloads requiring time and cost-effective rationalization, as well as by the use of automated analyzers that report differential leukocyte counts on every specimen.

1st time count –
If Special category, Film required:

Diagnosed blood disease patients

Patients receiving radiotherapy and/or chemotherapy

Renal disease

Neonates

Intensive care unit

If special tests have also been requested for:

infectious mononucleosis, haemolytic anaemia, enzymopathy, abnormal haemoglobins

If the clinical details on the request form indicate lymphadenopathy, splenomegaly, jaundice or suggest the possibility of leukemia or lymphoma

Specific requests by clinician

Repeat count, Film required:

- **Delta check positive** when compared with previous record
- Any flag occurs in present count
- On each occasion for patients with known blood diseases, for neonates, and when specifically requested by clinicians

The ***International Society for Laboratory Hematology*** has published consensus criteria (available at **www.islh.org**) for the laboratory-initiated review of blood smears on the basis of the results of the automated blood count.

A comparison of the current result with a recent previous result(2-3 weeks) on the same patient

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

RBC : (<10%) ; PT : +/- 5 seconds / aPTT: +/- 15 seconds from a specimen tested in the previous 24 hrs. may indicate a mislabeled specimen.

DIFFERENCES BETWEEN CAPILLARY & VENOUS BLOOD

The differences may be exaggerated by **cold** with resulting *slow capillary blood flow*.

The **PCV**, **RBC**, and **Hb** of ***capillary*** blood are ***slightly greater*** than in venous blood.

The **WBC** & **neutrophil** counts are higher by about **8%;**

The **monocyte** count is higher by about **12%**, and in some cases by as much as **100%**, especially in children.

Conversely, the ***platelet*** count appears to be higher in venous than in capillary blood; this is on average by about **9%** and in some cases by as much as **32%.**

This may be the result of adhesion of platelets to the site of the skin puncture.

Good vs. Bad Smears

Figure 1–2 Well-made peripheral blood smear. (From Rodak BF: Diagnostic Hematology. Philadelphia, WB Saunders, 1995.)

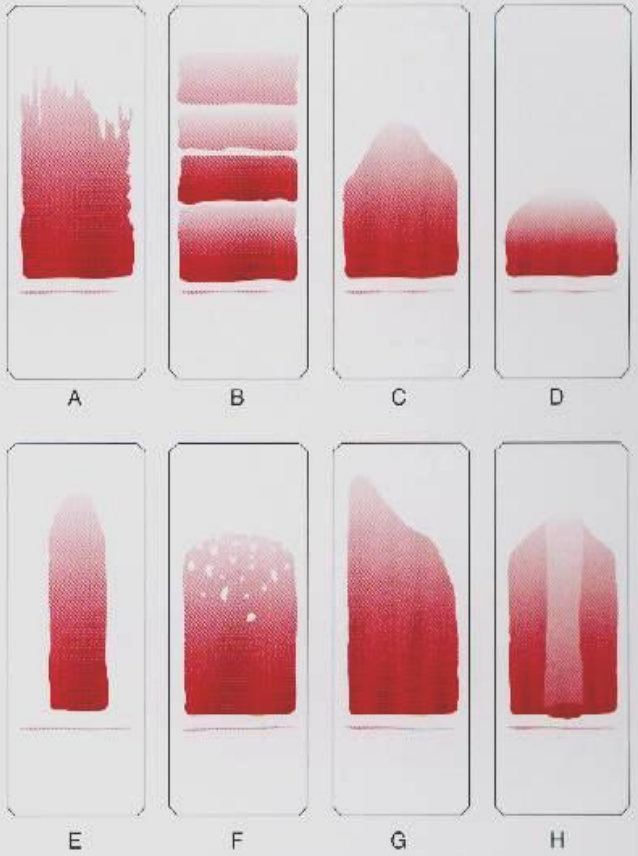


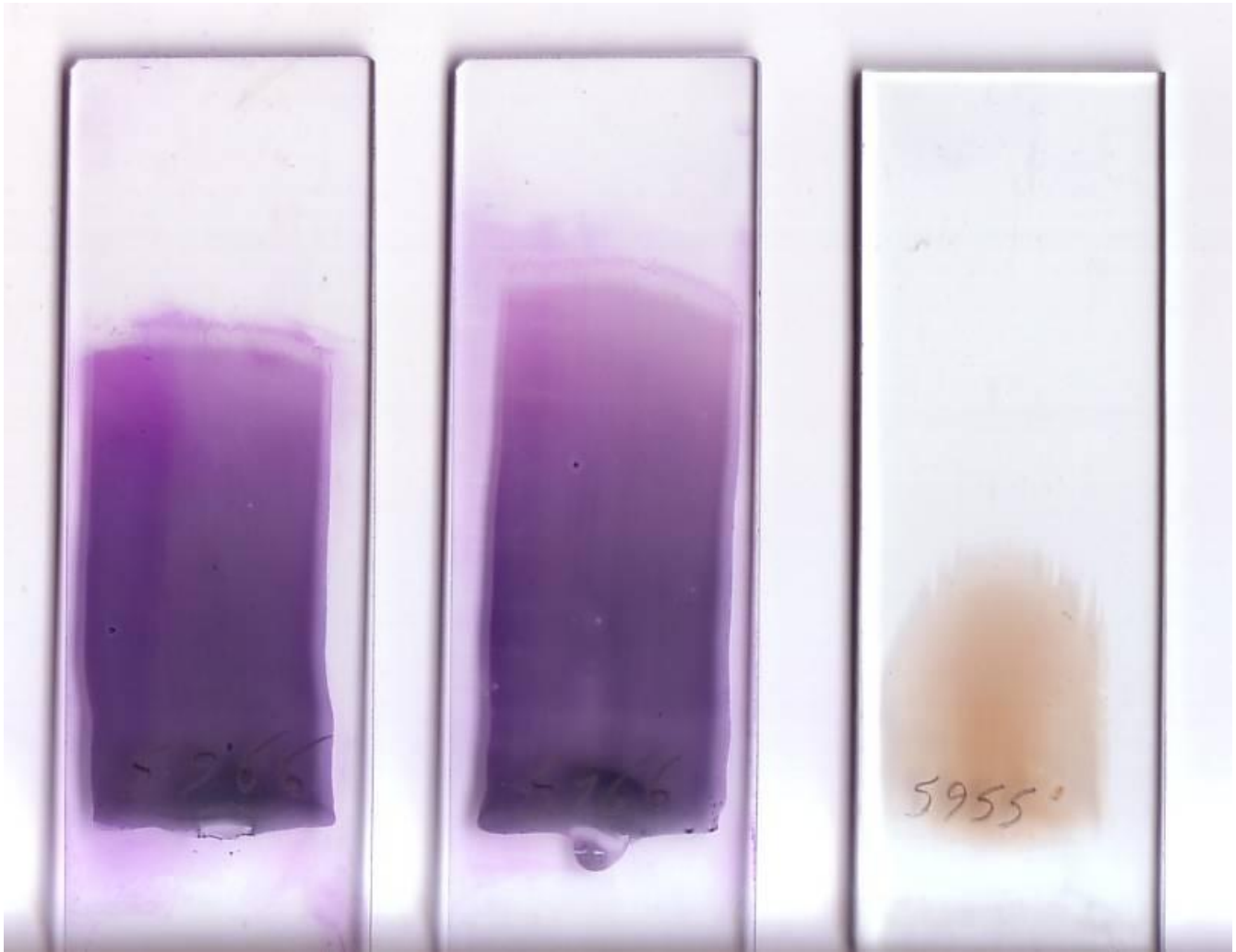
Figure 1–3 Examples of unacceptable smears. (From Rodak BF: Diagnostic Hematology. Philadelphia, WB Saunders, 1995.)

Good Peripheral Blood Smear

Prepare blood films within **4(3) h** of the blood collection in K EDTA.

Stain the film **within one hour of preparation** with a Romanowsky stain, containing fixatives; or fix within one hour with "water-free" (i.e., **<3% water**) methanol for later staining.

Good vs. Poor Peripheral Blood Smear



Peripheral Blood Smear

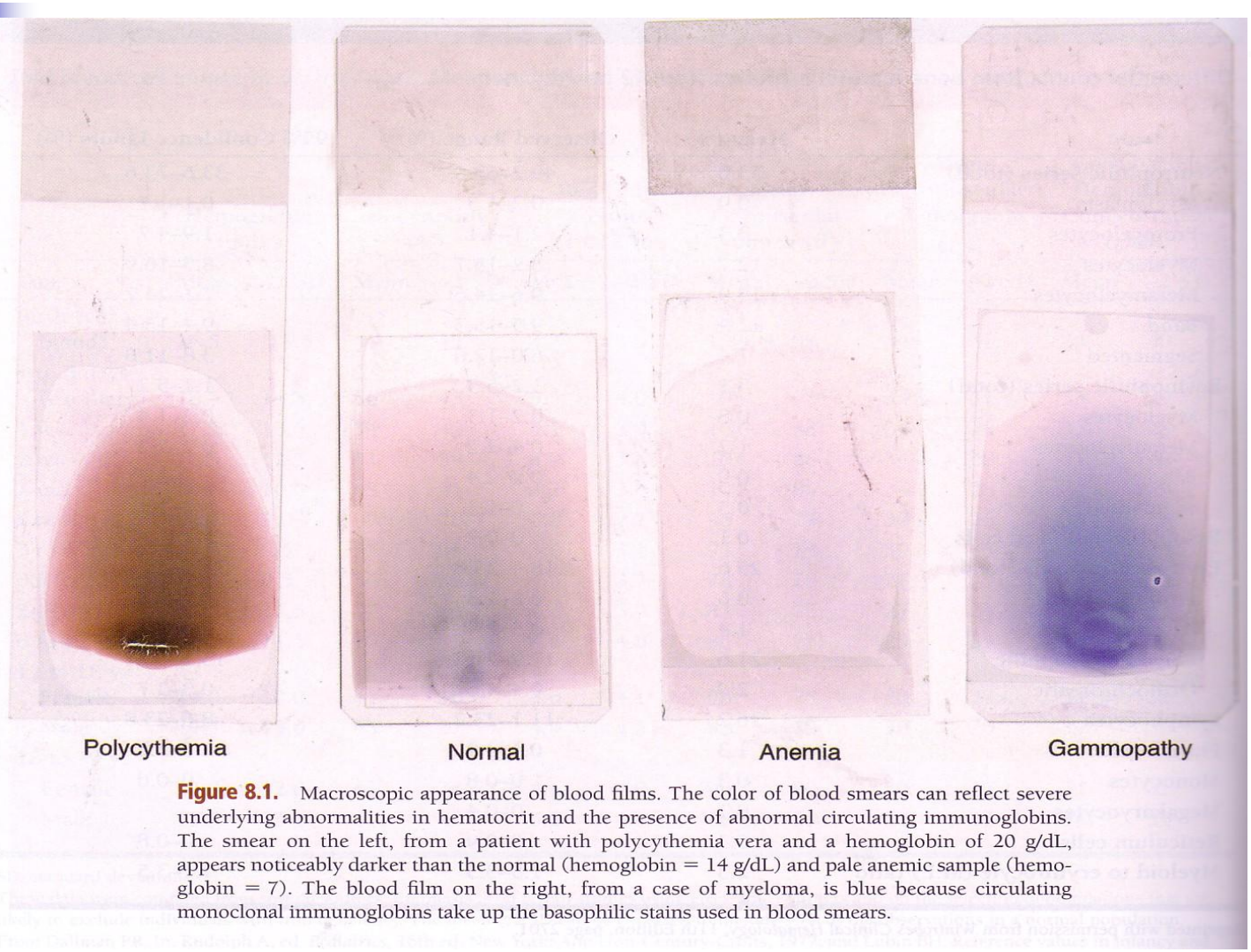
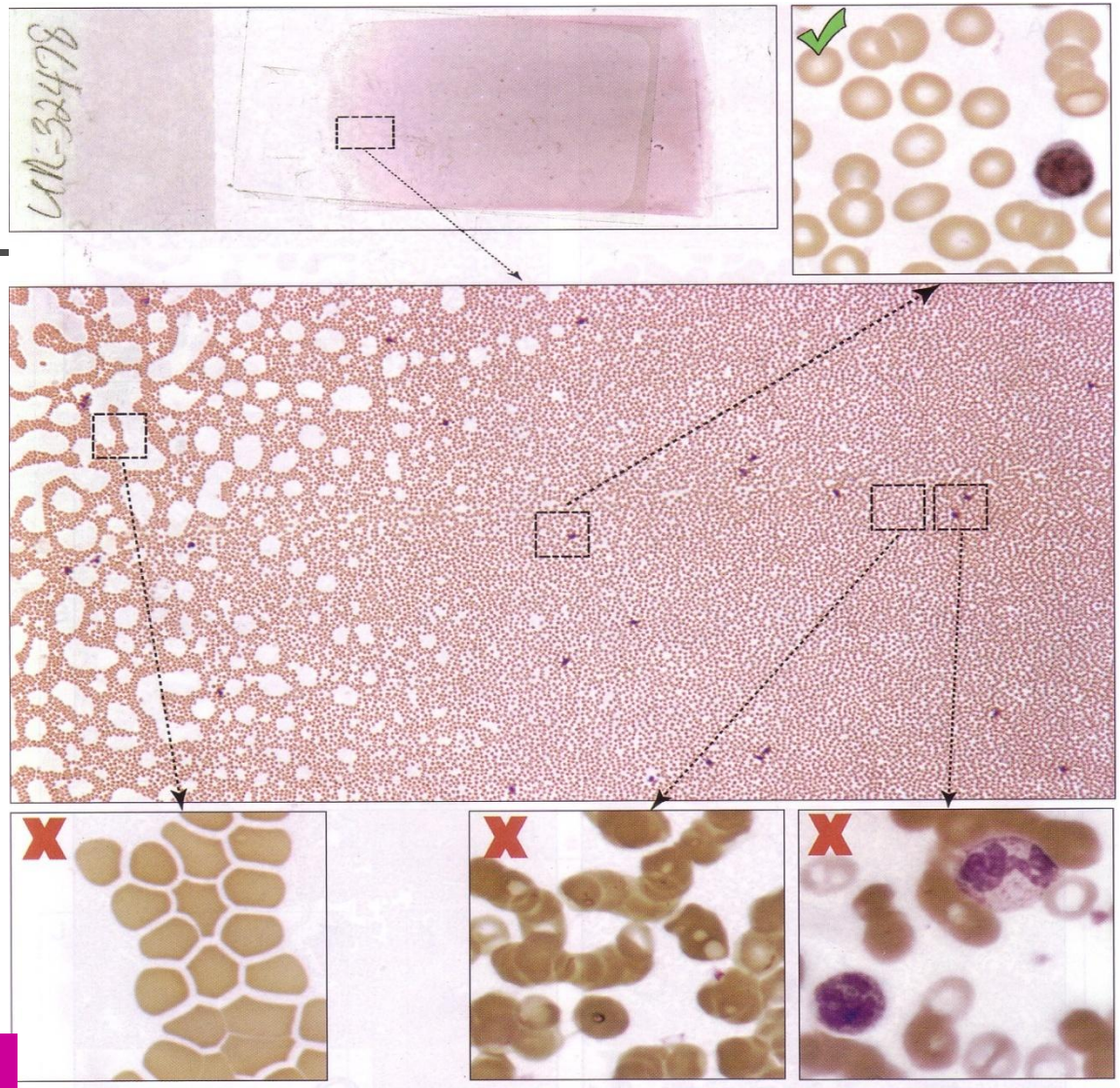


Figure 8.1. Macroscopic appearance of blood films. The color of blood smears can reflect severe underlying abnormalities in hematocrit and the presence of abnormal circulating immunoglobins. The smear on the left, from a patient with polycythemia vera and a hemoglobin of 20 g/dL, appears noticeably darker than the normal (hemoglobin = 14 g/dL) and pale anemic sample (hemoglobin = 7). The blood film on the right, from a case of myeloma, is blue because circulating monoclonal immunoglobins take up the basophilic stains used in blood smears.

Spreader of PBS preparation

Subfeathery area

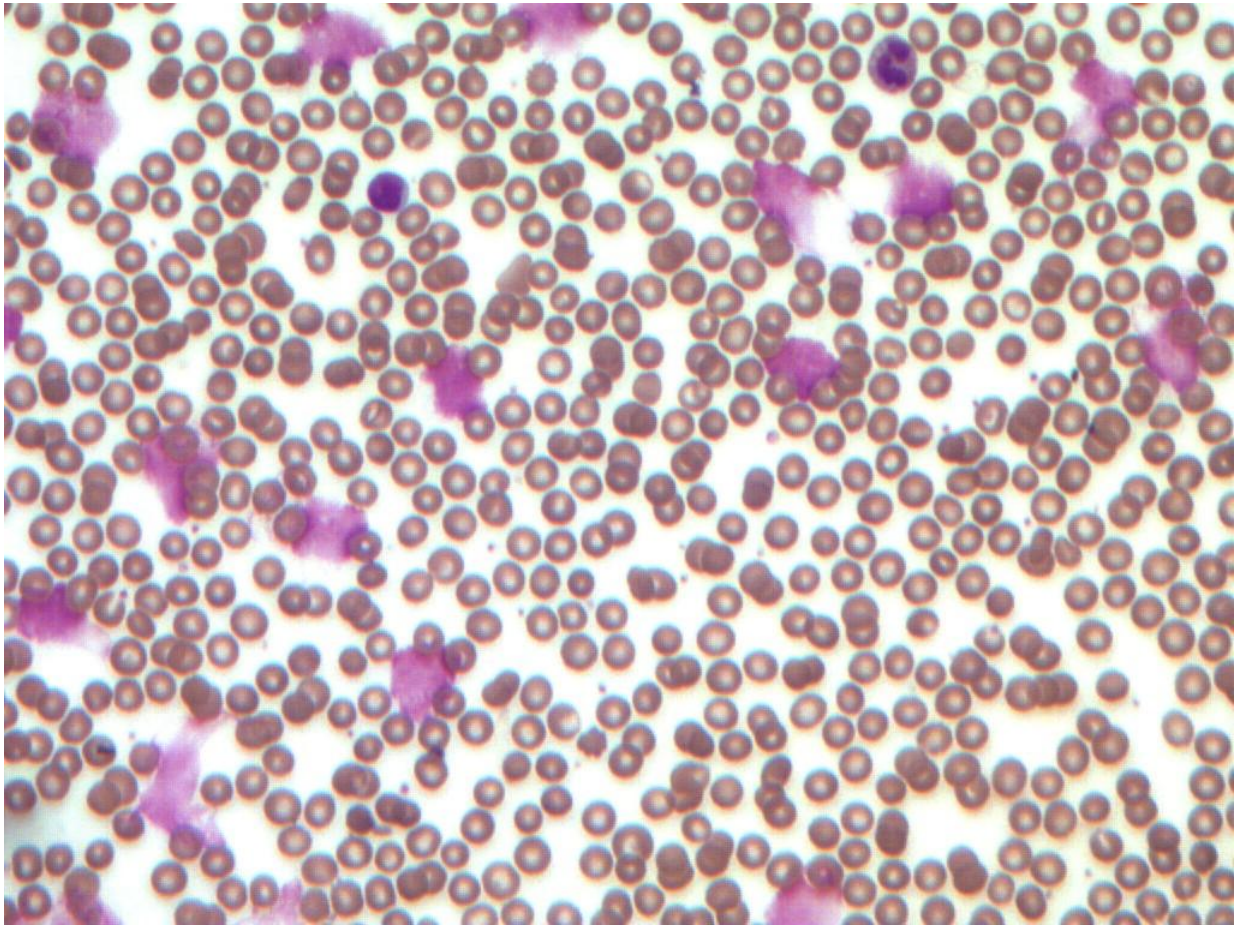


feathery end

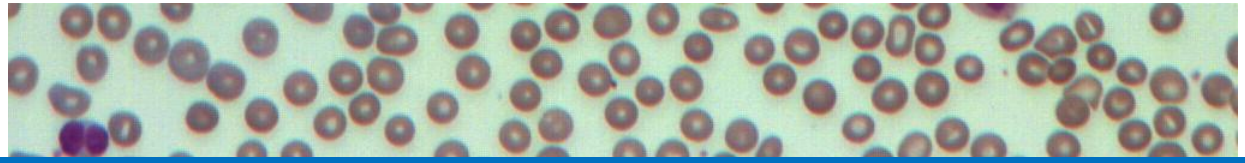
Thick area

Figure 8.2. Microscopic approach to blood films. Selecting the correct area to examine is essential in properly assessing blood films. Regions where red blood cells are well-spaced and almost touch each other are optimal for examining erythrocytes (*right upper panel*). Erythrocytes, when examined too closely to the edge of the slide, appear misshapen and falsely hyperchromic (*left lower panel*), whereas those too distant often appear shrunken and aggregated (*right lower panels*).

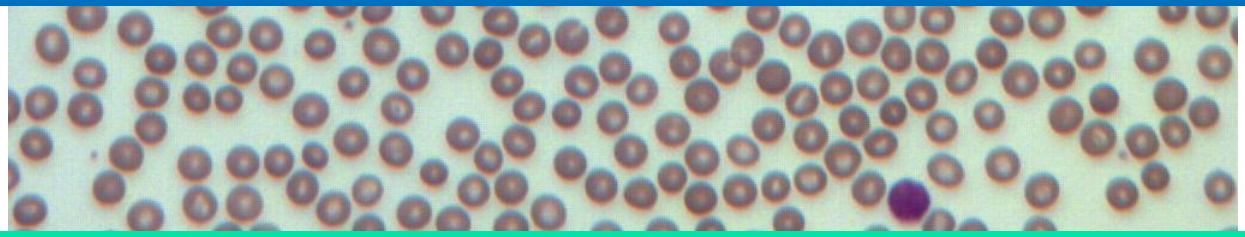
PBS of a patient with Dx of CLL, What do you do for diff. count?



Less than **2%** of the leukocytes may be smudged, except in some lymphoproliferative disorders.



Only if the disrupted cell is still clearly identifiable (e.g., an eosinophil) should it be included in the differential count.



Adding one drop of 22% human albumin to five drops of blood markedly reduces smudge cell formation. Make the blood film from the albumin-blood mixture.

Criteria for Reporting Smudge Cells

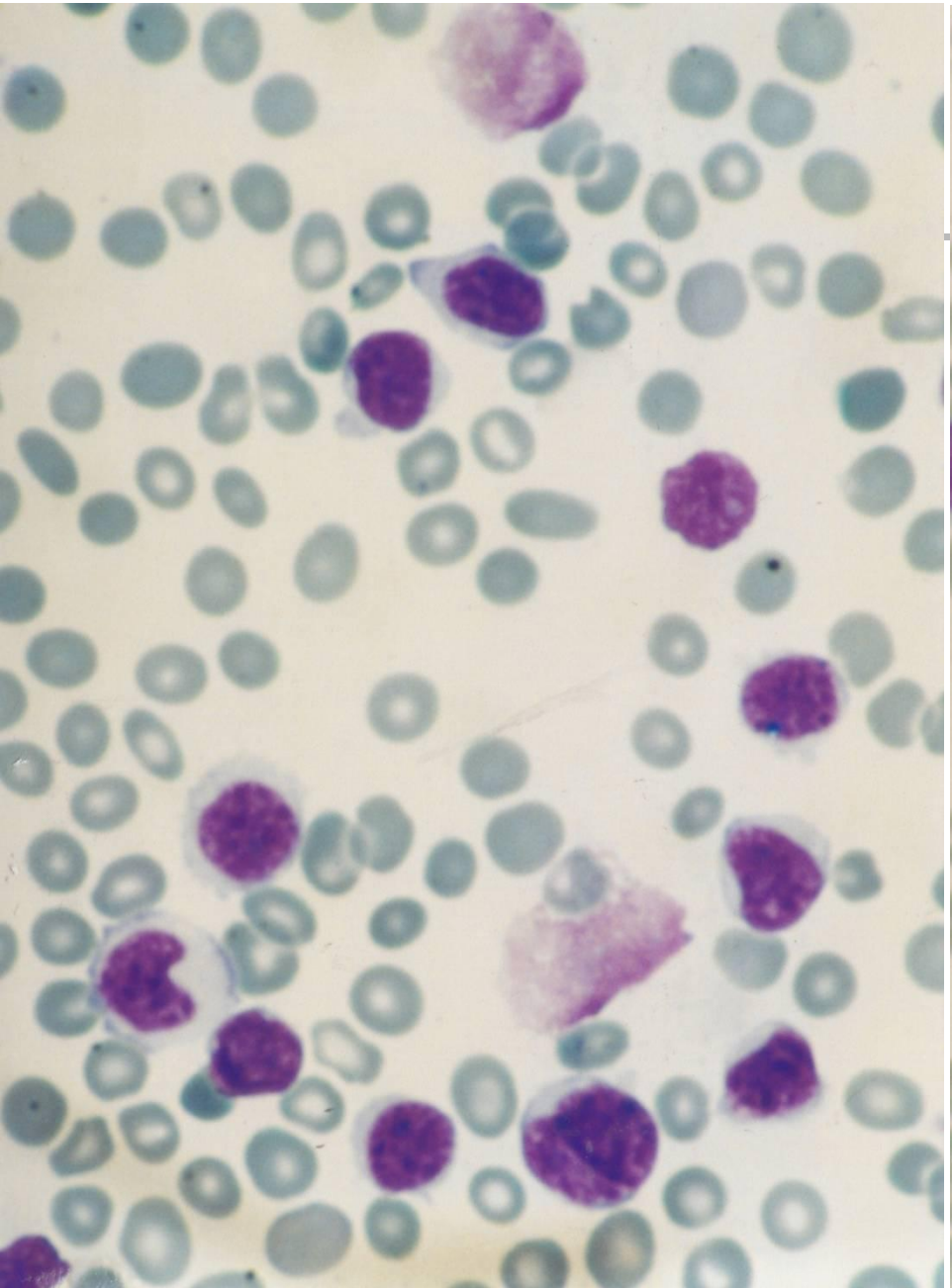
Absolute lymphocyte count should be greater than 5.0 x10^9/L.

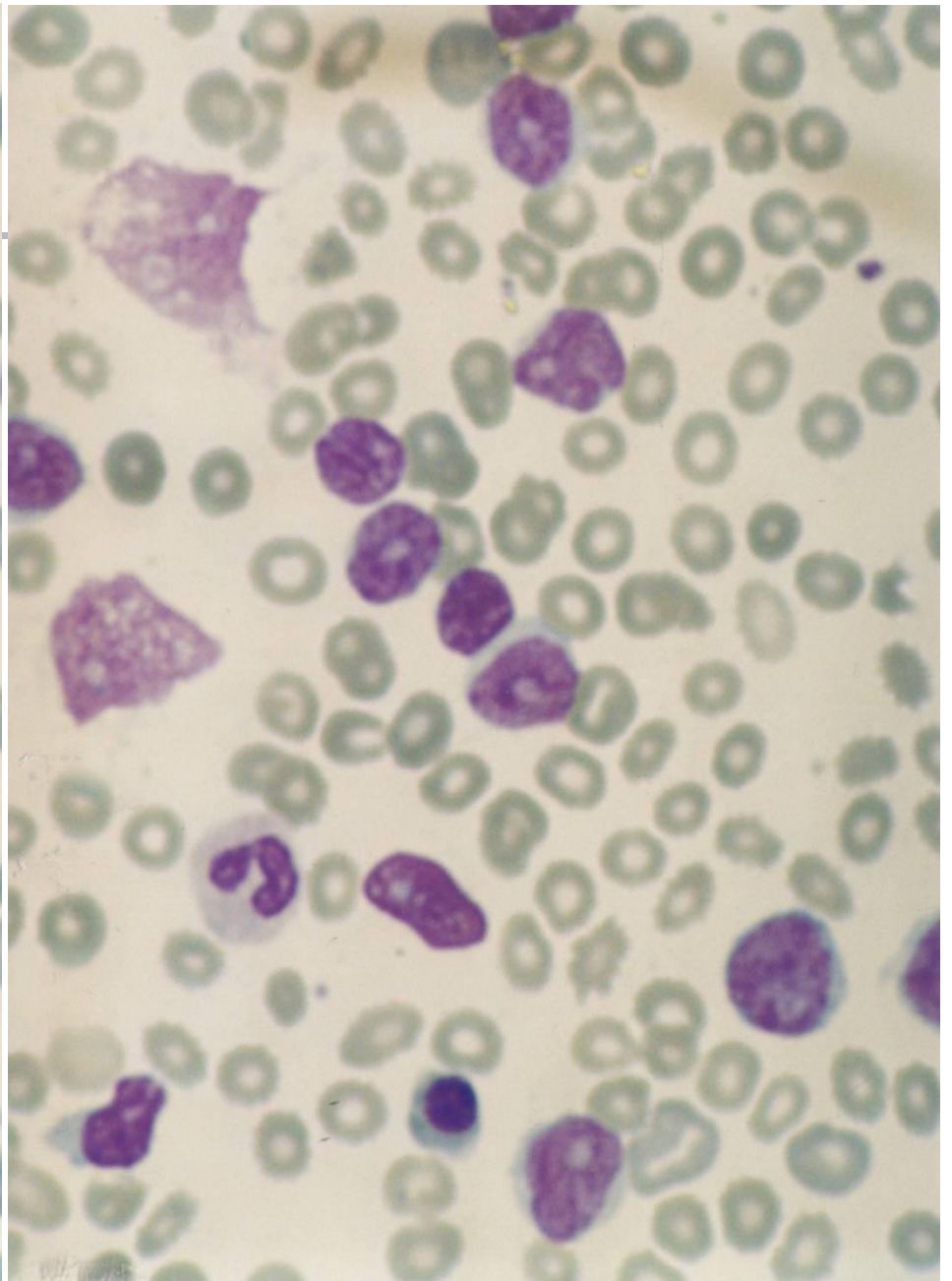
Patient age should be more than 30 years*.

Smudge cells should be reported if greater than 10 per 100 leukocytes. Report smudge cells in absolute numbers.

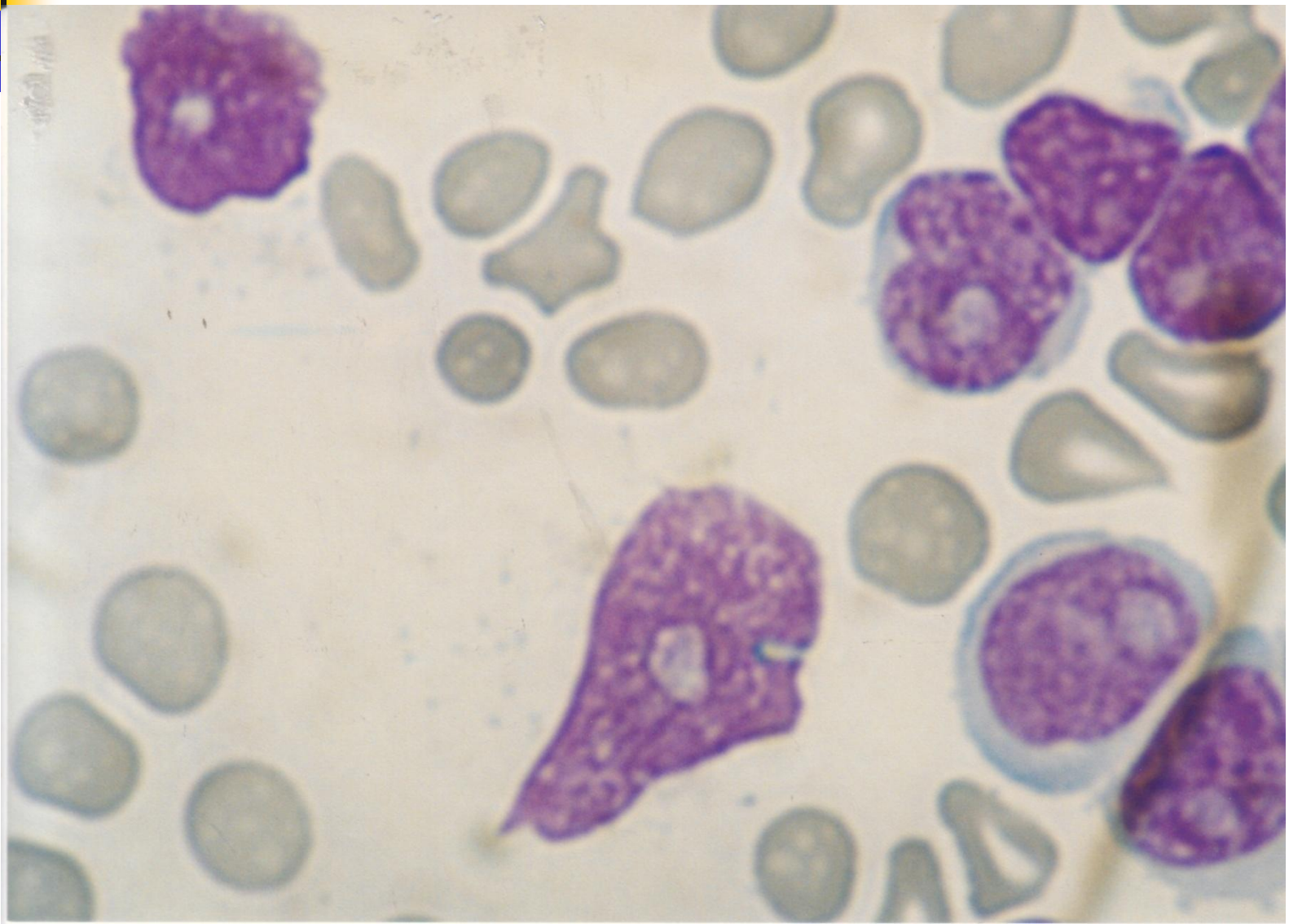
* Although CLL is not often diagnosed in patients under the age of 40, patients over 30 years of age should be considered potentially at risk. CLL is rare in patients under 30 years of age.

What are your diagnosis for these two films?





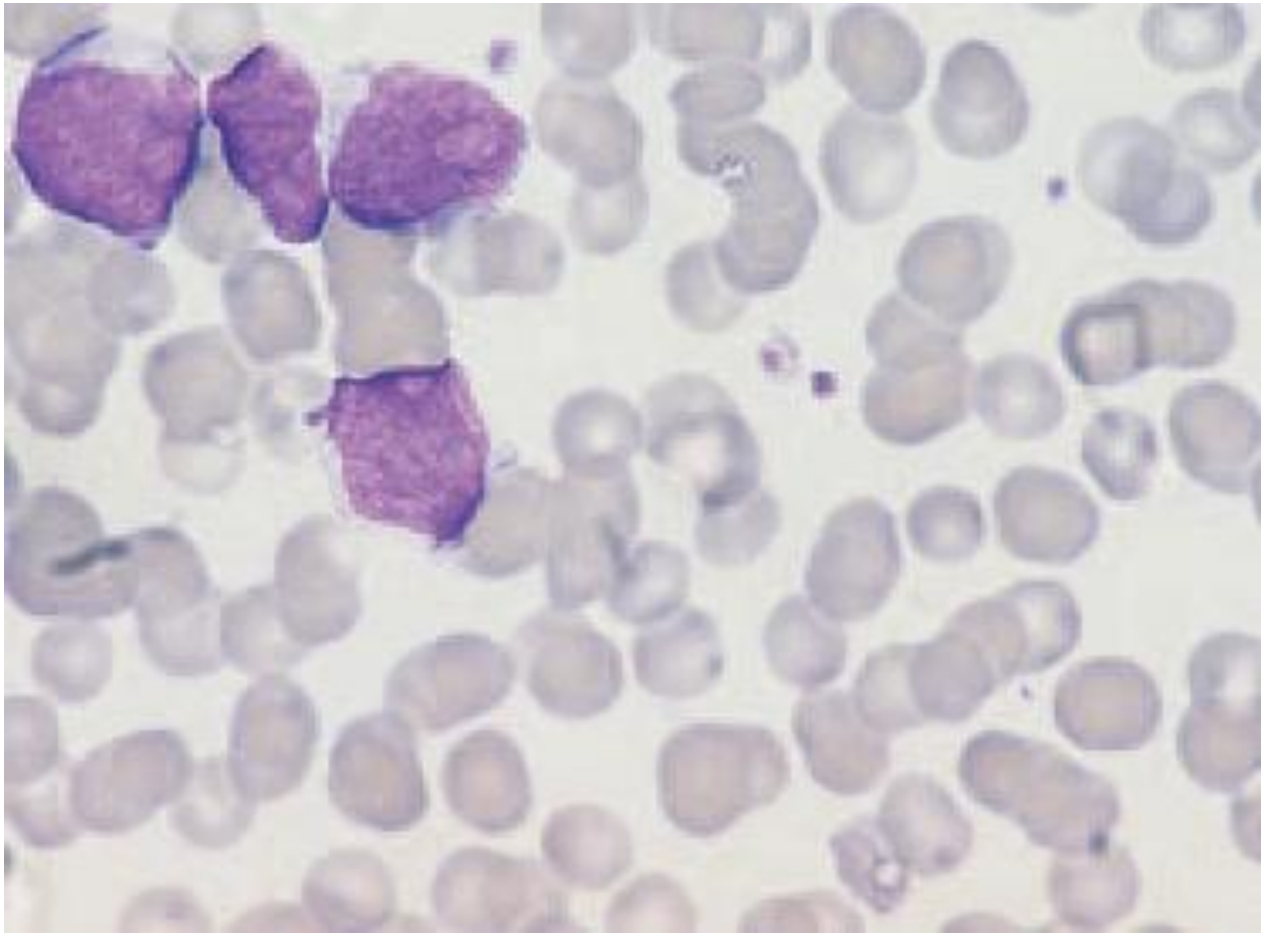
Higher magnification of previous film



CBC of a 45y/o female who has come to lab. for annual check up.

- WBC: 5500/µl
- RBC:4.58 x 10^{12}/µl
- Hb:12.8 g/dl
- Hct: 38.2%
- Plt: 195000/µl
- PBS???

What do you see in PBS?



Interpretation

- It is important that the spreader is wiped clean with a dry tissue or gauze square after each use since it is otherwise possible to transfer abnormal cells from one blood film to another

Microscopic Examination of the Blood Film

- The blood film should always be ***scanned under low power (10x to 40x objective)*** for unusual or abnormal cells and an acceptable cell distribution.
- Extend the examination from the area where approximately **50%** of the erythrocytes overlap to the region where erythrocytes show a strong tendency to linear orientation.

جدول گزارش دهی مرفولوژی گلبول قرمز

میانگین درصد سلول در هر میدان روغنی	۵-۱%	۱۵-۶%	۲۵-۱۶%	۲۵<%
نحوه گزارش	few	moderate	marked	grosely
نحوه گزارش	+	++	+++	++++

Grading scale

1(+)	2(++)	3(+++)	4(++++)
1-6 per oil imm. field	7-10 per OIF	11-20 per OIF	> 20 per OIF

Hypochromia (correlate with MCHC)

1+ : area of central pallor is ½ of cell diameter

2+ : area of central pallor is 2/3 of cell diameter

3+ : area of central pallor is ¾ of cell diameter

4+ : thin rim of hemoglobin

Grade	+	++	+++
Interpretation	Slight/ A few number	Moderate/ Moderate number	marked/ numerous
Microcytosis	MCV : 70 - 79	MCV : 60 - 69	MCV <60
Macrocytosis	MCV : 100 - 115	MCV : 115 - 125	MCV >125
Hypochromasia	MCH : 23 - 26	MCH : 21 - 23	MCH <20
Polychromasia	3 - 5%	5 - 25%	>25%
Spherocytosis	1 - 5%	5 - 25%	>25%
Schistocytosis	up to 2%	2 - 25%	>25%

Grade	+	++	+++
Interpretation	Slight/ A few number	Moderate/ Moderate number	marked/ numerous
Target cells (codocytes)	up to 3%	3 - 25%	>25%
Tear drops	up to 2%	2 - 25%	>25%
Burr cells	1 - 3%	3 - 10%	>10%
Sickle cell(drepanocytes)	3 - 5%	5 - 25%	>25%
Elliptocytosis	1 - 5%	5 - 25%	>25%
Basophilic stipplings	up to 2%	2 - 25%	>25%
Howell Jolly bodies	up to 1%	2 - 3 %	>3%
Anisocytosis	RDW: 16-18	RDW : 18-22	RDW>22

Hematologic values for normal infants

	Birth	Day 3	Day 7	Day 14	1Month	2Months	3-6Months
RBC $X10^6/l$	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
Hemoglobin g/dl	18.0±4.0	18.0±3.0	17.5±4.0	16.5±4.0	14.0±2.5	11.2±1.8	12.6±1.5
Hct(PCV)	60±15	56±11	54±12	51±20	43±10	35±7	35±5
MCV fl	110±10	105±13	107±19	105±19	104±12	95±8	76±8
MCH pg	34±3.0	34±3.0	34±3.0	34±3.0	33±3.0	30±3.0	27±3.0
MCHC g/dl	33±3.0-	33±4.0	33±5.0	33±5.0	33±4.0	32±3.5	33±3.0
Retic ($X10^9/l$) %	(120-400) 1.8-5.8	(50-350) 1.3-4.7	(50-100) 0.2-1.4	(50-100) 0-1	(20-60) 0.2-1.0	(30-50) 0.8-2.8	(40-100) 0.5-1.5
WBC $X10^9/l$	18±8.0	15±8.0	14±8.0	14±8.0	12±7.0	10±5.0	12±6.0
Neutrophils ($X10^9/l$) %	(4-14) 37-67	(3-5)30-60	(3-6) 30-65	(3-7) 30-70	(3-9) 30-80	(1-5)2 0-50	(1-6)2 0-65
Band ($X10^9/l$) %	(0.8-2) 4-14	(0.7-1.8)3-11	(0.7-1.5)3-9	(0.1-1.5)1-9	(0-0.6)0-5	(0-0.6)0-5	(0-0.6)0-5
Lymphocytes($X10^9/l$)%	(3-8)18-38	(2-8)16-46	(3-9)24-54	(3-9)30-62	(3-16)41-61	(4-10)42-72	(4-12)45-75
Monocytes($X10^9/l$) %	(0.5-2.0) 1-12	(0.5-1.0) 3-14	(0.1-1.7) 4-17	(0.1-1.7) 4-17	(0.3-1.0) 2-15	(0.4-1.2)3-14	(0.2-1.2)2-11
Eosinophils ($X10^9/l$) %	(0.1-1.0) 1-4	(0.1-2.0) 1-5	(0.1-0.8) 2-6	(0.1-0.9) 1-5	(0.2-1.0)1-5	(0.1-1.0) 1-4	(0.1-1.0) 1-4
Plt $X10^9/l$	100-450	210-500	160-500	170-500	200-500	210-650	200-550
RDW %	11.5-14.5	11.5-14.5	11.5-14.5	11.5-14.5	11.5-14.5	11.5-14.5	11.5-14.5

Hematologic values for normal children

	1 year	2-6 years	6-12 years
RBC $X10^6$/l	**4.5±0.6**	**4.6±0.6**	**4.6±0.6**
Hemoglobin g/dl	**12.6±1.5**	**12.5±1.5**	**13.5±2.0**
Hct(PCV)	**34±4.0**	**37±3.0**	**40±5.0**
MCV fl	**78±6.0**	**81±6.0**	**86±9.0**
MCH pg	**27±2.0**	**27±3.0**	**29±4.0**
MCHC g/dl	**34±2.0**	**34±3.0**	**34±3.0**
Retic $X10^9$/l	**30-100**	**30-100**	**30-100**
WBC $X10^9$/l	**11±5.0**	**10±5.0**	**9±4**
Neutrophils($X10^9$/l) %	**(1-7) 22-46**	**(1.5-8) 30-60**	**(2-8) 35-65**
Band($X10^9$/l) %	**(0-0.5) 0-5**	**(0-0.5) 0-5**	**(0-0.5) 0-5**
Lymphocytes($X10^9$/l) %	**(3.5-11) 37-73**	**(6-9) 29-65**	**(1-5) 23-53**
Monocytes($X10^9$/l) %	**(0.2-1.0) 2-11**	**(0.2-1.0) 2-11**	**(0.2-1.0) 2-11**
Eosinophils ($X10^9$/l) %	**(0.1-1.0) 1-4**	**(0.1-1.0) 1-4**	**(0.1-1.0) 1-4**
Plt $X10^9$/l	**200-550**	**200-490**	**170-450**
RDW %	**11.5-14.5**	**11.5-14.5**	**11.5-14.5**

جدول آرتیفکت های هماتولوژی

سلول واقعی	سلول آرتیفکت	علت ایجاد	تشخیص افتراقی
Burr cell	Crenated cell / speculated cell	خشک شدن آرام گسترش / مجاورت طولانی خون با ضدانعقاد(EDTA)	در حالت آرتی فکت کلیه گلبول ها درگیر می شوند
RBC Hypochrom	Torocyte (donought cell)	ضخیم بودن اسمیر / وجود آب در متانل و رنگ / ورود بخار آب ناشی از رطوبت محیط به متانل ورنگ	دور ناحیه کمرنگ ناشی از ارتیفکت (توروسیت) را میتوان با مداد خط کشید / عمئتا در ناحیه ضخیم دیده میشوند

جدول آرتیفکت های هماتولوژی

سلول واقعی	سلول آرتیفکت	علت ایجاد	تشخیص افتراقی
sphrocyte	Sphroid form	مجاورت طولانی خون با ضدانعقاد(EDTA) ضربه مکانیکی حین کشیدن اسمیر	اسفروئید فرم ها در انتهای گسترش دیده می شود و کوچکتر و زاویه دار میباشند .
Sickle cell	Selenoid body or cresent cell	ضربه مکانیکی حین کشیدن اسمیر	کرسنت سل یا سلنوئید بادی در انتهای گسترش دیده می شوند و نسبتا هیپوکروم می باشند .

جدول آرتیفکت های هماتولوژی

سلول واقعی	سلول آرتیفکت	علت ایجاد	تشخیص افتراقی
Eliptocyte	Psudoeliptocyte	ضربه مکانیکی حین کشیدن اسمیر	دارای انتهای ناصاف و همگی در یک جهت کشیده شده اند و معمولا در انتهای گسترش دیده می شوند
Normal platelet	Crenated & giant plat & micro plat	مجاورت طولانی خون با ضدانعقاد(EDTA)	تنظیم زمان مناسب جهت تهیه اسمیر و زمان نگاه داری خون

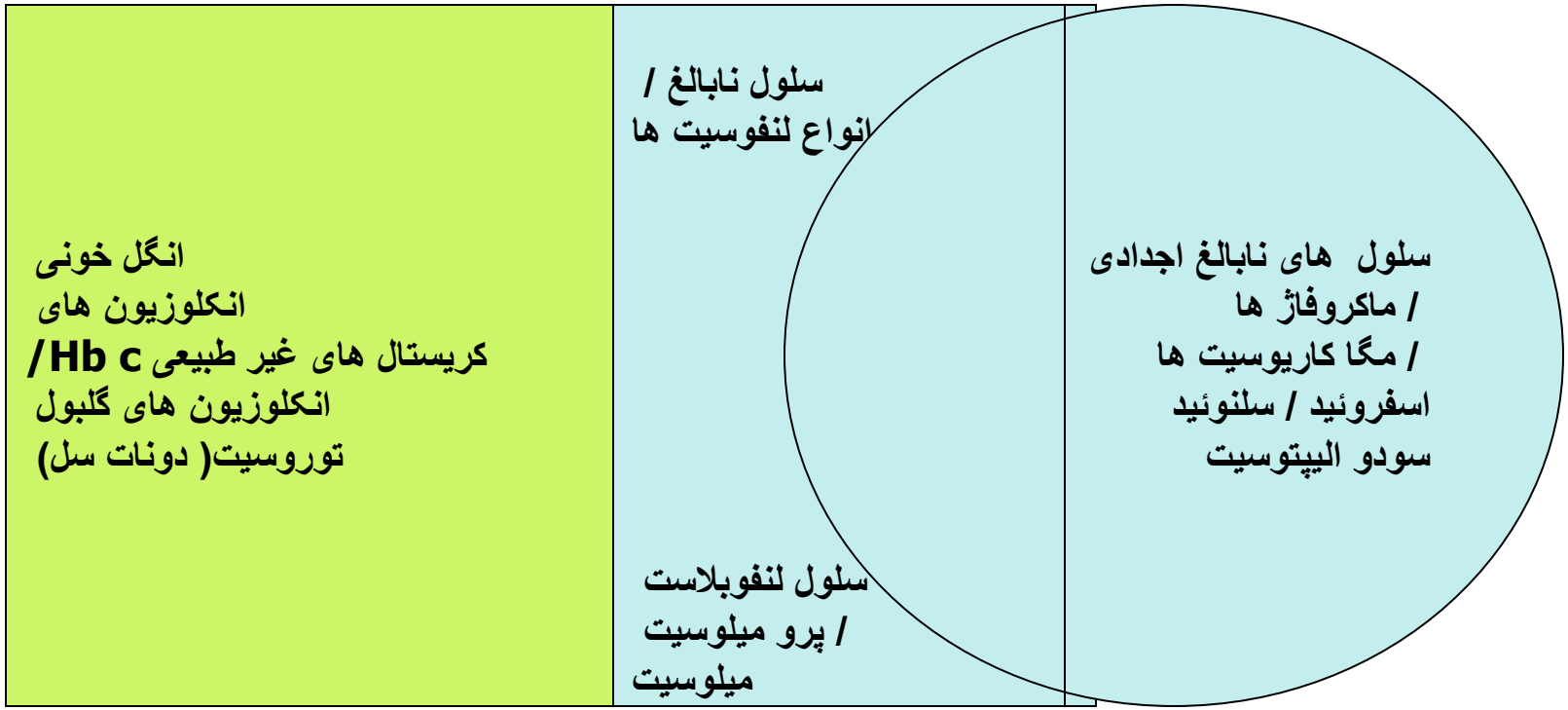
جدول آرتیفکت های هماتولوژی

سلول واقعی	سلول آرتیفکت	علت ایجاد	تشخیص افتراقی
Normal WBC	Disrupted cell	مجاورت طولانی خون با ضدانعقاد(EDTA) عدم تناسب خون با ضدانعقاد(EDTA)	از هم پاشیدگی هسته سلول سفید و لوبوله و واکوئیلیزه شدن سلول سفید ویژگی سلول تخریب شده سفید است
Apoptotic neutrophil	Pycnotic cell	مجاورت طولانی خون با ضدانعقاد(EDTA) چند ساعت پس از تزریق خون	این سلول ها درهر دو حالت شبیه هم بوده و هسته پیکنوزه دارای ۱۰-۱ توده هموژن می باشد

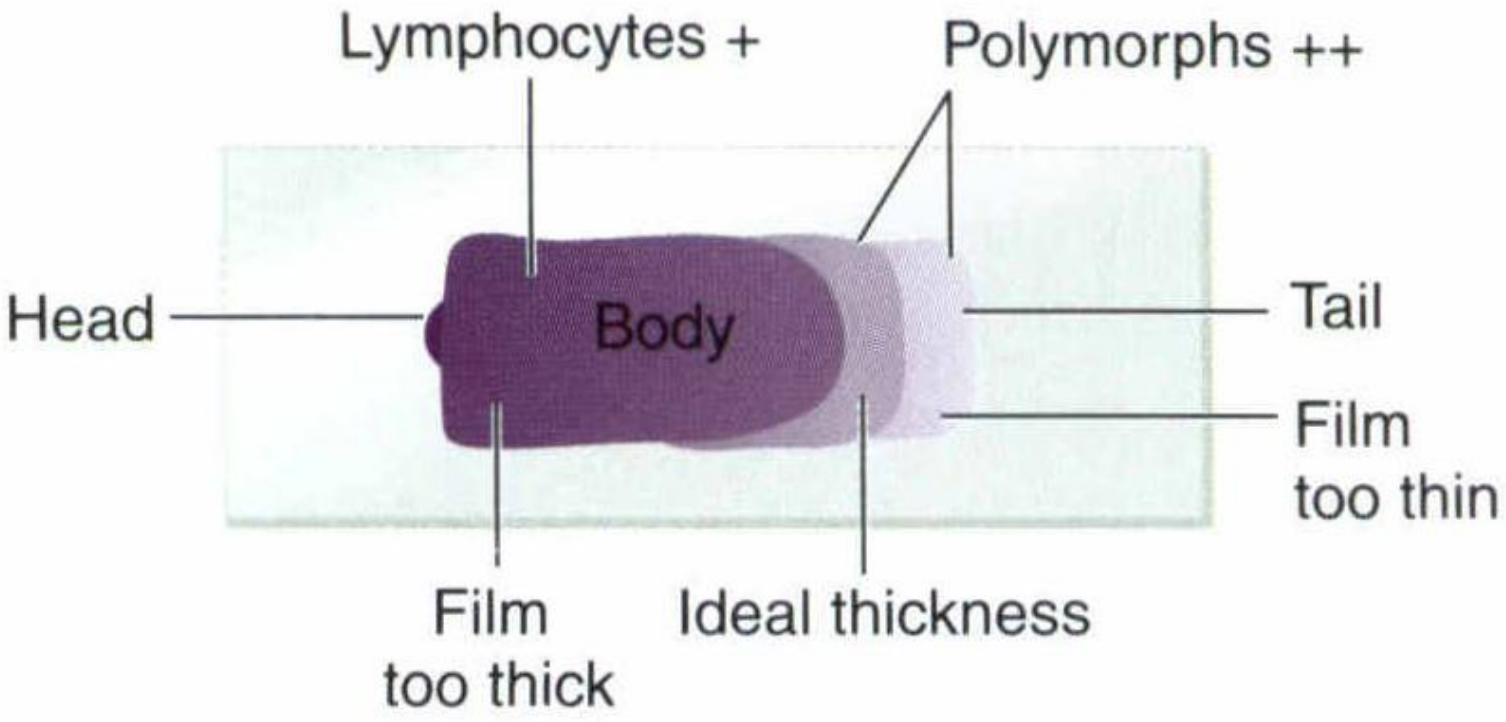
جدول آرتیفکت های هماتولوژی

سلول واقعی	سلول آرتیفکت	علت ایجاد	تشخیص افتراقی
Target cell	Psudo Target	تعجیل در خشک کردن اسمیر (فوت کردن یا حرارت) ضربه مکانیکی حین کشیدن اسمیر	سودو تارگت حالتی است که انگار یک تکه از سلول قرمز را کنده و در مرکز سلول قرار داده اند
Tear drop	Psudo tear drop	بد کشیدن اسمیر	تیر دراپ کاذب در یک جهت دیده می شوند
Stomatocyte	Stomatocyt oid cell	دیر خشک شدن گسترش	تعداد سلول استوماتوسیتوئید ارتیفکت معمولا بسیار کم و محدود می باشد

Counting area



Distribution of White Blood Cells



Reference renge

age	NRBC	age	Retic	age	Band cell
birth	500/ mm3 10%	birth	3-7%	1 day	15%
1 day	200/ mm3 4%	upto 1 week	1-3%	mature	<4%
2 day	25/ mm3 0.5%	mature	0.5 -1.5%		
3 day	0.5/ mm3 0.1%				
1 week	rare				

نکات مهم در گزارش دهی مرفولوژی گلبول قرمز
تمایز میکروسیت و ماکروسیت

- تمایز میکروسیت و ماکروسیت بایستی بر اساس حجم سلول باشد نه براساس قطر سلول ولی چون در روی گسترش بایستی تعیین نمائیم از قطر استفاده می کنیم .
- معیار سنجش میکروسیت و ماکروسیت هسته لنف کوچک است اگر از هسته لنف کوچک بزرگتر باشد ماکروسیت و اگر کوچکتر باشد میکروسیت می نامیم. منتها در یک نوزاد وجود ماکروسیت فیزیولوژیک بوده و ارزش گزارش ندارد.

نکات مهم در گزارش دهی مرفولوژی گلبول قرمز

- گلبول های قرمز فاقد کم رنگی مرکزی شامل: اسفروسیت / تارگت / پلی کروماتوفیلیک / آکانتوسیت / الیپتوسیت / سیکل سل
- سلول داسی شکل حداقل بایستی دارای یک انتهای نوک تیز باشد
- اسفروسیت هایپرکروم کاذب بوده و در نوع اسفروسیتوز ارثی هموزیگوس بالای ۵۰% گلبول ها را شامل می شود .
- انکلوزیون های گلبول قرمز نظیر هاول جولی و هاینز بادی و هموگلوبین سی عمدتا پس از طحال برداری دیده می شوند .
- گزارش رولو در ناحیه ضخیم فاقد ارزش است(در رولو واقعی بایستی حداقل ۴ سلول قرمز روی هم باشد و توده ها در جهات مختلف در ناحیه میانی لام مشاهده شوند/ افتراق گلبول رولو و آگلوتینه شده در لام مرطوب عملی تر است)
- نکات بررسی انکلوزیون توپ گلفی Hb H مدت زمان رنگ حیاتی (یک ساعت) و یکسان بودن توزیع انکلوزیون اچ در گلبول قرمز می باشد(تشخیص افتراقی با بازوفیلینگ استیپلینگ عدم مشاهده هموگلوبین اچ در رنگ آمیزی ساده و عدم توزیع یکنواخت).
- انکلوزیون هینز بادی در رنگ امیزی حیاتی در حاشیه سلول دیده می شود .

نکات مهم در گزارش دهی مرفولوژی گلبول قرمز

- اشکال مرفولوژیک که تا ۵% در خون محیطی نرمال تلقی شده و بایستی گزارش شوند شامل : (هیپو کروم /میکروسیت / ماکروسیت / الیپتوسیت / پویکیلوسیتوزیس/ انیزوسیتوزیس)
- اشکال مرفولوژیک که حتی با درصد کمتر از ۵% پاتولوژیک می باشند و بایستی به آن توجه گردد: (سلول داسی شکل / بایت سل / سلول قطعه شده یا شیزوسیت)
- درصد گلبول قرمز حاوی بازوفیلیک استیپلینگ (با درصد بالا) بایستی در محاسبه نهائی درصد رتیک منظور و از درصد رتیک کسر گردد.

نکات مهم در گزارش دهی مرفولوژی گلبول قرمز
rare/ slight/few/mod/many
1+ …4+

- سایز :
- نورموسیت : ۸-۶ میکرون
- ماکروسیت : ۸< میکرون(عمدتا ماکرو اوالوسیت): انمی پرنی سیوز و مگالوبلاستیک /رتیکولوسیتوزیس / درمان کم خونی تغذیه ای / سیروز کبدی و هپاتیت (همراه با تارگت) /
- ژیگانتوسیت : ۱۰< میکرون
- رنگ: کمتر از یک سوم قطر گلبول رنگ پریده و کم رنگ باشد هیپوکروم اطلاق می گردد که عمدتا با میکروسیت همراه است /انولوسیت: هیپوکروم شدید به صورت یک حلقه نازک اطراف گلبول قرمز (همگلوبین ناچیز)

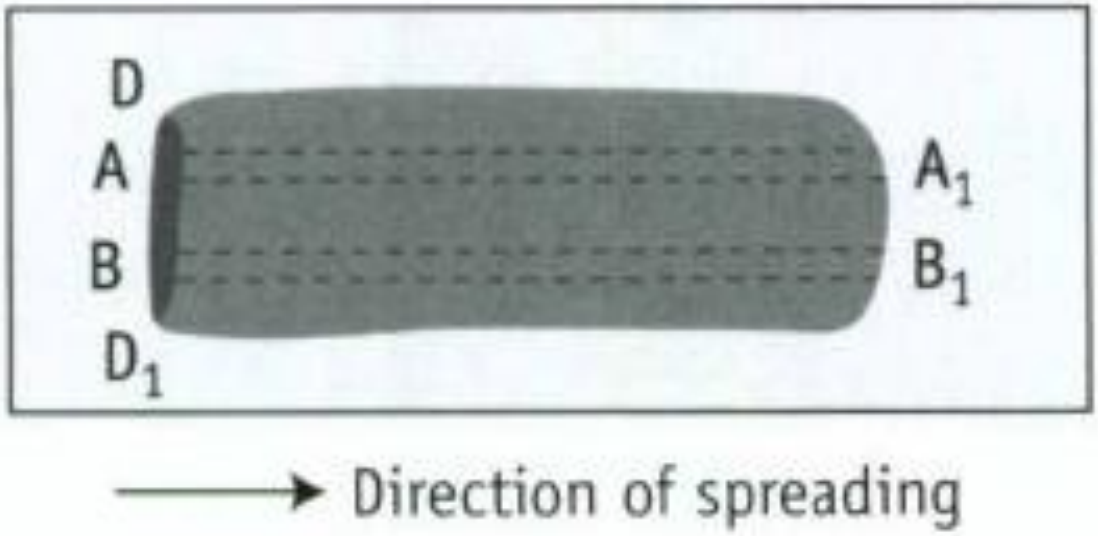
نکات مهم در گزارش دهی مرفولوژی گلبول سفید

- ۱- افتراق توکسیک گرانولیشن با توکسیک گرانولیشن کاذب (ارتیفکت ناشی از رسوب رنگ) کنترل سایر لام های رنگ آمیزی شده است اگر توکسیک در سایر لام ها نیز مشاهده گردید احتمال توکسیک ارتی فکت ناشی از رسوب رنگ بسیار بالا است و بایستی لام مجدد با رنگ تازه و فاقد رسوب تهیه نمود.
- ۲-اگر خون مدت طولانی در مجاورت ضد انعقاد دباشد و با تاخیر زیاد لام کشیده شود واکوئلیزاسیون کاذب سلول های سفید رخ می دهد که به دلیل بلع ذرات EDTA توسط سلول های سفید خون می باشد .
- ۳-گزارش قطعی سلول LE Cell مستلزم مشاهده حداقل دو سلول LE یا یک سلول LE و یک روزت rossete LE در دو نمونه پیاپی از بیمار می باشد (مشاهده صرف جسم لوپوس LE Body ضرورت تکرار تست را فراهم می کند)بهترین عدسی برای جستجوی لوپوس عدسی۴۰ می باشد.

نکات مهم در دیف سلولی

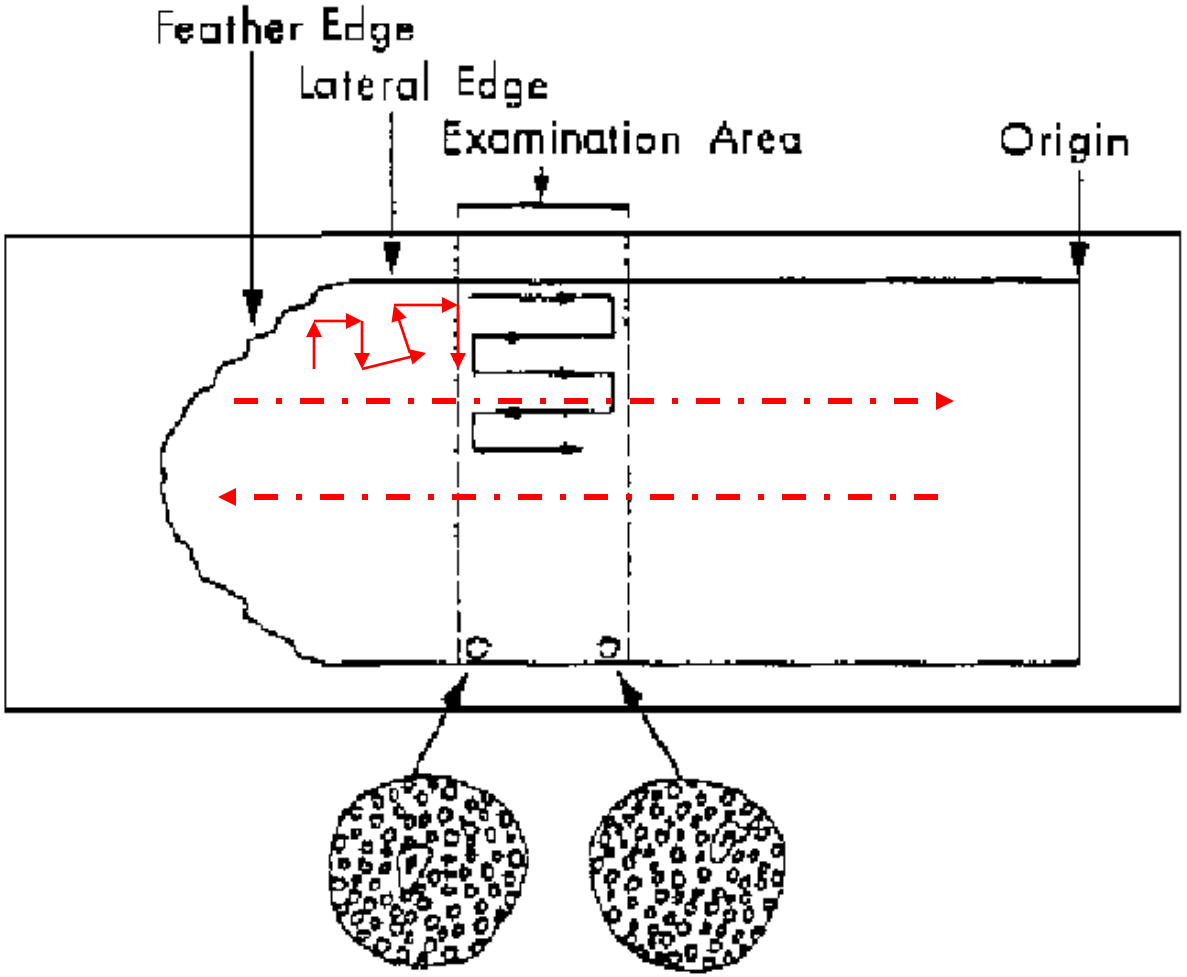
- دو روش دیف
- ۱- روش نواری از نازک به ضخیم
- ۲- روش زیگزاگی در قسمت نزدیک به انتهائی با ضخامت مناسب
- اگر در روش نواری تعداد سلول سفید دیف شده قبل از پایان نوار به عدد ۱۰۰ برسد بایستی تعداد بیشتری دیف کرد تا نوار کامل به انتها برسد و نهایتا با تناسب دیف در ۱۰۰ سلول را محاسبه نمود . دلیل آن توزیع غیر یکنواخت گلبول های سفید در سطح لام است لنفوسیت عمدتا در ناحیه ضخیم لام و نوتروفیل ها و منوسیت هاعمدتا دردر ناحیه نازک و انتهائی لام حضور دارند .

longitudinal method of performing differential leukocyte counts.



The original drop of blood spreads out between spreader and slide (D-D1), The film is made in such a way that representative strips of films, such as A-A, and B-B1 are formed from blood originally at A and B, respectively. To perform an accurate differential count, all the leucocytes in one or more strips, such as A-A, and B-B1 should be inspected and classified.

Leukocyte Differential Count



"battlement" track for this examination

The differential white cell count

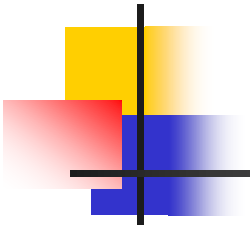
ICSH recommends that the differential leukocyte count be expressed in ***absolute numbers***

Absolute no.: Relative no.(%) x WBC

10000/µl x 0.50= 5000/µl

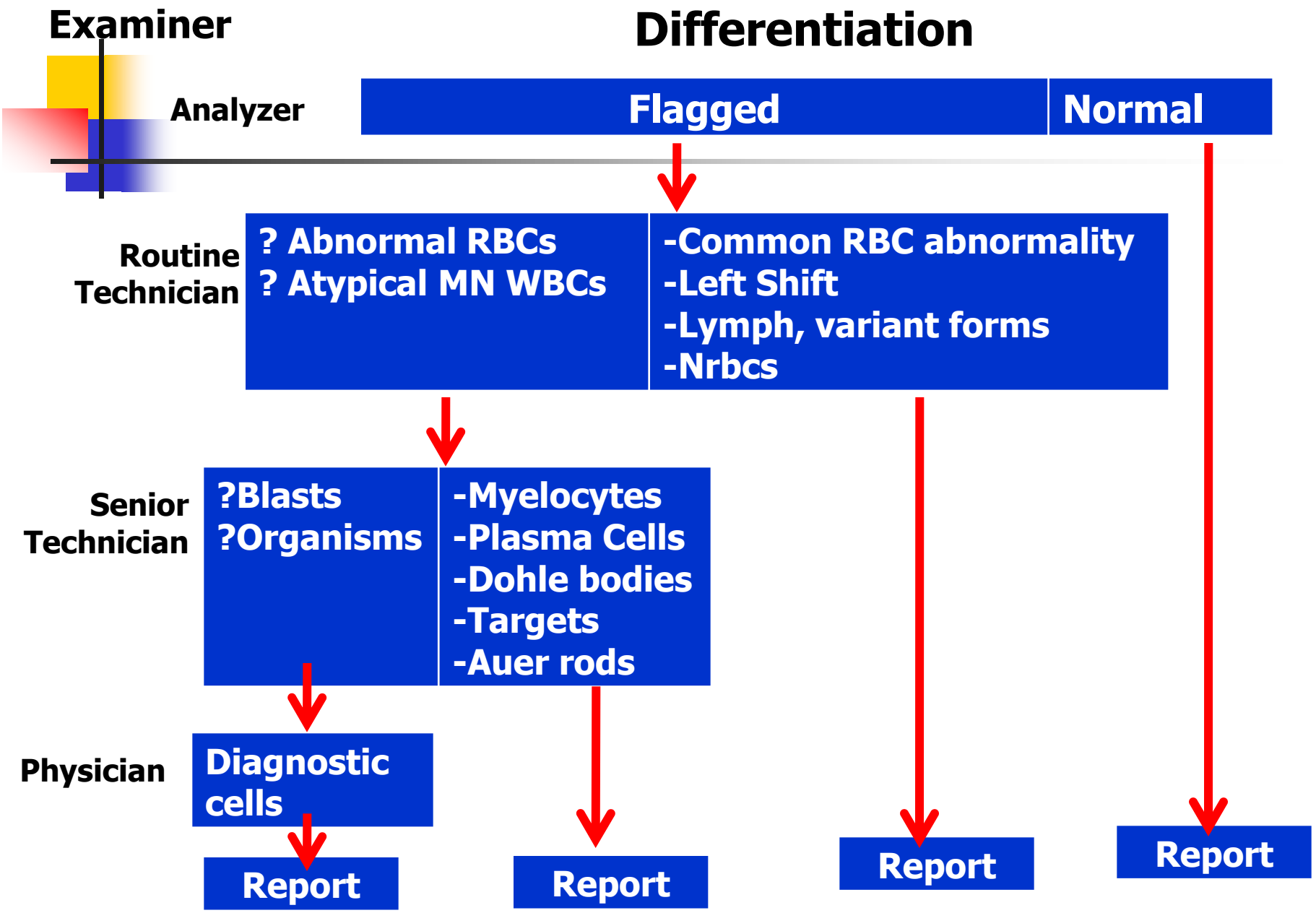
Manual differential counts are generally fairly accurate, but their **precision is poor**, whereas automated counts are generally **fairly precise** but are sometimes inaccurate.

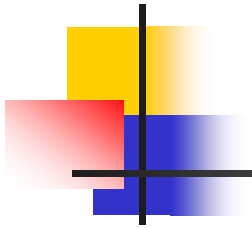
Tips on differential count



- There is no internationally agreed **reference method** for the manual differential count, though the CLSI has established a reference method.
- It uses a manually ***wedge-spread***, Romanowsky stained film. ***200 cells*** are counted by each of ***two trained observers*** using a ***'battlement'*** track
- The results are averaged to produce a ***400-cell*** differential count, which is then divided by four.

Hierarchical Blood Film Evaluation





How can you estimate the WBC from PBS?

Estimation of WBC

$$\frac{\text{Total number of leukocytes counted}^{*}}{5} \bullet 0.2 \times 10^{9}/L^{**} = \text{leukocytes} \times 10^{9}/L$$

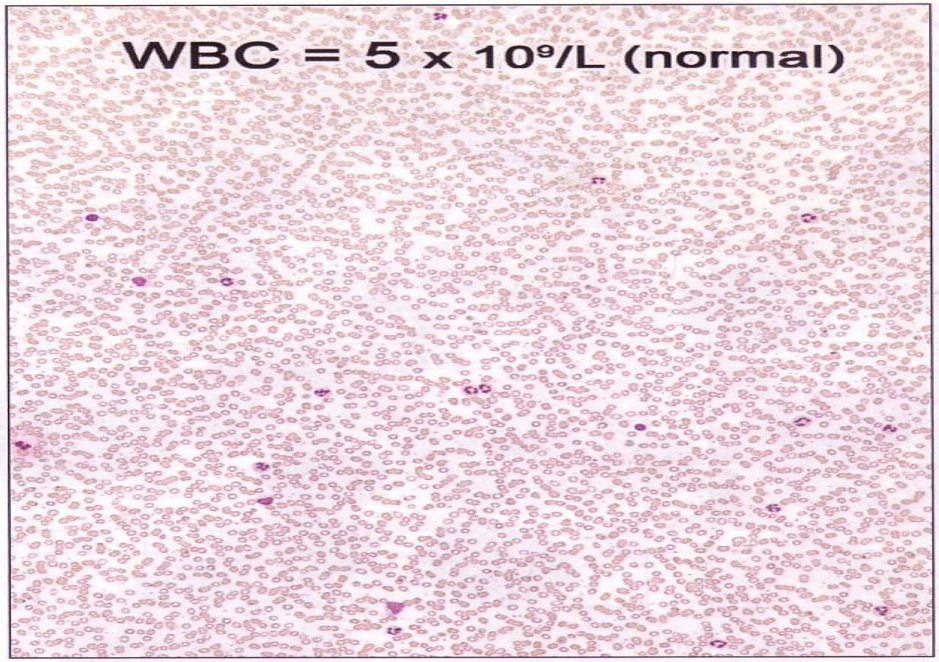
* Total number of leukocytes counted in 5 fields at 100x (10x objective) magnification

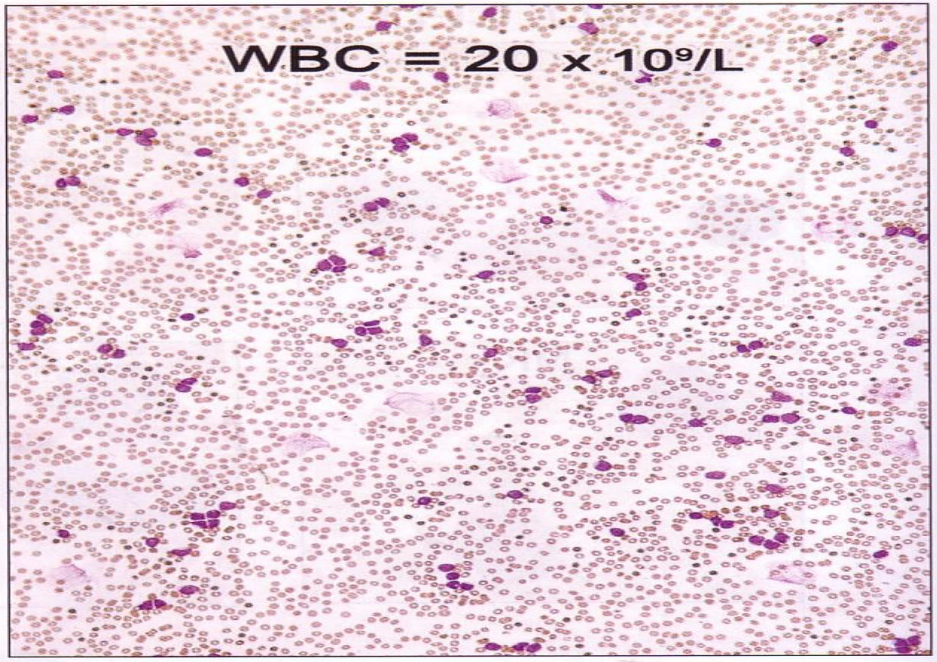
** 1 leukocyte = $0.2 \times 10^{9}/L$

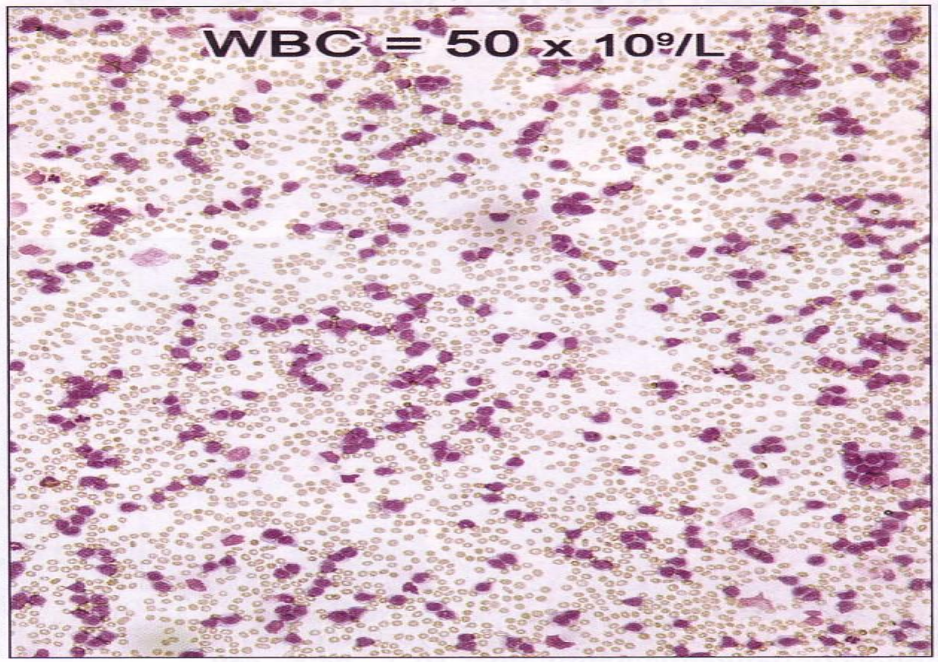
Example: If total number of leukocytes counted = 150

$150/5 \bullet 0.2 \times 10^{9}/L = 6.0 \times 10^{9}/L$

The leukocyte estimate should correlate with the leukocyte count **+/- 25%.**







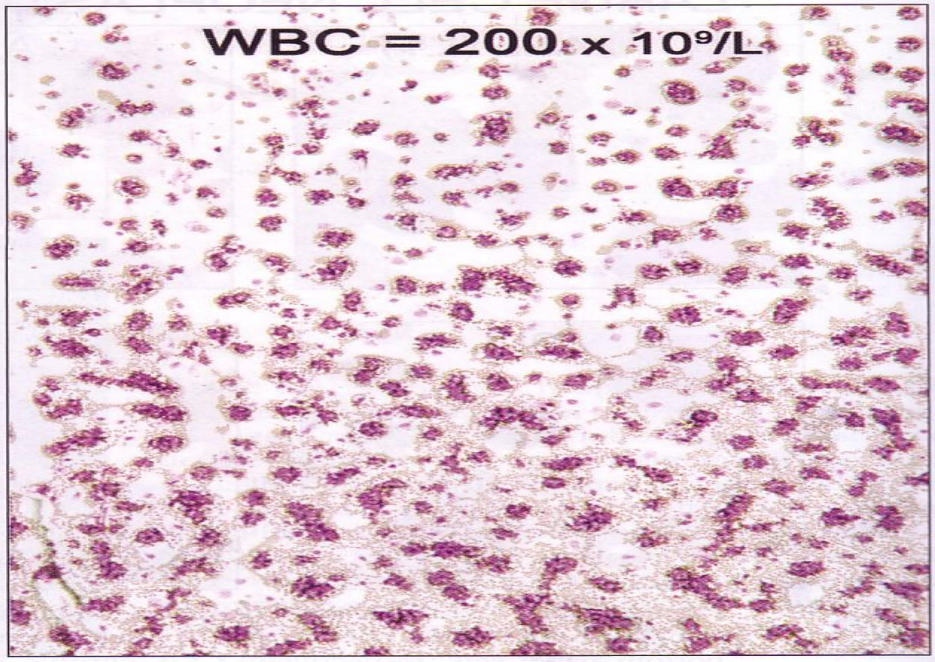


Figure 8.11. Leukocyte morphology: Low-power morphology. Leukocytes are best counted by automated hematology analyzers, but an approximate estimate of white cell numbers (the "leukocrit") can be done during examination at low magnification by comparing the ratio of white cells to erythrocytes (normal is approximately 1 to 500).

Causes of Spurious Increase in WBC

- Cryoglobulin,cryofibrinogen
- Heparin
- Monoclonal proteins
- Nucleated red blood cells
- **Corrected WBC= WBC x 100/Nrbc +100**
- Platelet clumping / Giant platelets
- Unlysed red blood cells / reticulocytosis

Corrected WBC

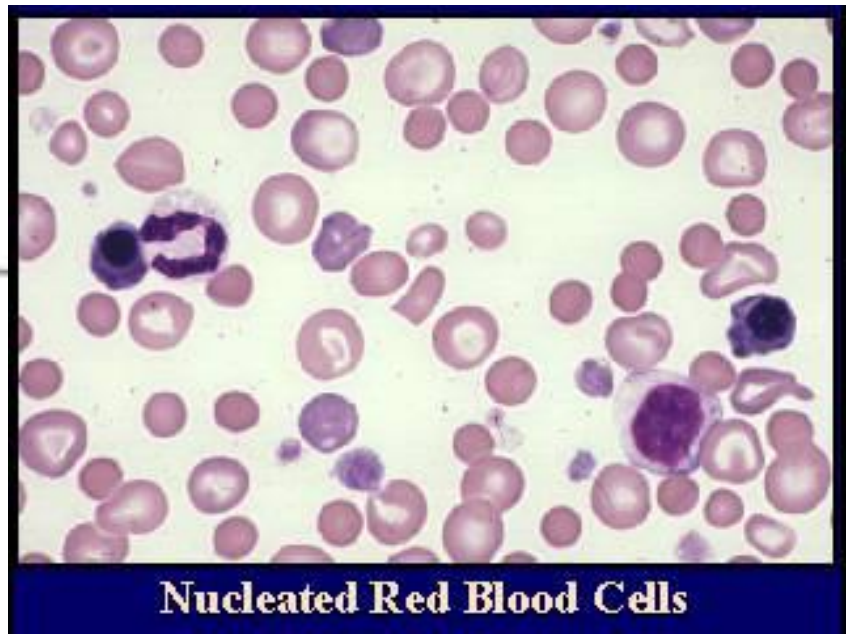
$$\frac{\text{Leukocyte count} \bullet 100}{100 + \text{number of nucleated erythrocytes}^{*}} = \text{Corrected Leukocyte Count}$$

*Number of nucleated erythrocytes counted per 100 leukocytes at 1000x (100x objective) magnification

Example: Leukocyte count = 20.0×10^9/L
Nucleated erythrocytes/100 leukocytes = 10

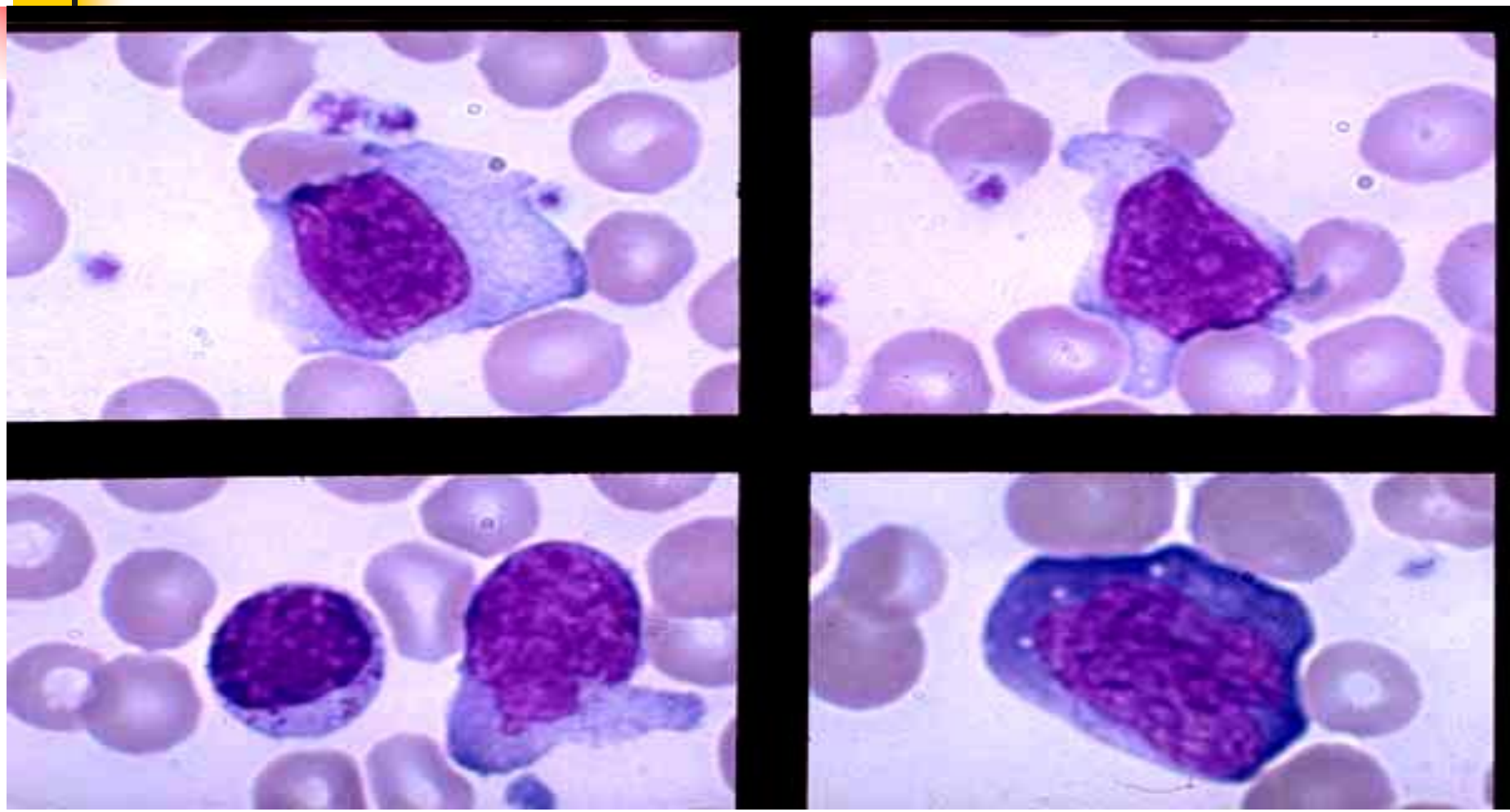
$$\frac{20.0 \times 10^9/L \bullet 100}{100 + 10} = 18.2 \times 10^9/L$$

Nrbc/100 wbc

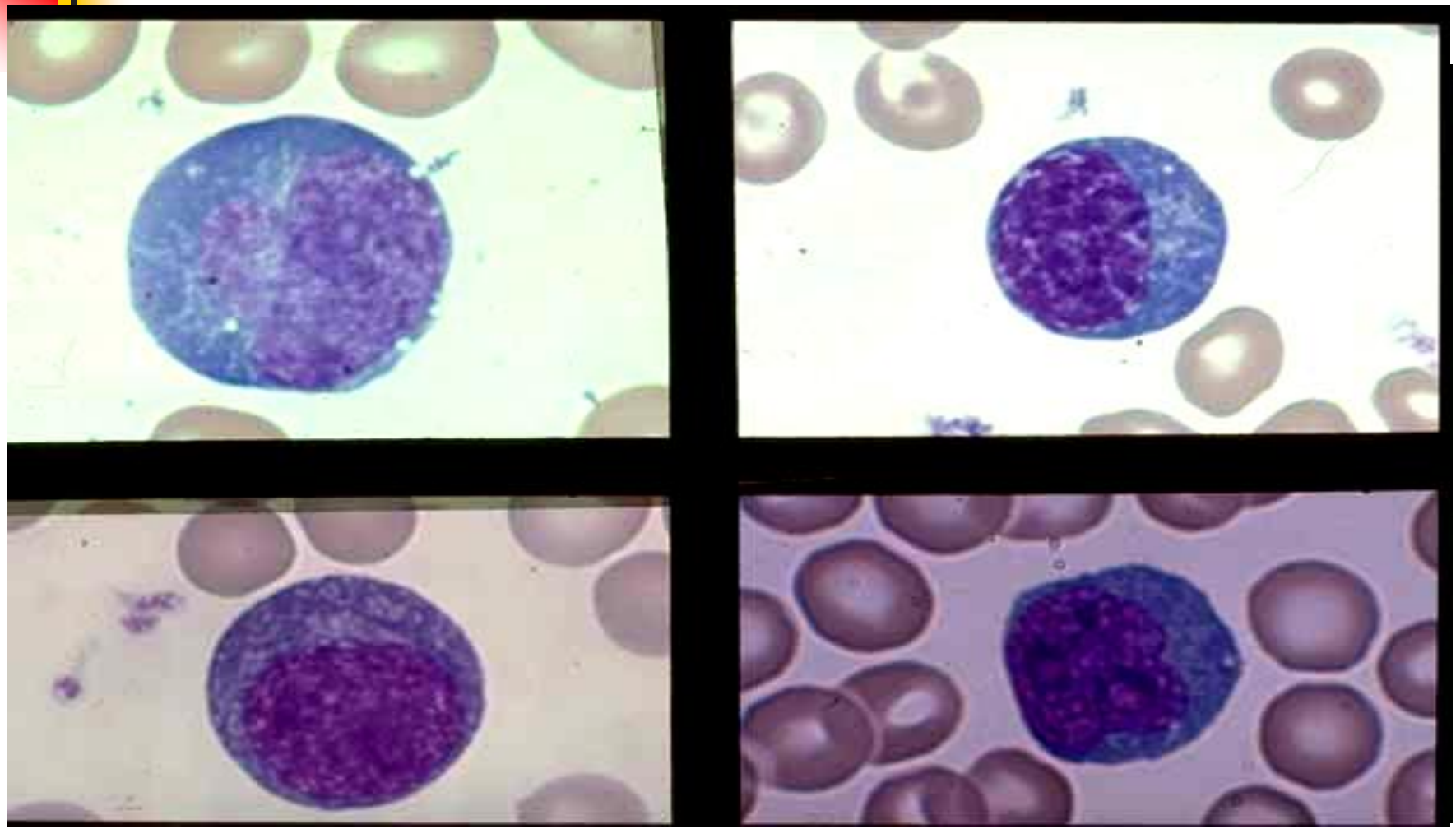

Nucleated Red Blood Cells

If 10 (5) or more Nrbc are observed , corrected WBC must be calculated

What do you see? How do you report?



What do you see? How do you report?



Lymphocytes, Variant Forms

- These cells can be ***normal physiologic variants*** or abnormal forms.
- These cells are large and quite variable in appearance. Several distinct types have been described.
- The terms "***atypical, reactive, Downey Cell, virocyte, Turk cells, activated lymph.***" etc., have been used to identify these cells.
- Because of confusion about the relationship of these cells to either benign or malignant processes, the subcommittee chose the **new term—lymphocytes, variant forms.**

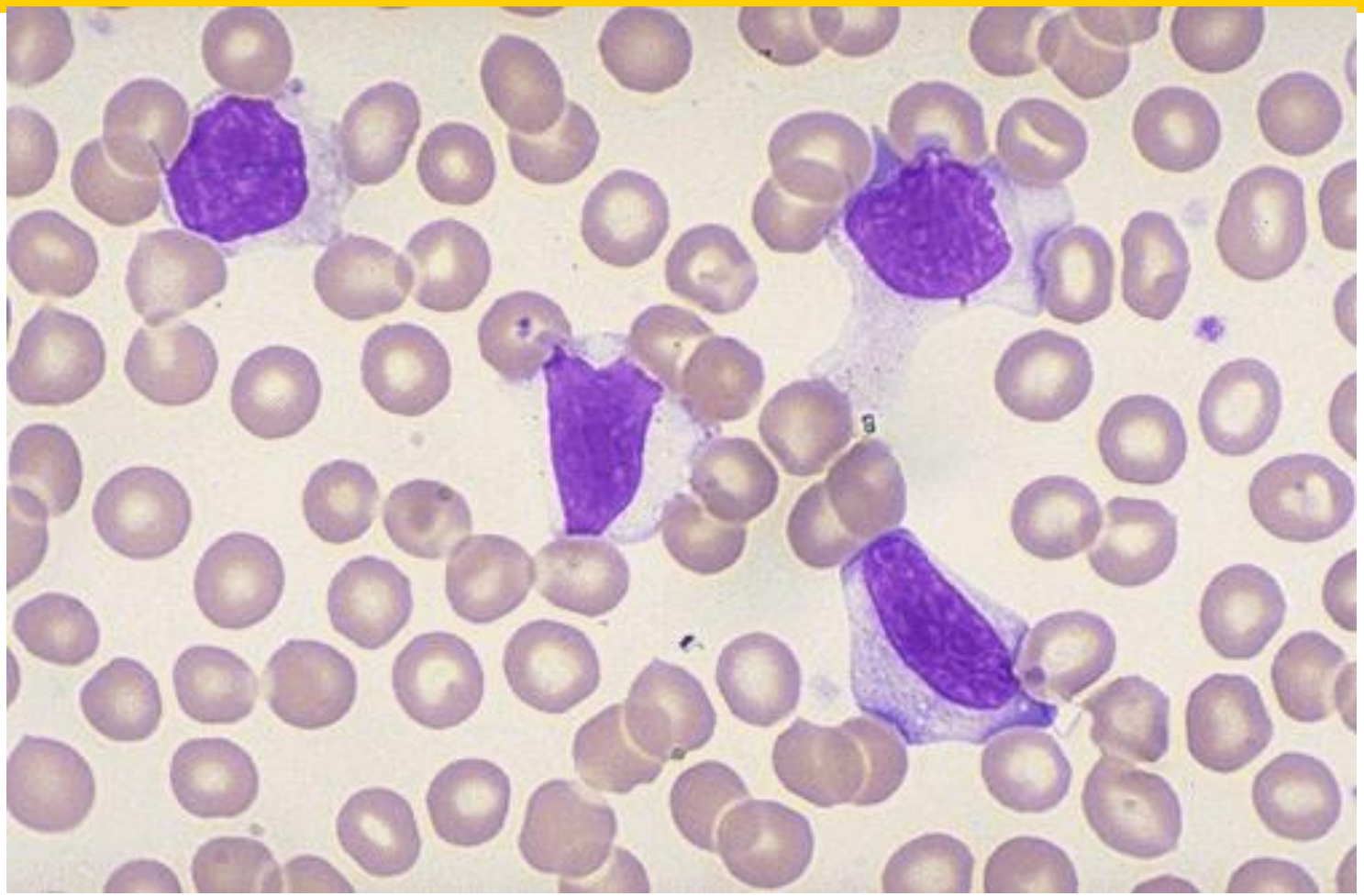
Lymphocytes, Variant Forms

- A normal differential count usually includes ***up to 6%*** of variant forms.
- Transitional forms between normal and variant lymphocytes are also found.
- In children in apparently good health, more immature-appearing lymphocytes with clear nucleoli are sometimes found.

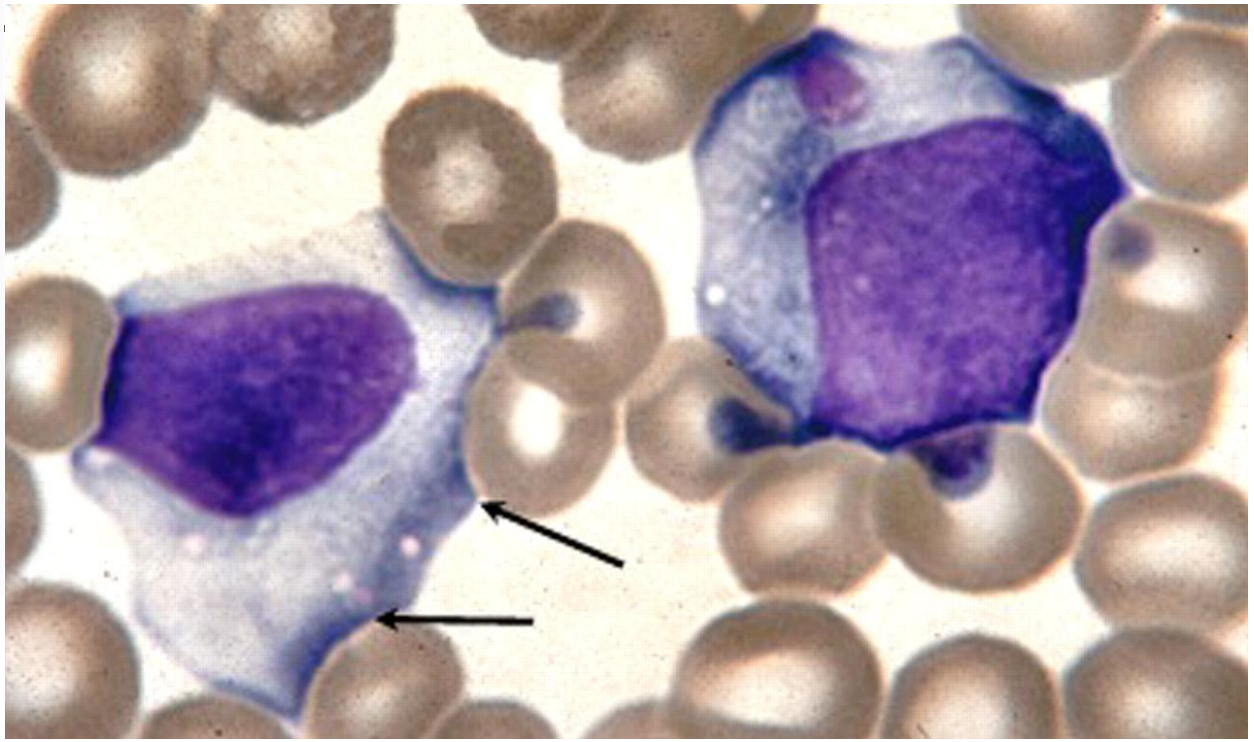
Comparison of Lymph normal & variant forms

Parameter	Mature	Lymph, Variant form
Size	**7-15 µl**	**10-25 µl**
N:C ratio	**5:1- 2:1**	**3:1-1:2**
Shape	Round to oval	Round, oval ,irregular
Nucleus	Round to oval	Variable
Chromatin	Dense, clumped	Variable
Nucleoli	None	None to multiple
Cytoplasm	Scant to moderate Pale to moderately Basophilic	Moderate to abundant Pale to deeply basophilic
Vacuoles	None	Occasional
Granules	Few, some cells	Some cells

The WBC's seen here are "**atypical" lymphocytes**. They are atypical because they are larger (more cytoplasm) and have nucleoli in their nuclei. The cytoplasm tends to be **indented by surrounding RBC's**. Such atypical lymphocytes are often associated with infectious mononucleosis.



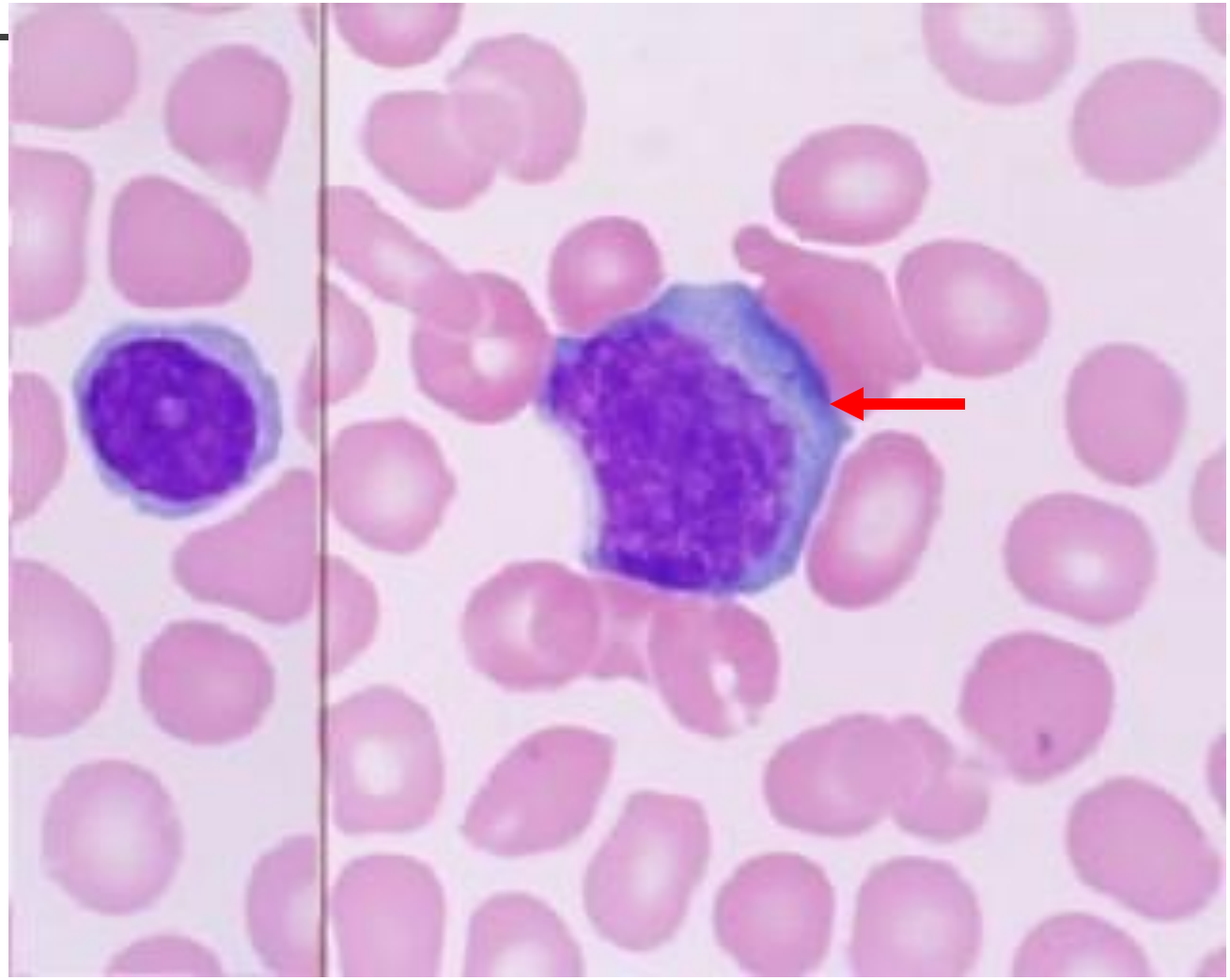
Large irregular atypical lymphocytes seen in the peripheral blood of a patient with infectious mononucleosis



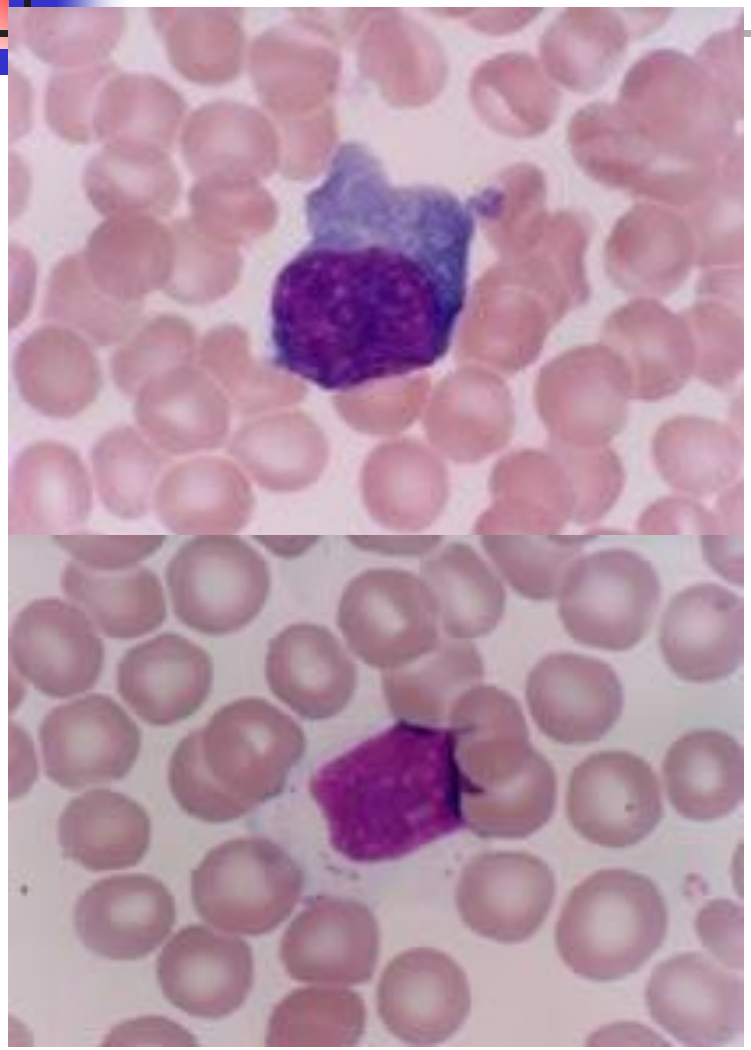
Maslak, P. et al. ASH Image Bank 2002;2002:100541

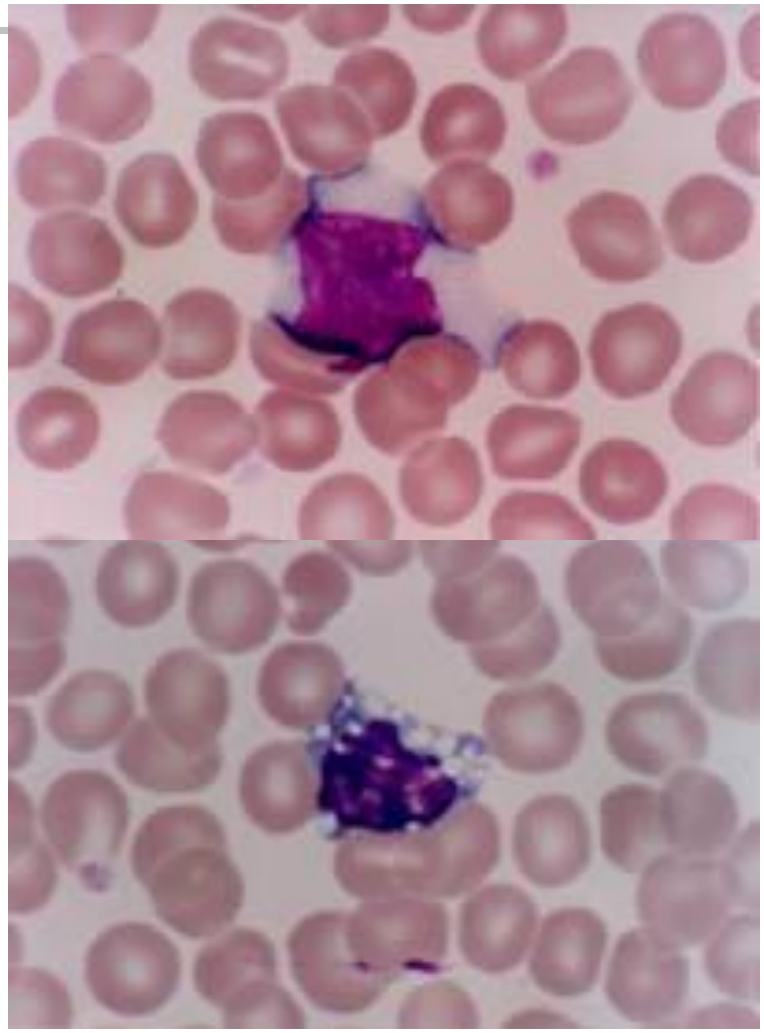
Copyright ©2002 American Society of Hematology. Copyright restrictions may apply.

Lymphocytes, Variant Forms

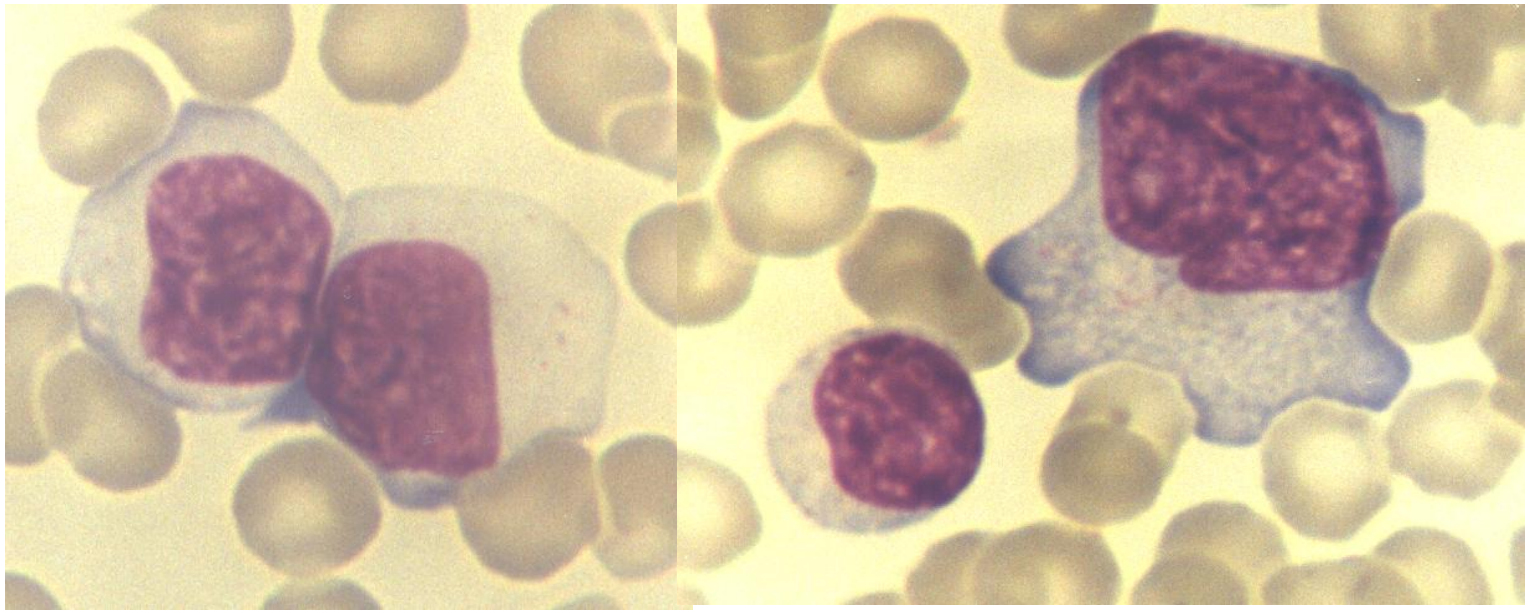


Lymphocytes, Variant Forms

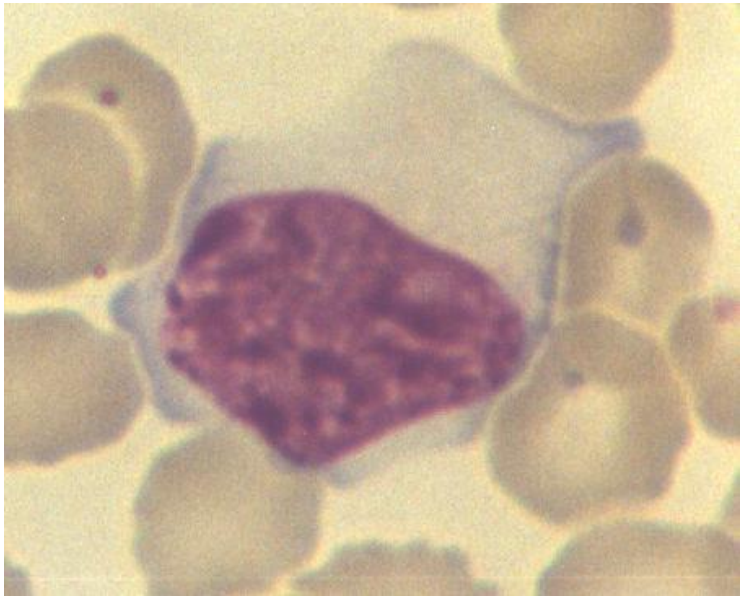


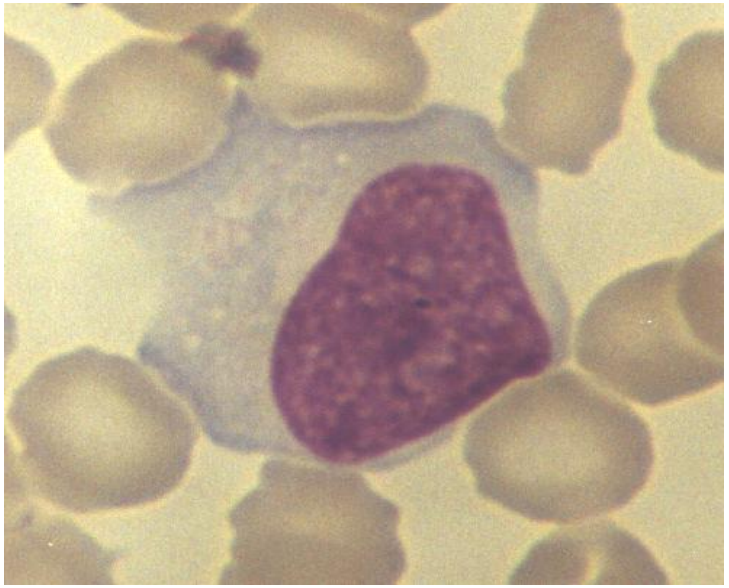


Lymphocytes, Variant Forms

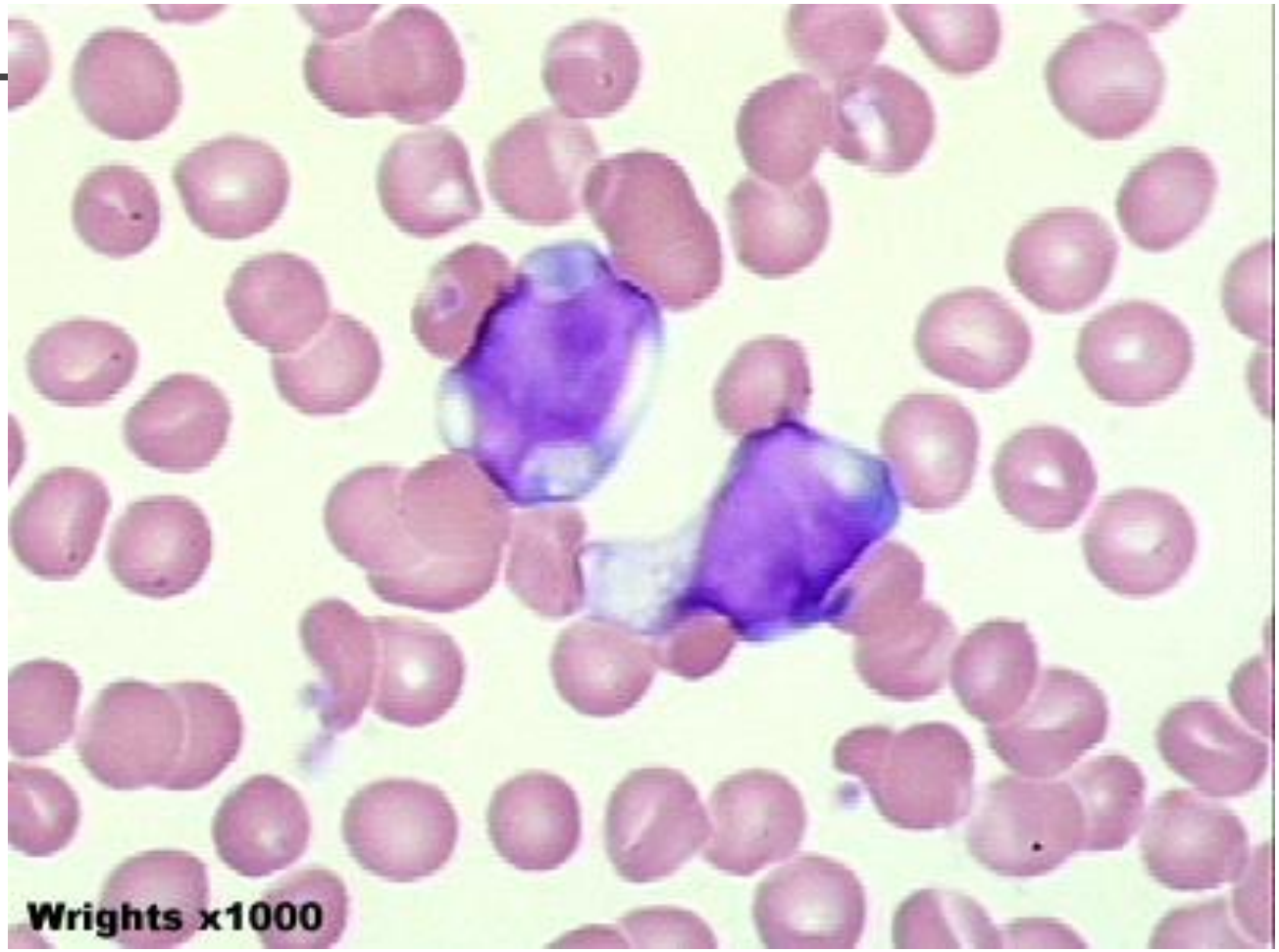


Lymphocytes, Variant Forms





Lymphocytes, Variant Forms



> 20% LVF

- Infectious Mononucleosis
- Viral Hepatitis
- Cytomegalovirus Infections
- Post Transfusion Syndromes
- Drugs (Phenytoin, PAS)

Report Format

As a discrete entity

Neutrophil:50%

Lymphocytes:25%

LVF:25%

As a part of Lymphocytes

Neutrophils:50%

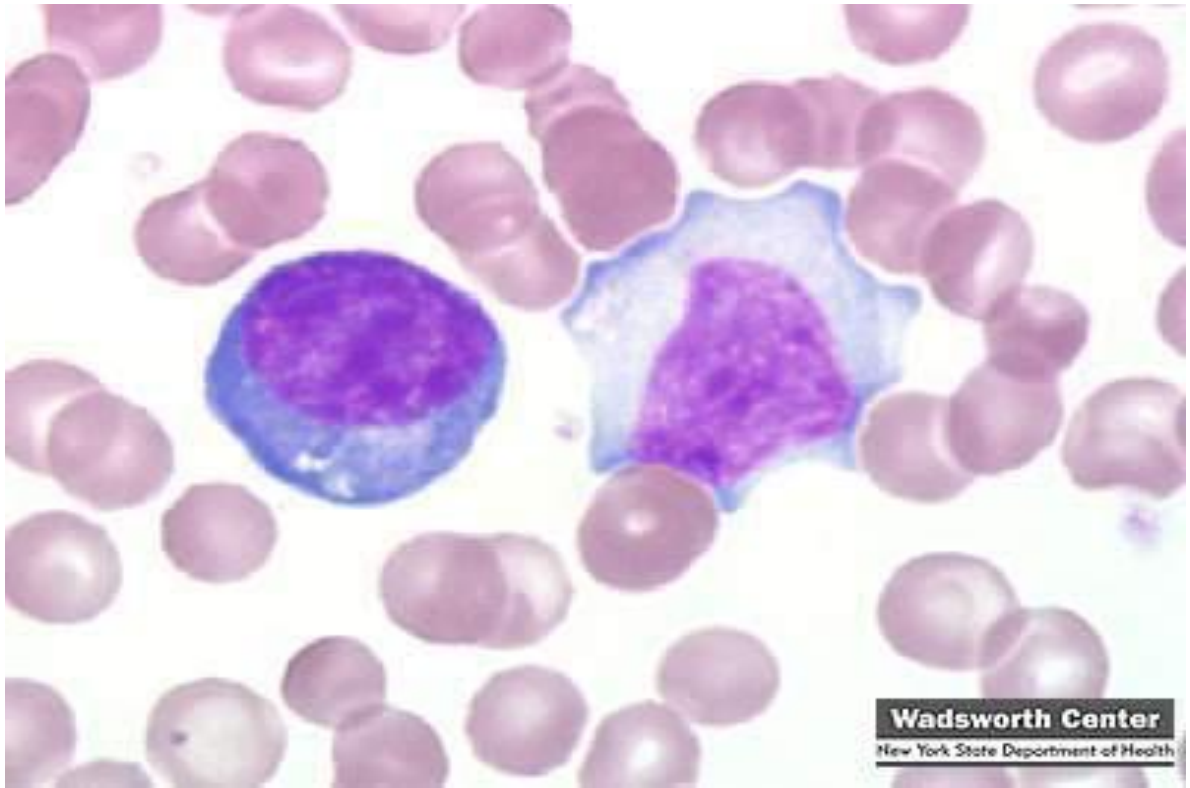
Lymphocytes:50%

50% of Lymph. were LVF.

LVF (atypical lymph) :Few(<6%)

Lymphocyte, variant form or Atypical lymphocyte

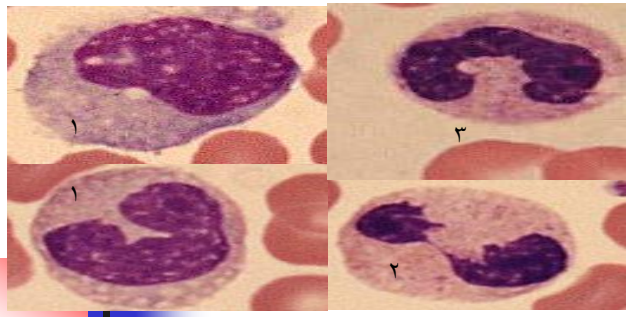
- ~~Lymphocyte, variant~~ form is a new terminology for atypical lymphocyte.
- In Normal individuals **<6%** (few)



Lymphocyte variant form may be mistaken with:

١. Monocytes

٢. Blasts



۱– مونوسیت، ۲– نوتروفیل ، ۳ –باند

مونوسیت

اندازه: ۱۵ تا ۲۵ میکرون

شکل:گرد یا بیضی

نسبت هسته به سیتوپلاسم:متوسط یا کم

شکل هسته: نامنظم ودارای پیچ خوردگی.گاهی کلیوی شکل

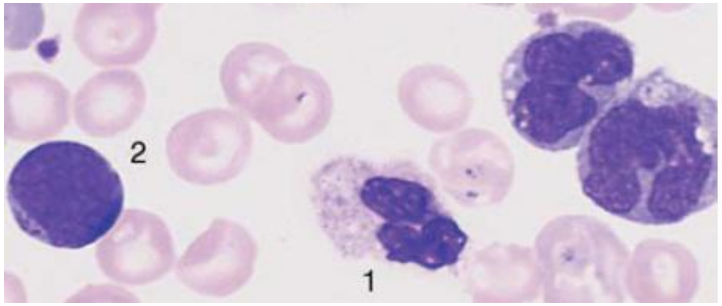
کروماتین: دارای خلل وفرج

هستک:دیده نمیشود

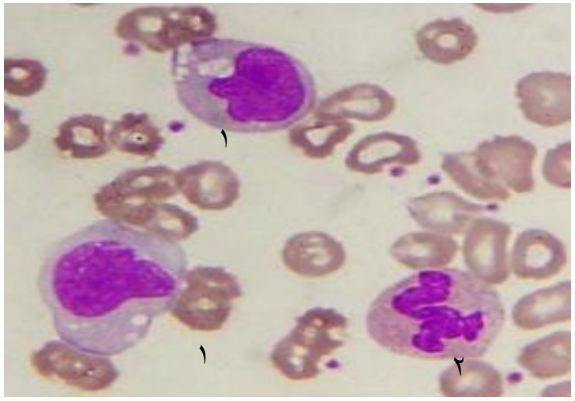
میزان سیتوپلاسم: فراوان(سیتوپلاسم معمولا حاشیه نامنظم دارد ودارای واکوئل است)

رنگ سیتوپلاسم: ابی خاکستری

گرانول: بدون گرانول یا دارای تعداد کمی گرانول ظریف

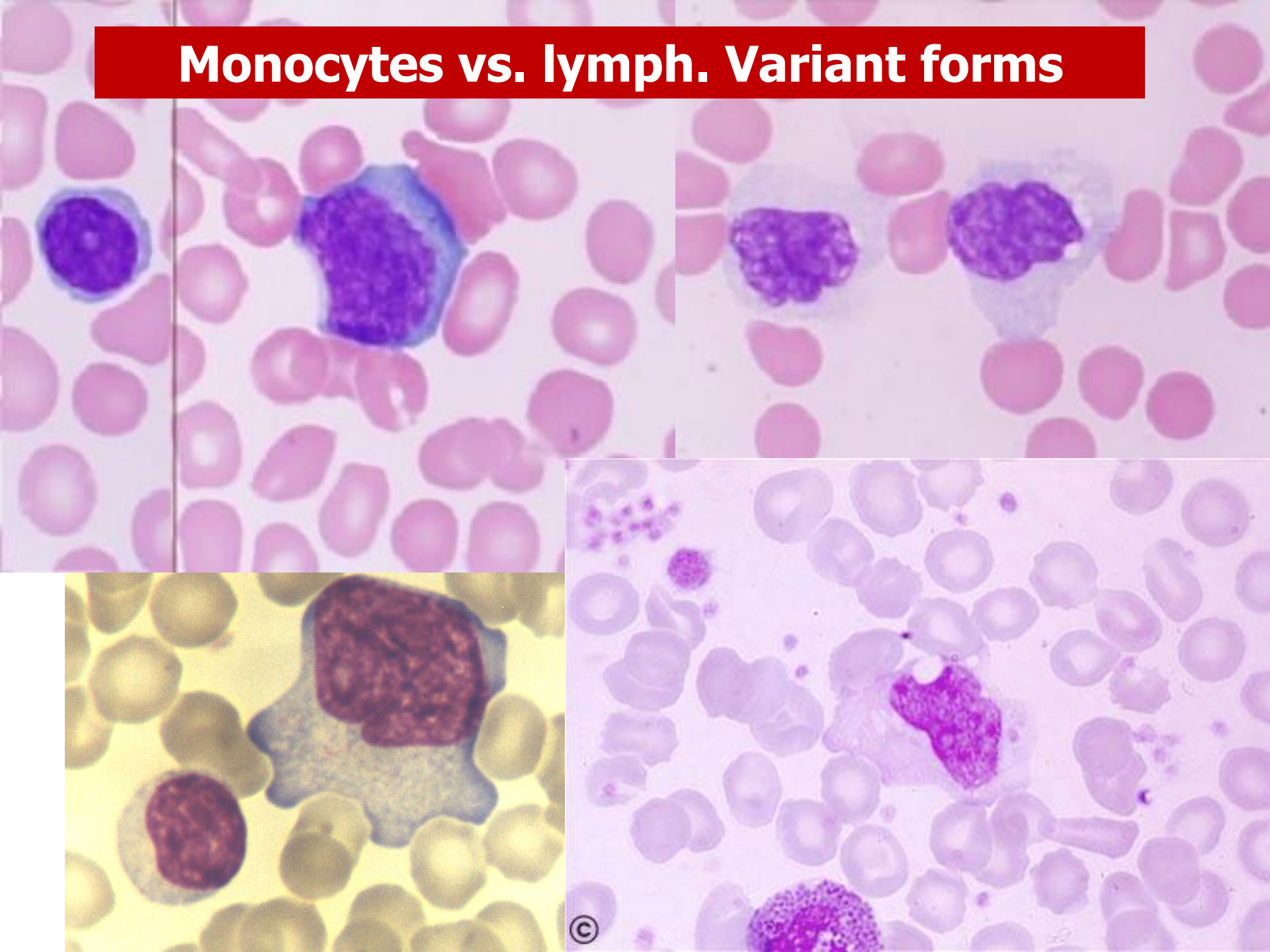


اسمیر خون محیطی. دو مونوسیت (مقابل فلش)یک نوتروفیل (۱) ویک لنفوسیت کوچک (۲) مشاهده می شوند.

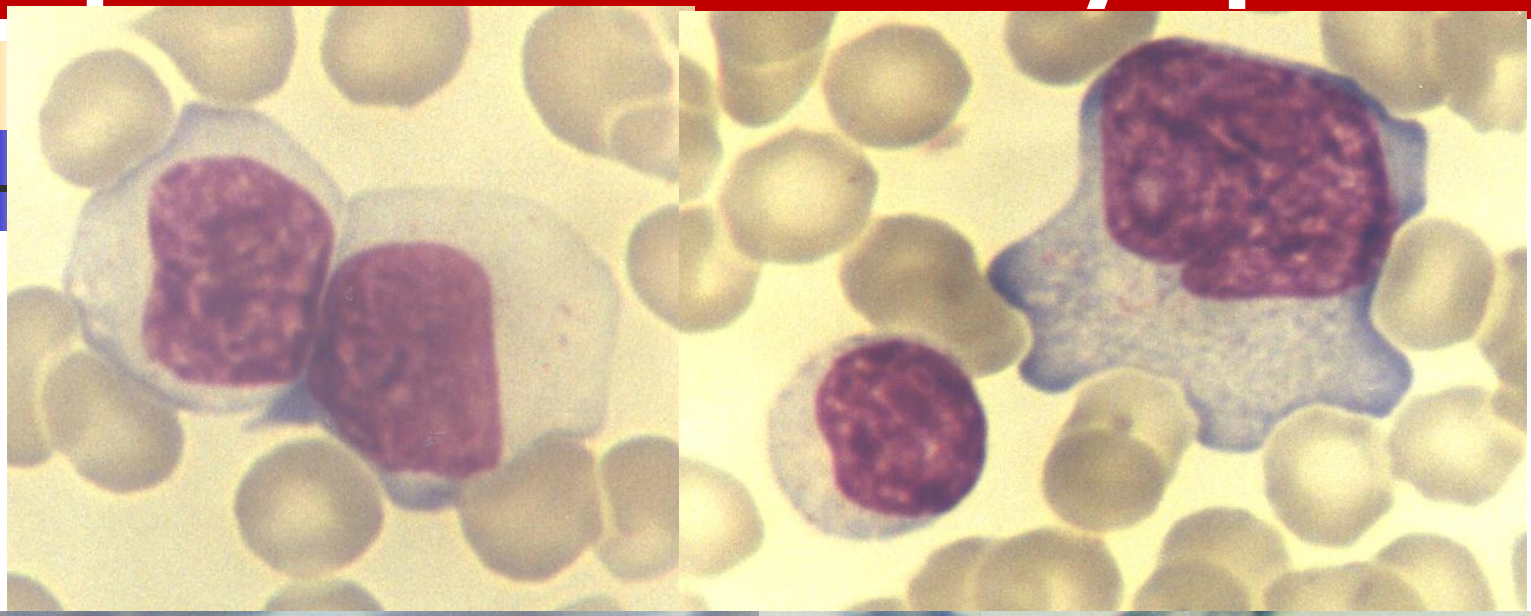


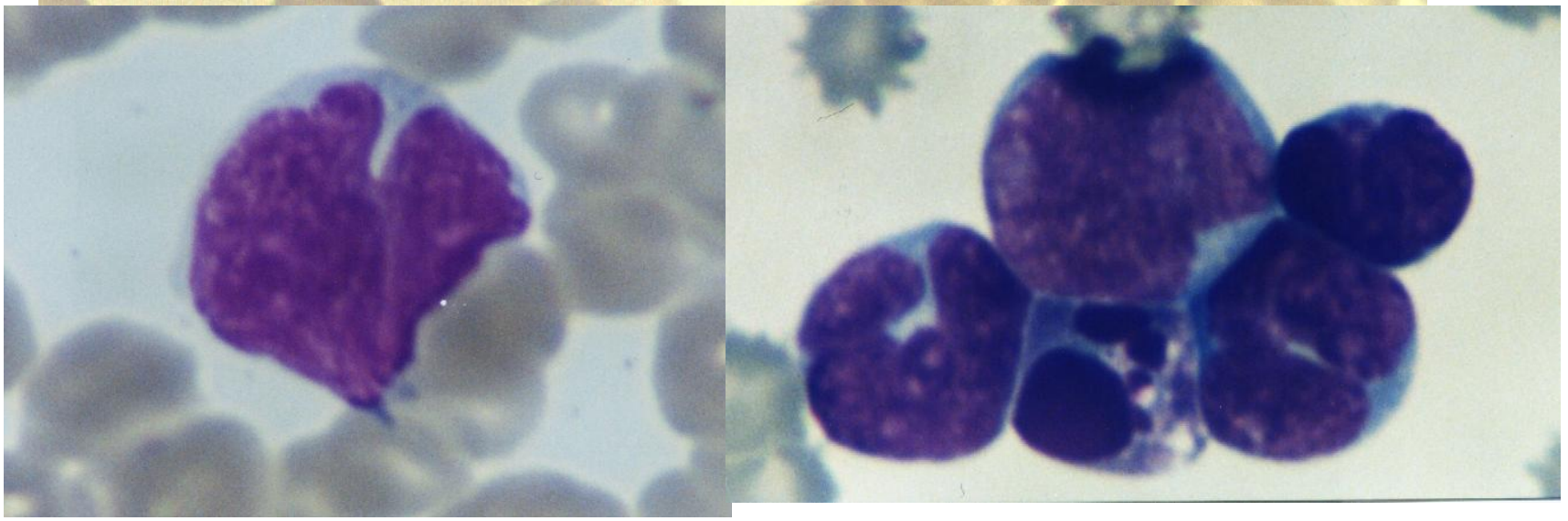
اسمیر مغزاستخوان . دو مونوسیت (۱) ویک نوتروفیل (۲) دیده می شوند.

Monocytes vs. lymph. Variant forms

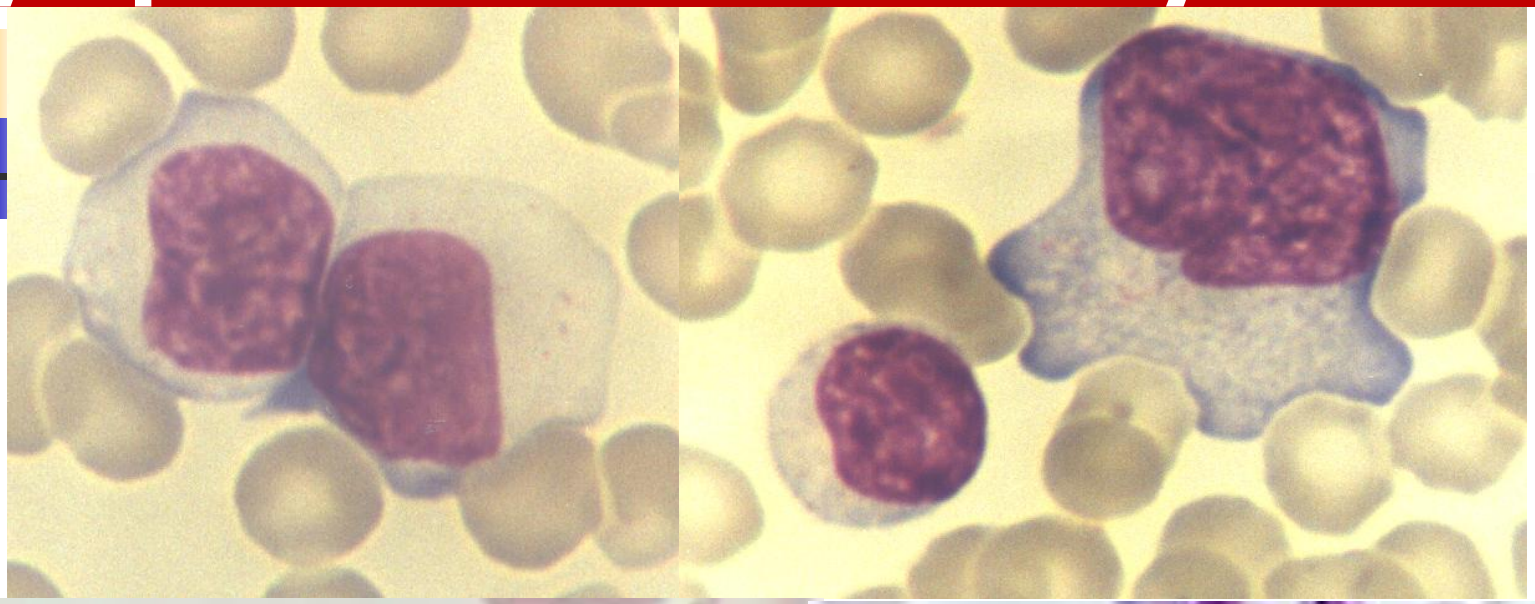


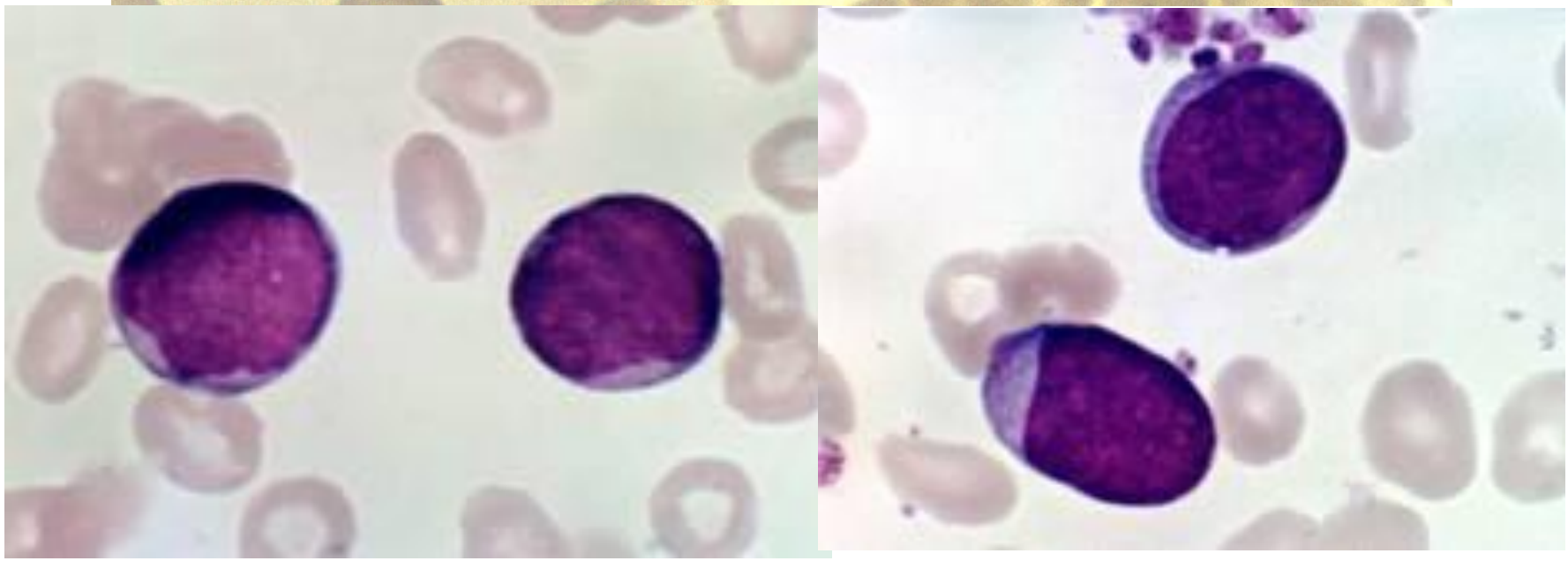
Lymph variant form vs. Lymphoblast



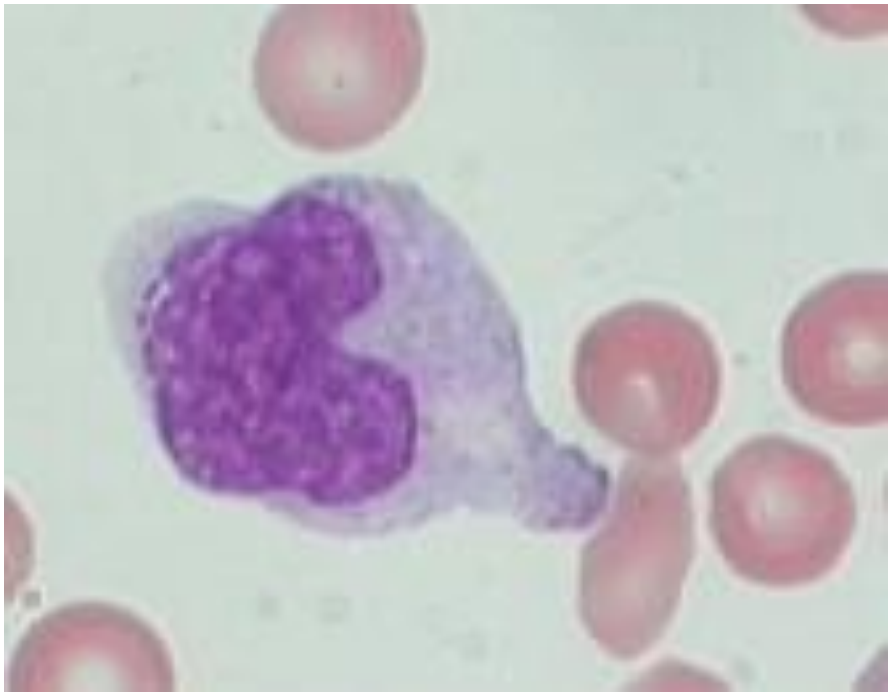


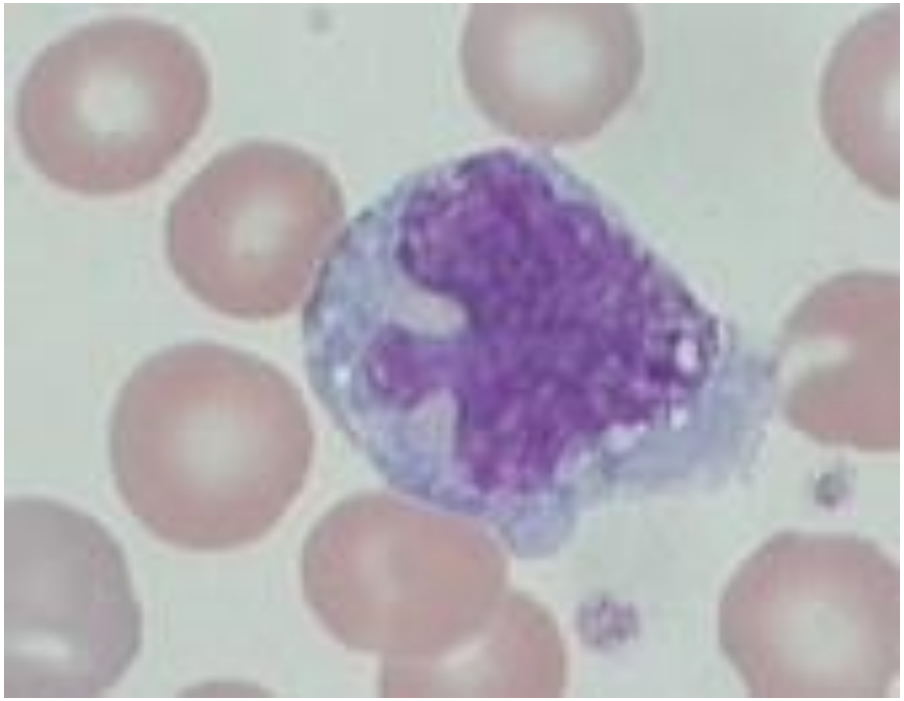
Lymph variant form vs. Myeloblast





Monocytosis





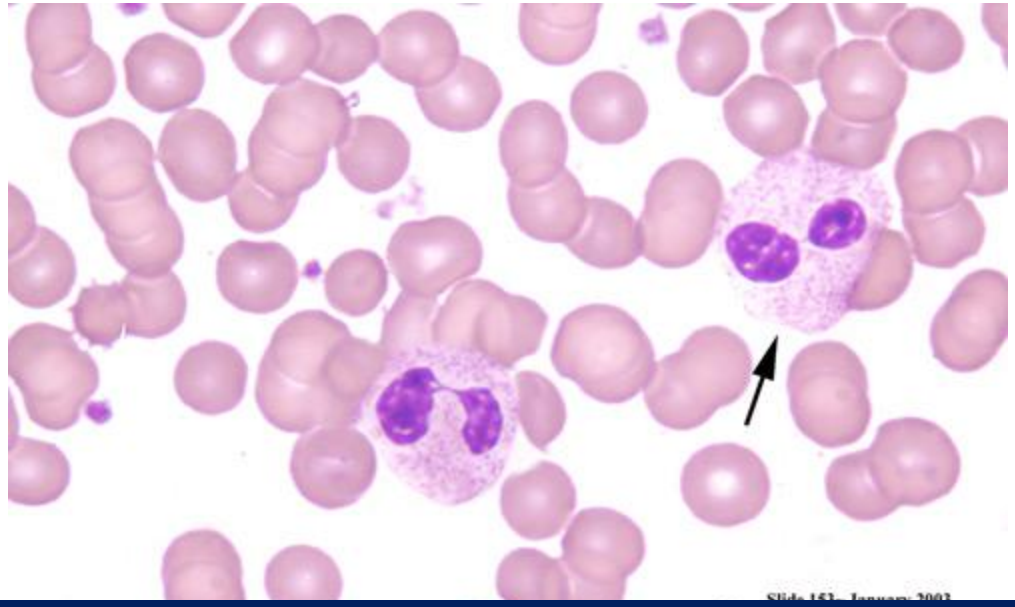
Monocytosis

- Monocytes > 1.0 x10^9/L in adults

Occurs in a number of disorders:

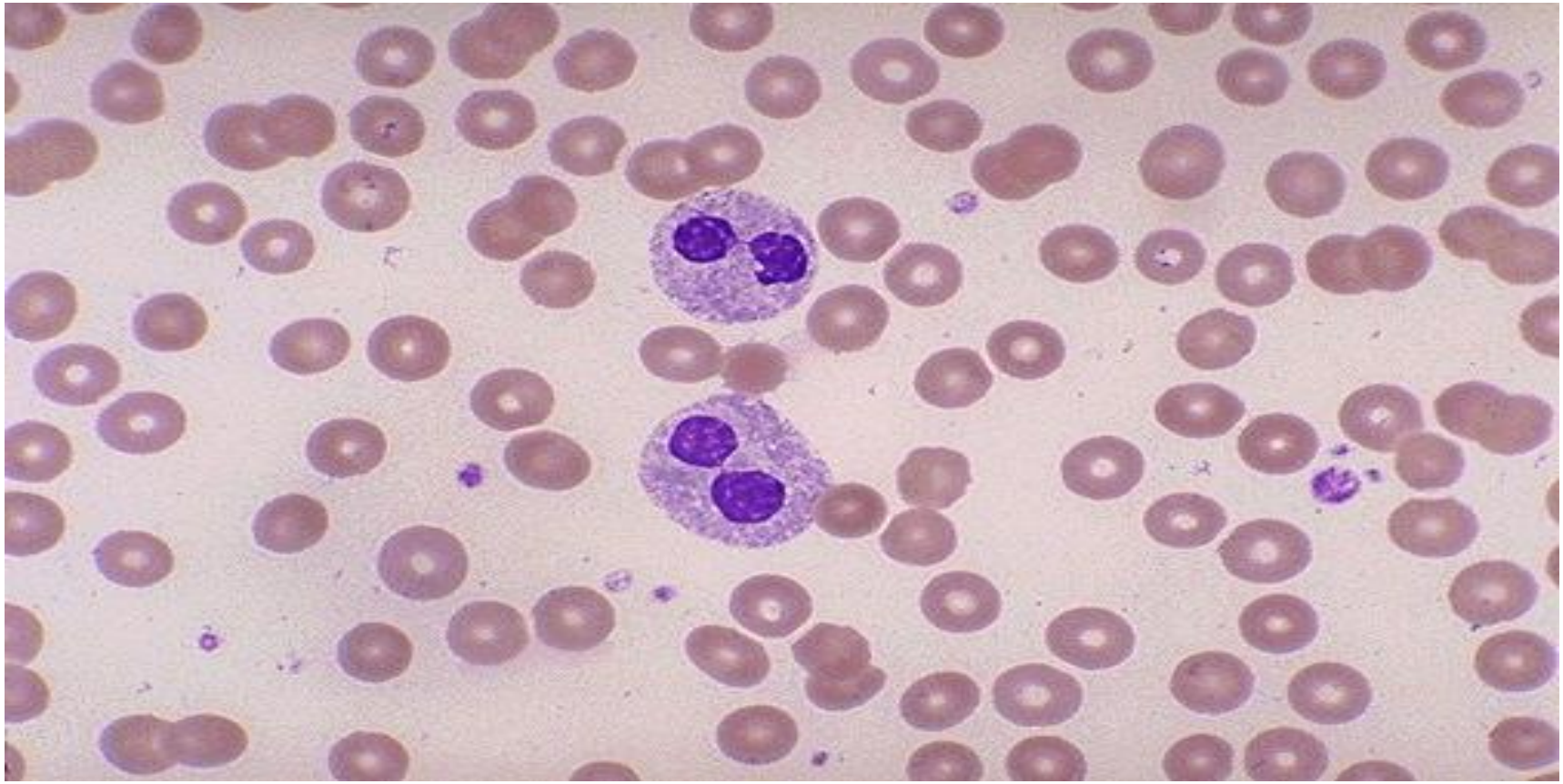
- Most frequently in the ***recovery phase of infection***, but may be seen in a variety of ***neoplastic lesions*** especially myeloproliferative disorders.
- **Monocytosis may result from viral, fungal, rickettsial, and protozoal infections**.
- Phagocytosis of erythrocytes, leukocytes, and platelets by monocytes and histiocytes is seen in the "***hemophagocytic syndrome***" which is associated with **viral or bacterial infections** and **T cell malignant lymphoma**

What is your diagnosis? How do you report?

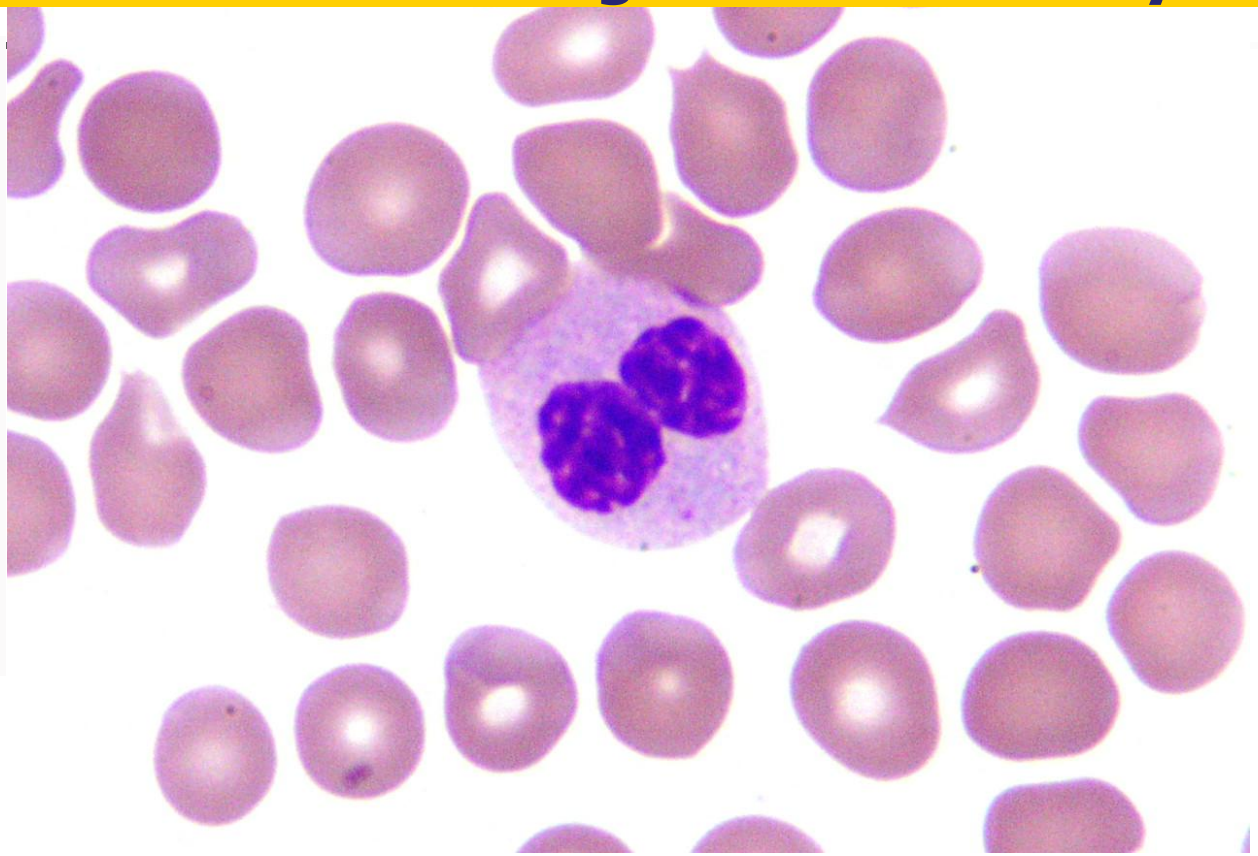


The majority of neutrophils are in band forms or have bi-lobed nuclei , with coarsely clumped chromatin , which is highly suggestive of ***Pelger Huet Anomlay***

Pelger –Huet anomaly



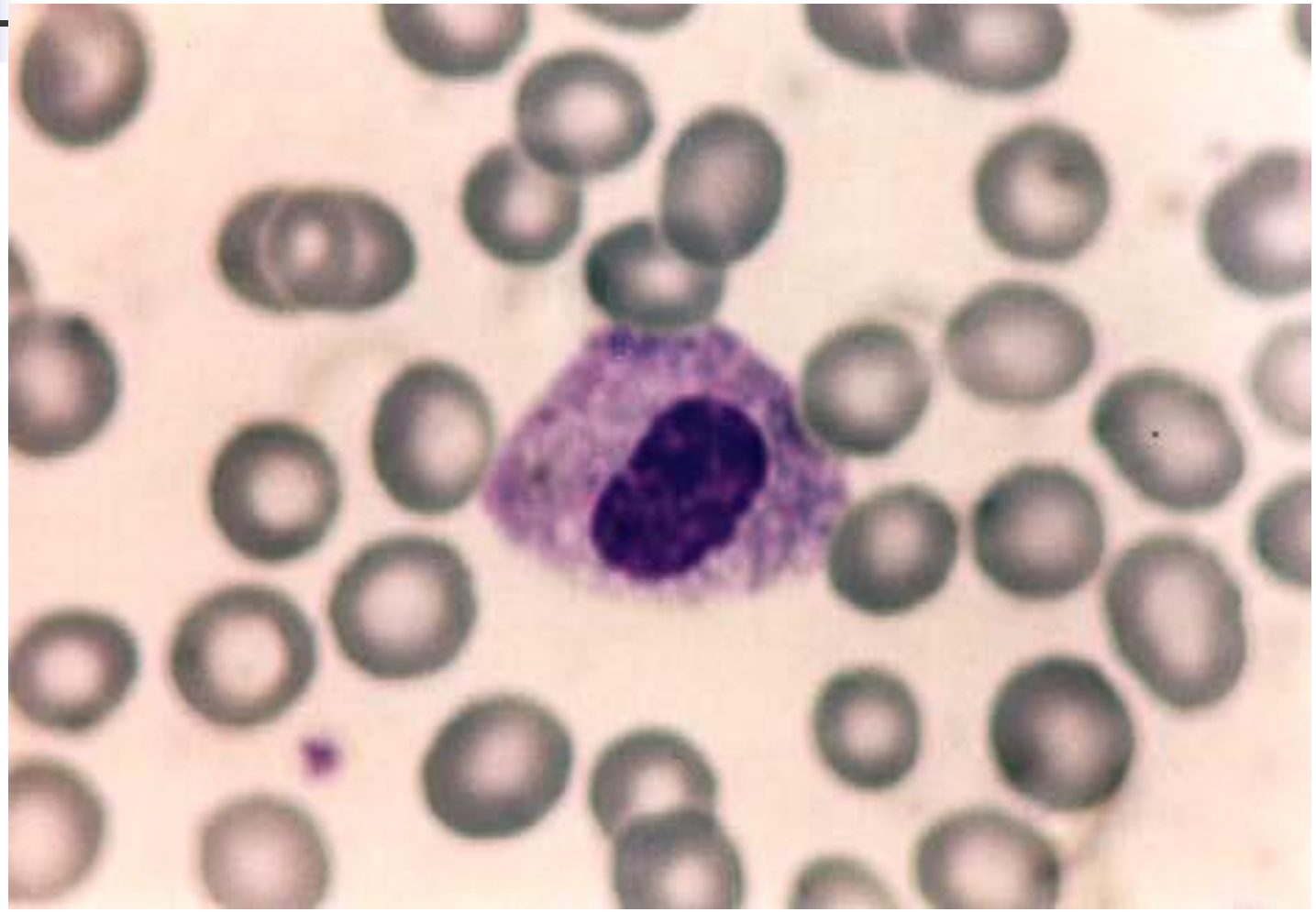
Although the filamentous segment connecting the two lobes of the Pelger-Huet cell shown is not apparent, this cell has the typical pince-nez form of nucleus characteristic of the Pelger-Huet anomoly



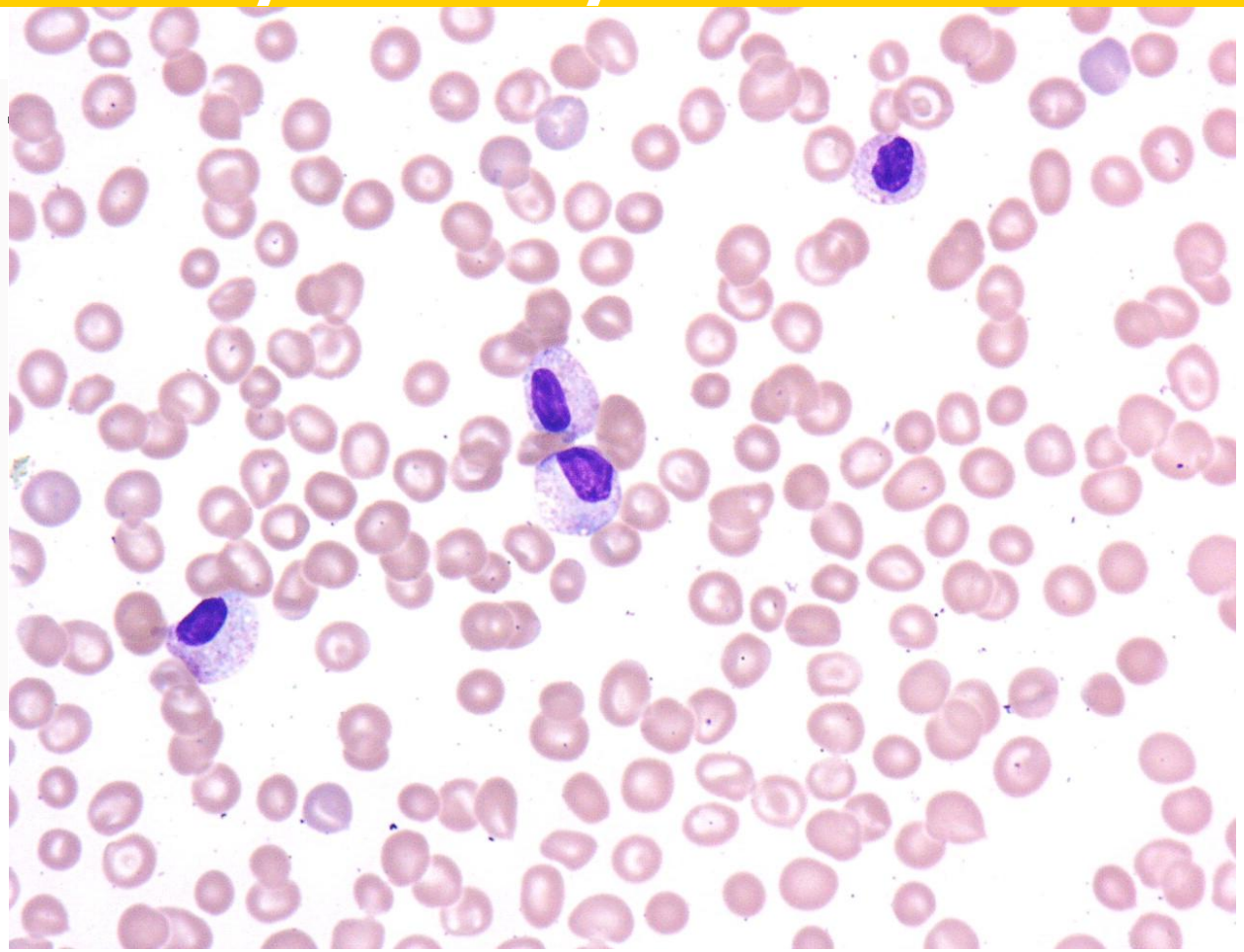
Lazarchick, J. ASH Image Bank 2007;2007:6-00057

Copyright ©2007 American Society of Hematology. Copyright restrictions may apply.

Single nucleus Pelger Huet cell



The neutrophils in this view show mature nuclei with coarse clumped chromatin but no segmentation or are only minimally indented



Lazarchick, J. ASH Image Bank 2004;2004:101164

Copyright ©2004 American Society of Hematology. Copyright restrictions may apply.

Morphology

- The timing of examination (**within 3 h of collection**) and
- A careful preparation of a peripheral blood smear are essential for the identification and differentiation of PHA.
- **Long-standing specimens** (for more than 12 h) may cause round pyknotic nuclei in the cells

Morphology

- Beside suppression of segmentation of granulopoiesis, the **nuclei of all leukocytes**, including ***neutrophils***, ***lymphocytes***,***monocytes***, ***eosinophils*** and ***basophils***, are affected in PHA .
- The nuclei of subjects with PHA are characterised by a ***lower nucleus/cytoplasma ratio***.
- In the **heterozygous** phenotypes, about **55–93%** of the neutrophils show nuclear segmentation arrest at the bilobed level.
- The lobes (ranging from 2 to 5) present a symmetrical, spectacle like '**pince-nez**' or 'dumbbell' appearance, connected by a thin strand or filament.

Morphology

- They are usually round with a coarse, densely clumped and fully mature nuclear chromatin, unlike the oval or irregular lobes seen in the normal neutrophil nuclei.
- The cell size, the cytoplasm and the granular pattern are comparable with that of normal neutrophils.
- A small population of neutrophils possesses a **nonlobulated or peanut-shaped nucleus** (Stodtmeister cells).
- ***The single-lobed bands appear to be shorter and thicker than the usual stabs***

Morphology

- The granulocytes of homozygous PHA contain **single, round** or **slightly indented**, **eccentric nuclei** with **little or no nuclear segmentation**.
- In homozygous individuals, the **basophils, eosinophils, and megakaryocytes** also show dense nuclear chromatin and rounded nuclear lobes.
- Distinction from myelocytes or metamyelocytes is made by their relatively small (spherical) nuclei and dense chromatin.
- These types of cells may account for **94–96%** of the total neutrophil counts in **homozygous PHA** and **0–4%** in **heterozygous PHA**.
- The bone marrow reveals normal morphologic features up to the myelocyte stage.

Differential Diagnosis

- Identification of PHA cells has to be the starting point of a profound investigation, differentiating between a **benign inherited anomaly**, an **acquired feature** associated with a transient condition or evolving MDS and MPNs
- *Laboratory findings*, *clinical* and *family history* can be helpful in the differential diagnosis of PHA.
- In the microscopic analysis of a peripheral blood smear, the investigator has to take notice of the **number** or **distribution of nuclear lobes**, the **nuclear size**, the **chromatin pattern** and **cytoplasmic granulation**.

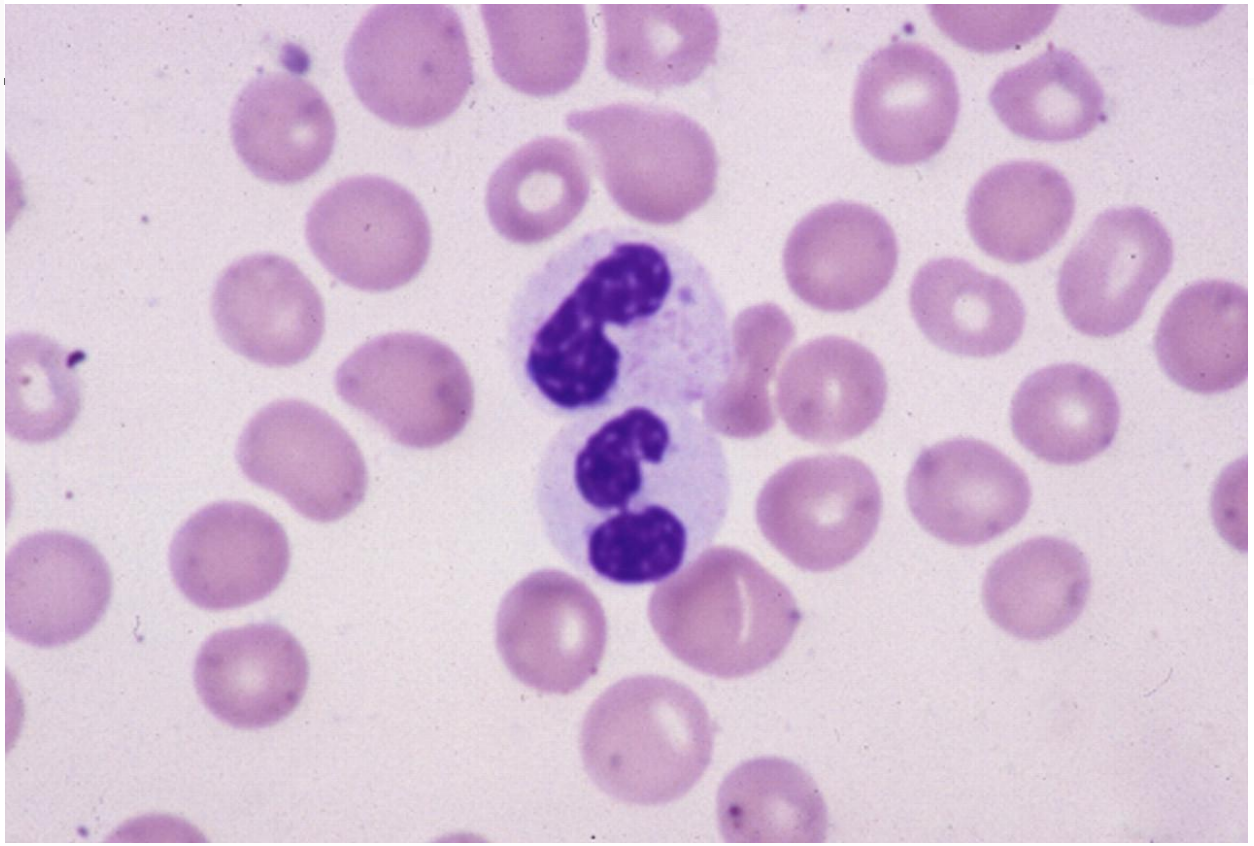
Differential Diagnosis

- Peripheral blood smear reveals **few cells with 3 lobes (less than 10%),** and **practically none have 4 lobes** .
- Toxic granulation, toxic vacuolation and Döhle bodies are findings of particular concern.
- Nuclear chromatin pattern, nuclear size and lobe morphology can be helpful in the differentiation.
- **Pseudo-PHA nuclei** are paler, less clear in outline, their chromatin is less lumpy and the lobes are elliptical and unequal

Differential Diagnosis

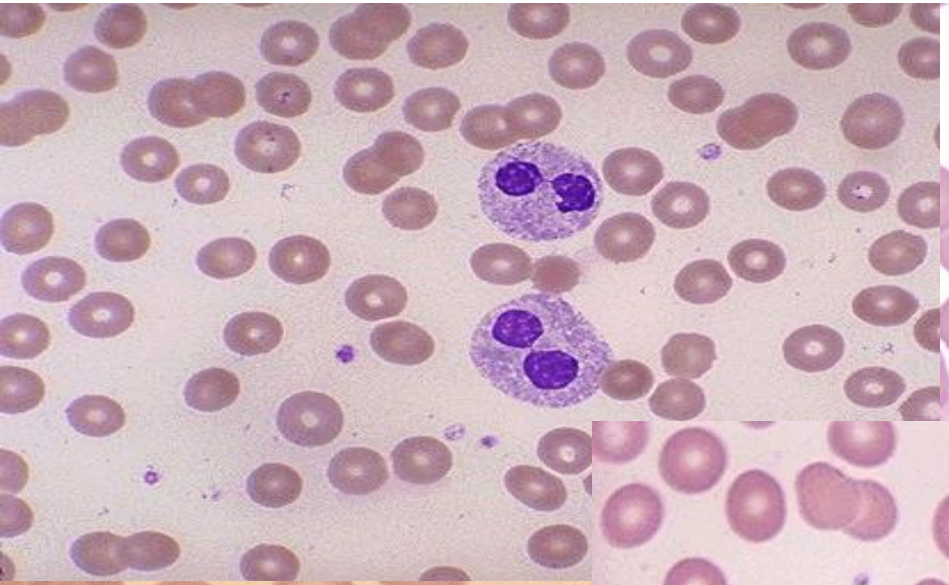
- If more than **1 cell line** is involved (anaemia, thrombocytopenia,cytopenia and macrocytosis), an ***evalution by bone marrow aspiration or biopsy*** to exclude a haematologic malignancy is mandatory.
- **Pseudo-PHA cells** may be predicative of the clinical onset of myelodysplastic disorders and malignant conditions, such as AML,CML or PMF
- ***The pelgeroid polymorphism is considered as the most specific dysplastic marker of MDS.***
- The question is raised if this finding is a morphologic anomaly or a manifestation of apoptosis

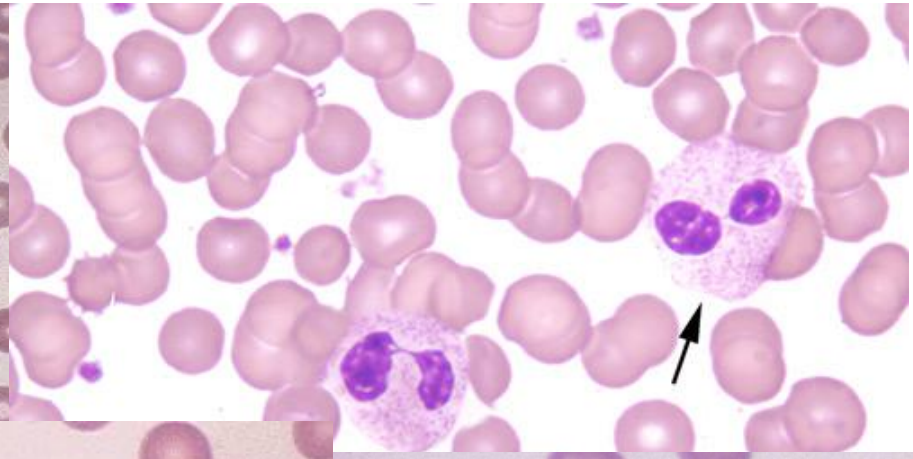
Neutrophils from the peripheral blood of a patient with MDS display hypolobulation of the nuclei which characterizes the pseudo Pelger Huet anomaly (1000x MacNeal Tetrachrome)

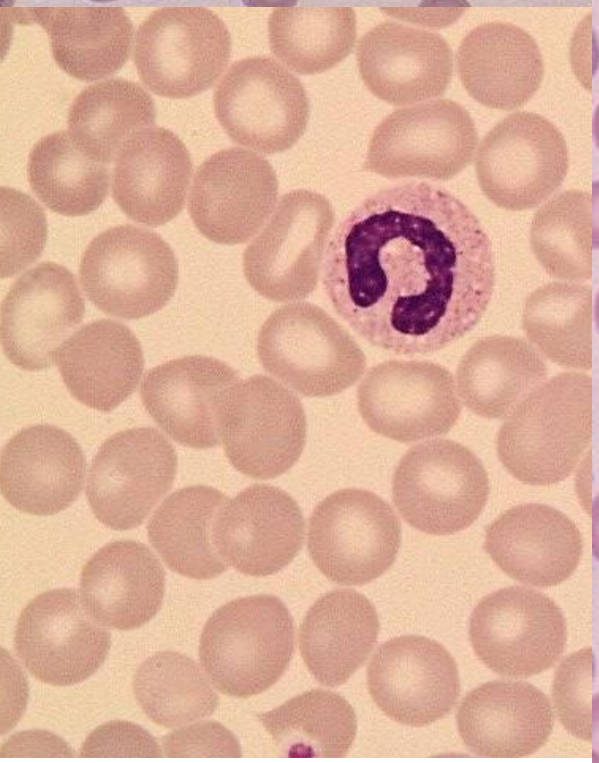


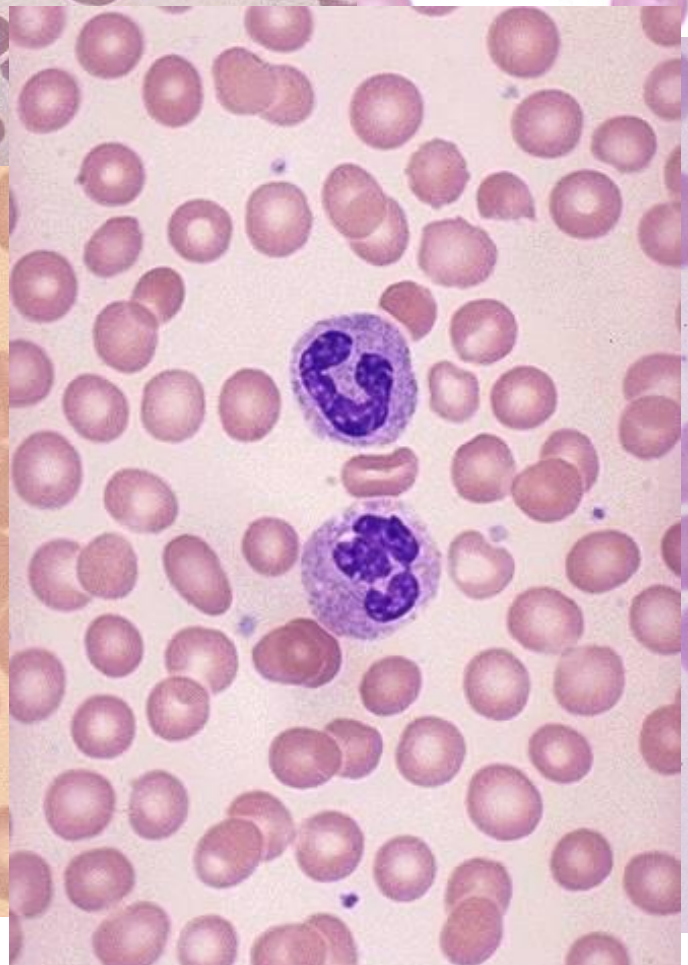
Maslak, P. ASH Image Bank 2002;2002:100446

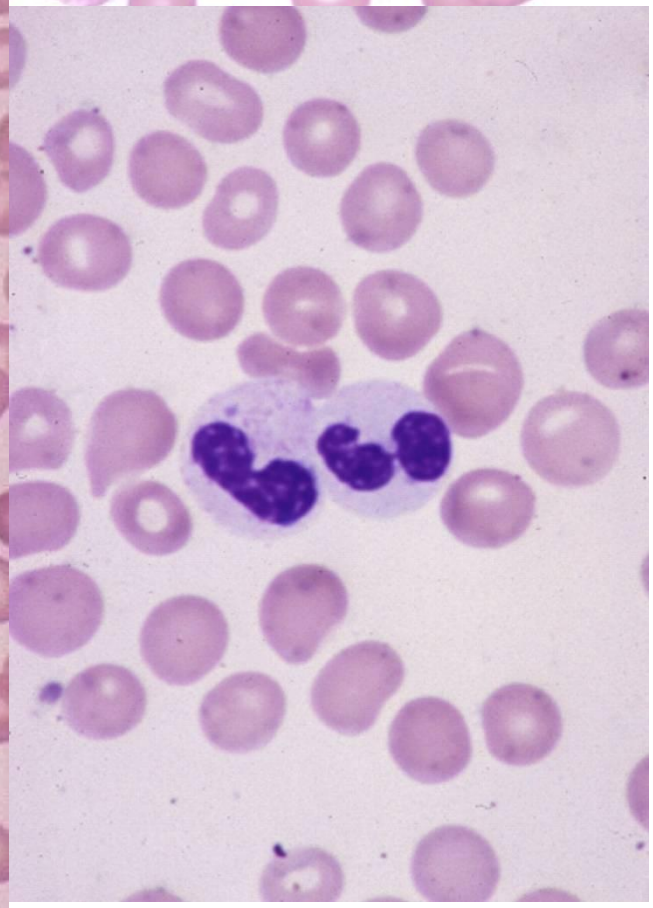
Copyright ©2002 American Society of Hematology. Copyright restrictions may apply.



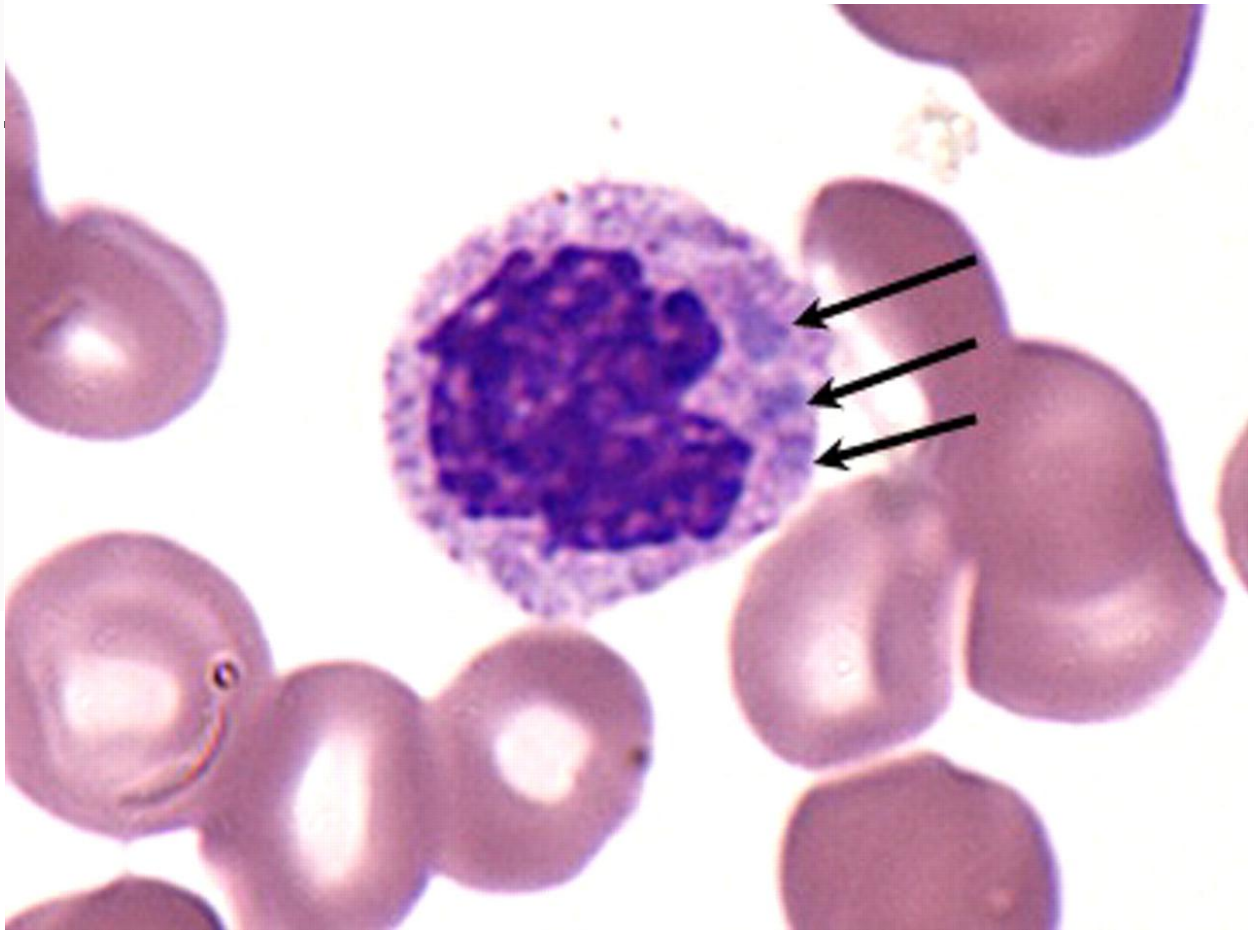








Hypolobulated neutrophil with Dohle bodies (arrows) in MDS



Maslak, P. ASH Image Bank 2004;2004:101149

Copyright ©2004 American Society of Hematology. Copyright restrictions may apply.

Pelger –Huet anomaly

- Pelger-Huët anomaly (PHA) is a **congenital haematological disorder**,
- Characterized by an **impaired lobulation** of neutrophils with a coarse nuclear chromatin
- It was first described by a Dutch haematologist (**K. Pelger**) in 1928 and recognized as a Mendelian autosomal dominant trait by a pediatrician (**G. Huët**) in 1932
- Characteristics observed on blood smears include leukocytes with dumbbell-shaped bilobed nuclei; a reduced number of nuclear segments; and coarse clumping of the nuclear chromatin in **neutrophils, lymphocytes, and monocytes.**

Pelger –Huet anomaly

- PHA, a member of the **laminopathies**, is a worldwide distributed pathology with a frequency varying from **0.01 to 0.1%.**
- Clustering of PHA has been observed in Västerbotten county (northeast Sweden) and in the mountain village Gelenau (southeast Germany) with prevalence's of **0.6** and **1.01%**, respectively.
- Male-to-female ratio is **1:1**. PHA may be observed in individuals of **all ages**.

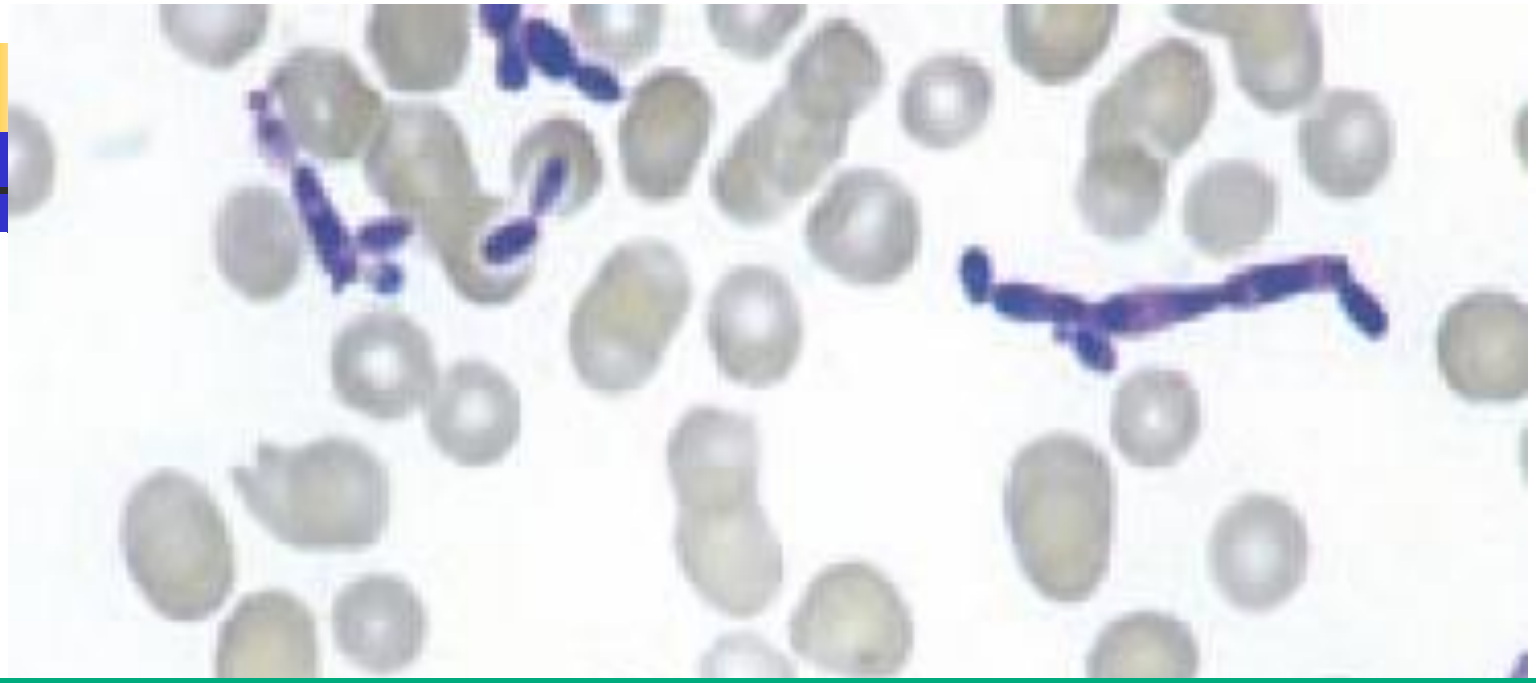
Clinical Aspects

- Since the first description of PHA **homozygosity** in a Dutch girl by Haverkamp Begeman et al., to the best of our knowledge, **10** other homozygous individuals have been reported so far with a variable clinical presentation (psychomotor retardation, disproportionate body stature, macrocephalus with prominent forehead, ventricular septal defect, polydactyly and short metacarpals).
- In the **heterozygous state**, PHA is benign with the only apparent phenotype being the altered neutrophil nucleus

Functional Properties

- In evaluating the neutrophil functional profile, the total sequence of **chemotaxis**, **adhesion**, **aggregation**, **phagocytosis**, **granule content** and **degranulation**, **respiratory burst activity** and **bacterial killing** needs to be analysed.
- The biochemical, metabolic, phagocytic and bactericidal activities of PHA granulocytes are not different from those of healthy subjects.
- Pelger-Huët cells show a **normal survival time** in circulation

What is your diagnosis?



PBS of a patient with persistent ***pancytopenia*** after intensive chemotherapy for AML. After many weeks of platelet dependency the 'platelet' count suddenly rose. Inspection of the film showed that platelets continued to be very sparse; the particles that were counted as platelets were **fungi**, subsequently identified as ***Candida glabrata***, originating from the patients indwelling central intravenous line

Leukoerythroblastic reaction

- An ↑ in the peripheral blood of immature RBCs(Nrbc), ie normoblasts, and immature granulocytes, metamyelocytes and bands,

May be associated with :

١. Metastatic cancer,

٢. Hematopoietic malignancy,

٣. Hemolytic anemia,

٤. Gaucher's disease,

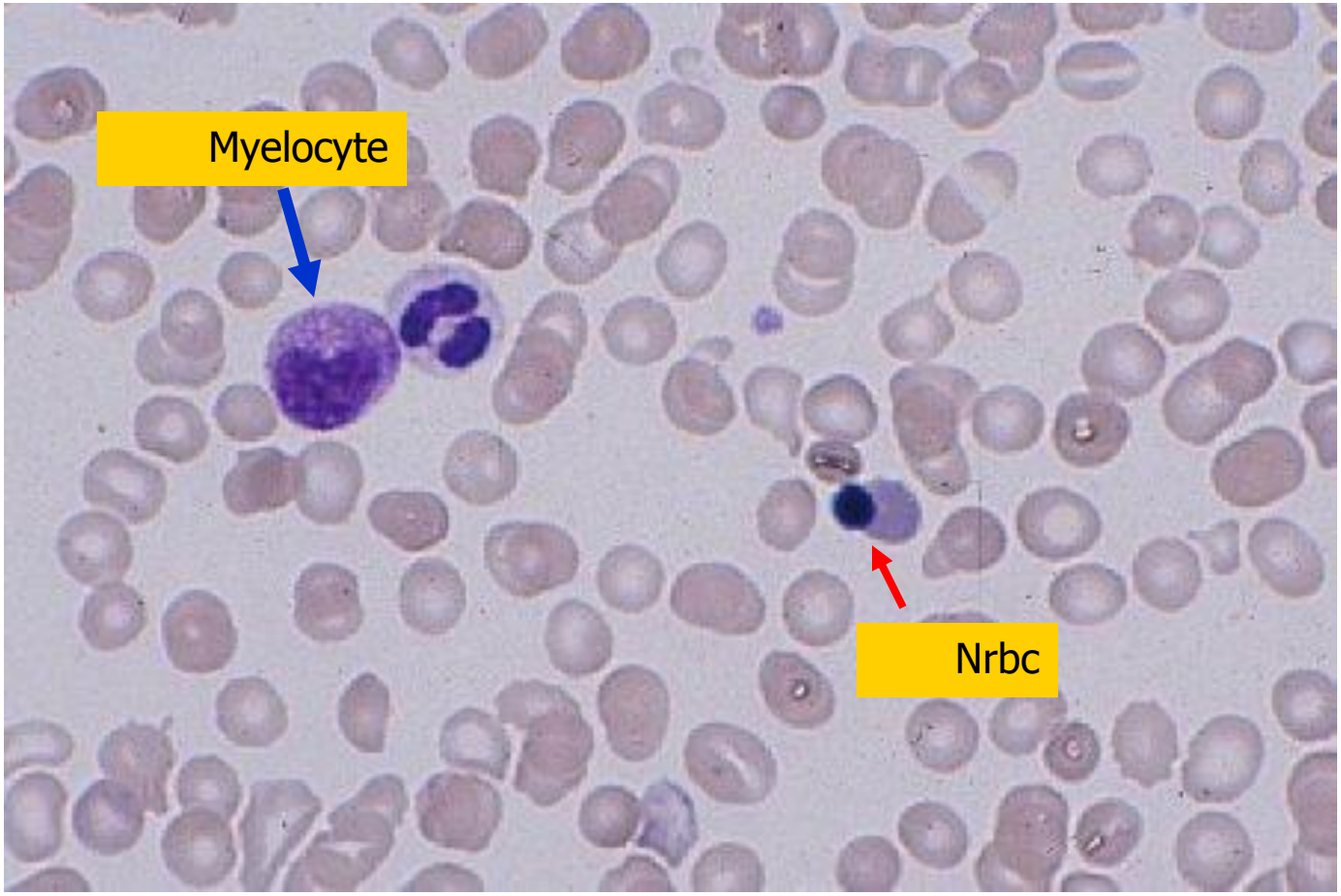
٥. Polytrauma,

٦. BM infiltration by various processes, including infection–eg, fungal, viral, TB, sarcoidosis, histiocytosis,

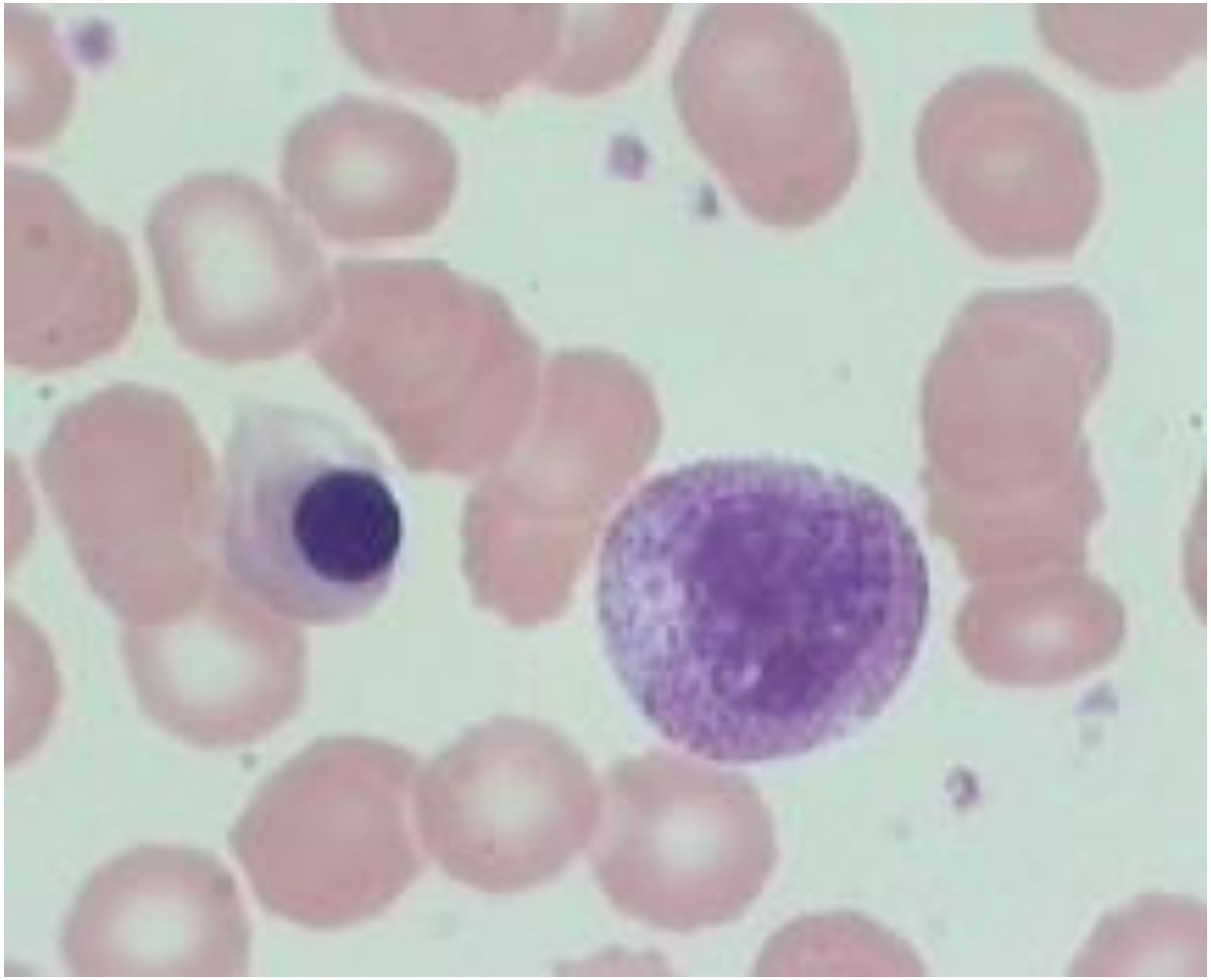
٧. Hypoxia;

- ⅓ of Pts with LER have no known underlying disease

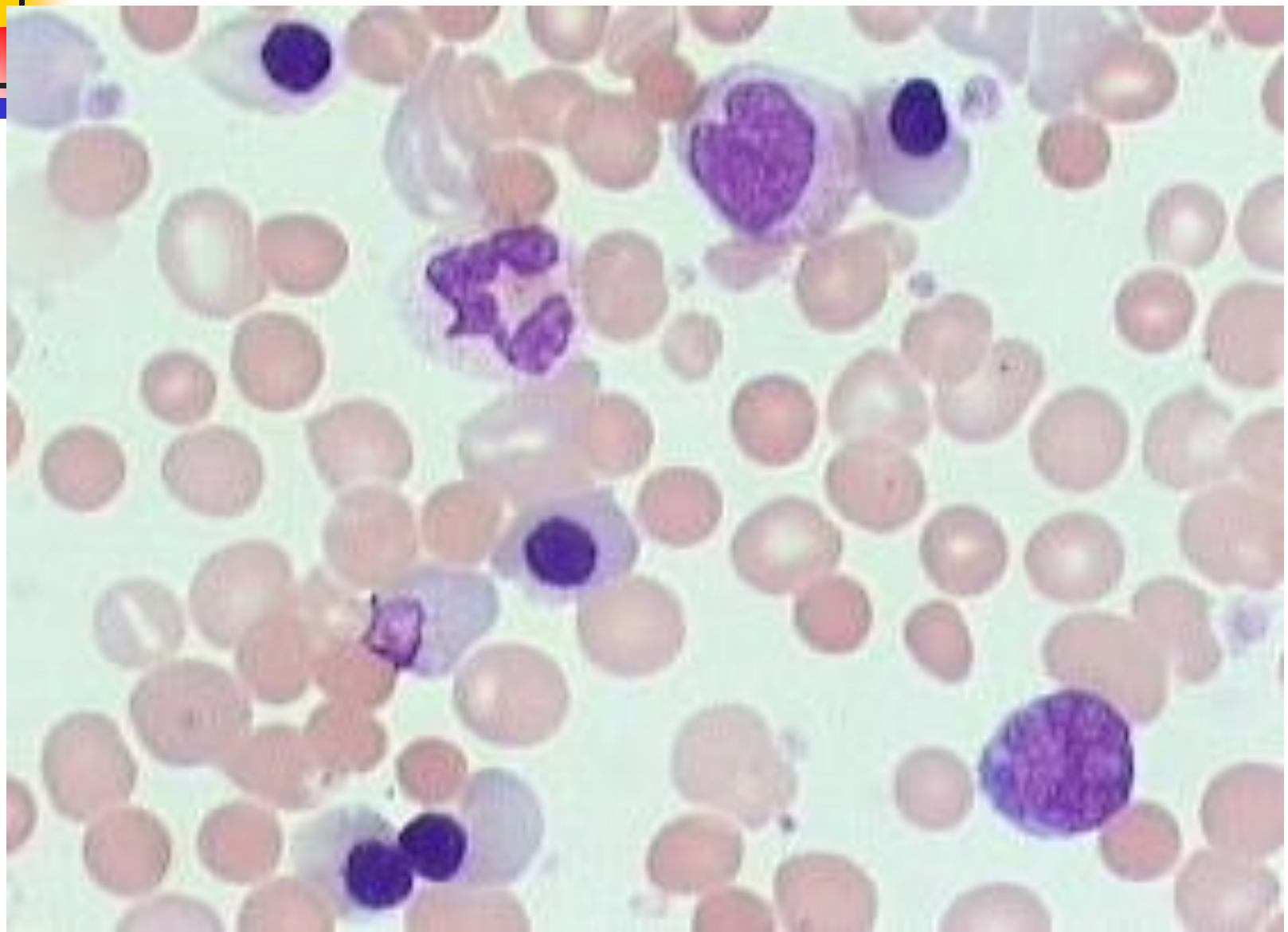
Leukoerythroblastic reaction



Leukoerythroblastic reaction



Leukoerythroblastic reaction



Imprecision

The **imprecision** of a **manual differential count** is greatest for those cells that are present in the ***smallest numbers***, particularly the ***basophils***.

If it is diagnostically important to know whether or not there is basophilia then it is ***necessary to improve precision, either by:***

Performing an absolute basophil count in a haemocytometer

Or by counting many more than the usual 100 cells (e.g. at least 200–500 cells).

Similarly, if neutrophils constitute only a small proportion of cells (e.g. in chronic lymphocytic leukaemia),

Precision achieved with differential counts of various numbers of leucocytes.

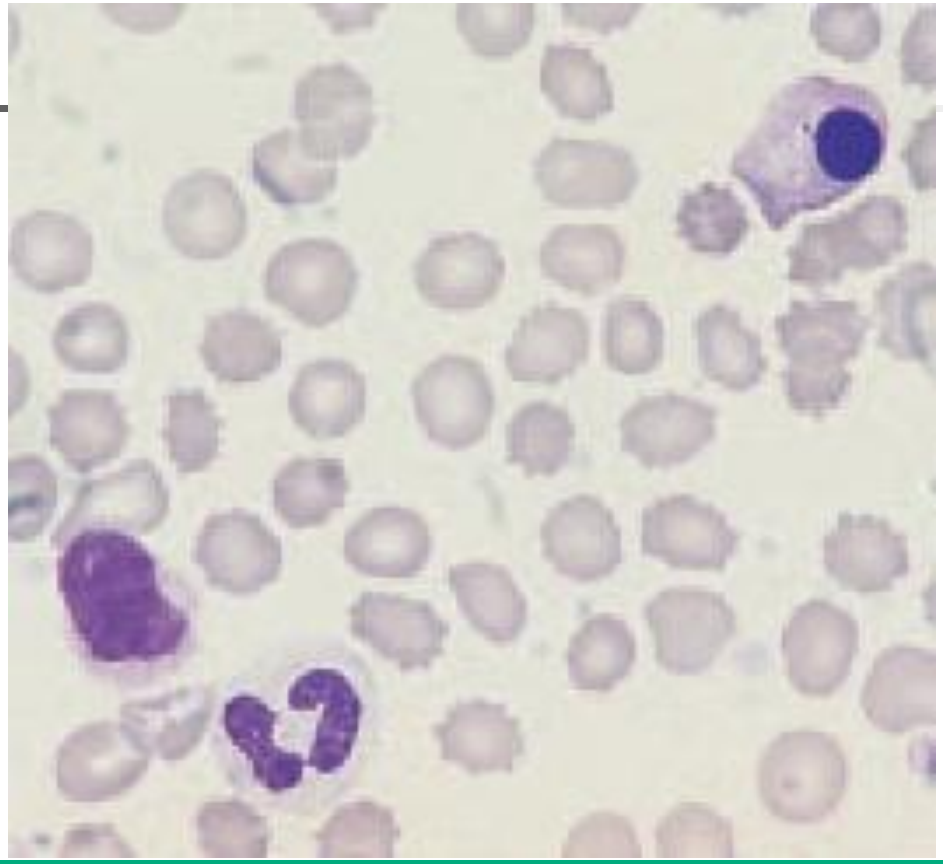
Observed percentage of cells	Total number of cells counted (n)				
	100	200	500	1000	10 000
0	0–4	0–2	0–1	0–1	0–0.04
1	0–6	0–4	0–3	0–2	0.8–1.2
2	0–8	0–6	0–4	1–4	1.7–2.3
3	0–9	1–7	1–5	2–5	2.7–3.3
4	1–10	1–8	2–7	2–6	3.6–4.4
5	1–12	2–10	3–8	3–7	4.6–5.4
6	2–13	3–11	4–9	4–8	5.5–6.5
7	2–14	3–12	4–10	5–9	6.5–7.5
8	3–16	4–13	5–11	6–10	7.4–8.6
9	4–17	5–15	6–12	7–11	8.4–9.6
10	4–18	6–16	7–14	8–13	9.4–10.6
15	8–24	10–21	12–19	12–18	14.6–15.4
20	12–30	14–27	16–24	17–23	19.6–20.4
25	16–35	19–32	21–30	22–28	24.6–25.4
30	21–40	23–37	26–35	27–33	29.5–30.5
35	25–46	28–43	30–40	32–39	34.5–35.5
40	30–51	33–48	35–45	36–44	39.5–40.5
45	35–56	38–53	40–50	41–49	44.5–45.5
50	39–61	42–58	45–55	46–54	49.5–50.5

Ninety-five per cent confidence limits of the observed percentage of cells when the total number of cells counted (n) varies from 100 to 10 000. Ranges for n = 100 to n = 1000 are derived from reference [33].

Imprecision,cont.

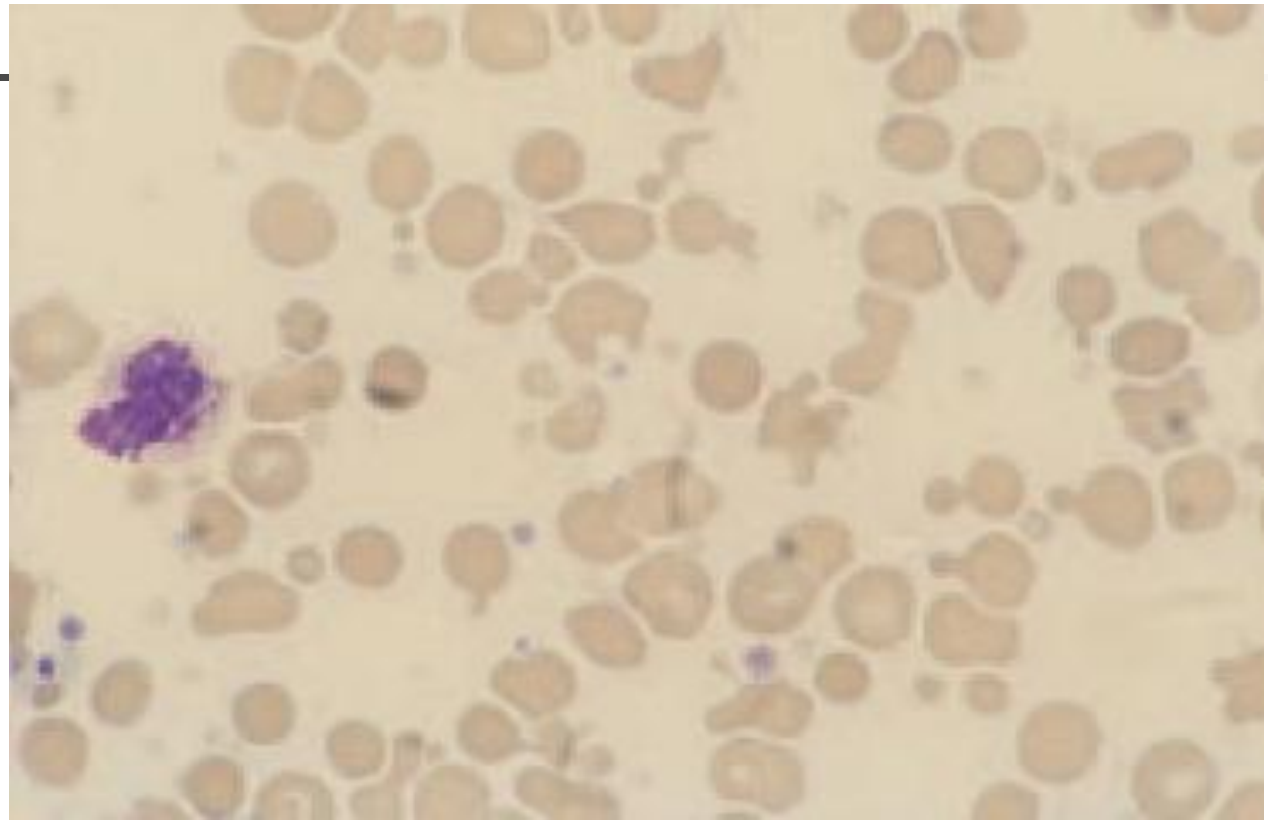
- Myelocytes and metamyelocytes, if present, are recorded separately from neutrophils.
- Band (stab) cells are generally counted as neutrophils, but it may be useful to record them separately.
- They normally constitute less than **6%(3%)** of the neutrophils;
- an increase may point to an inflammatory process even in the absence of an absolute leukocytosis

What is your interpretation?



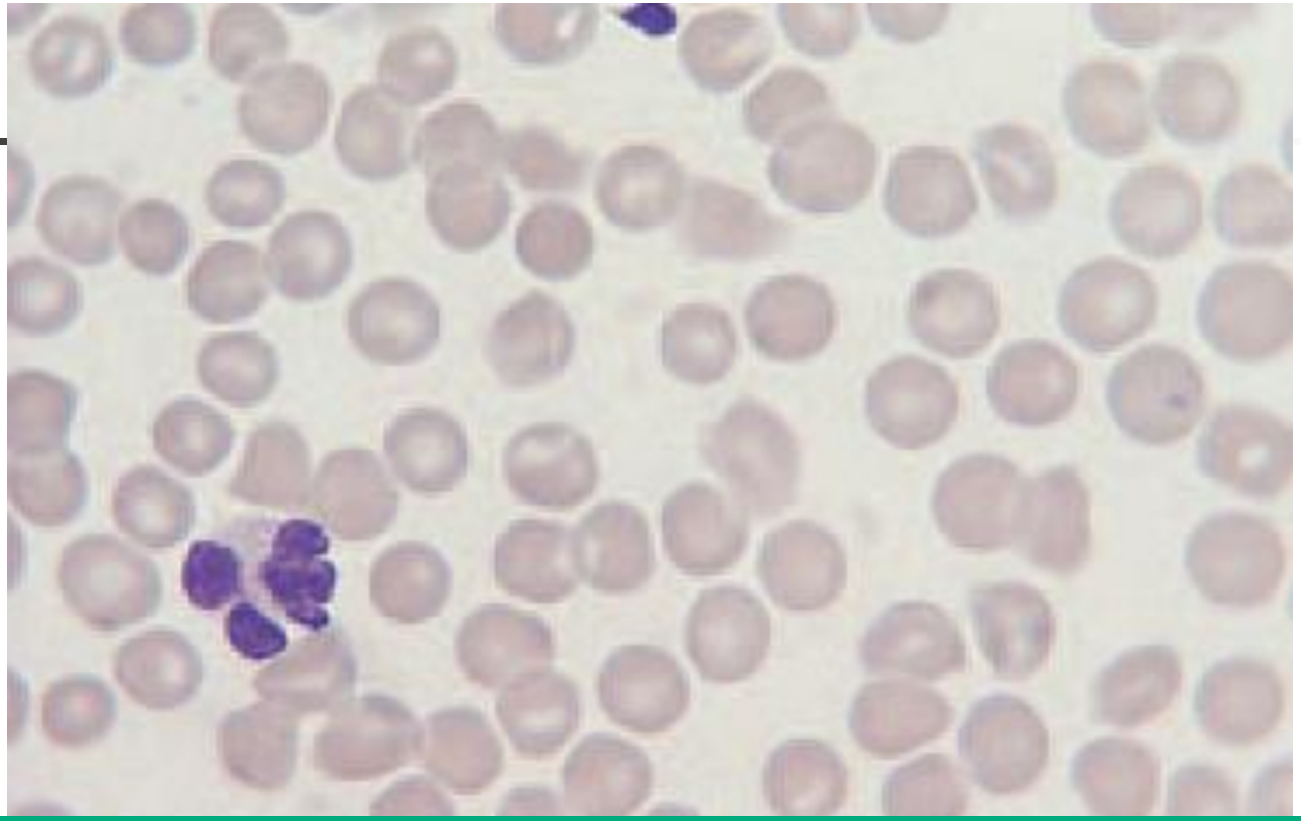
Peripheral blood film showing storage artefact *a crenation (echinocytosis), a disintegrated cell* and a **neutrophil** with a **rounded pyknotic nucleus**.

What is your interpretation?



Peripheral blood film from a blood specimen that has been transported in a hot motor vehicle, showing red cell budding and fragmentation.

What is your interpretation?



Peripheral blood film from a patient with ***hyperlipidaemia*** showing ***misshapen red cells*** with ***fuzzy outlines*** and blurring of the outline of the lobes of a neutrophil consequent on the high concentration of lipids.

What do you do *misshapen red cells* with *fuzzy outlines*?

- Erroneous results from hyperlipidaemia may be suspected
- This error can be confirmed by examining the plasma, after either centrifugation or red cell sedimentation, and noting the **milky appearance**.
- The problem can be dealt with by performing a ***microhaematocrit*** and a ***blank'*** measurement using the patient's plasma

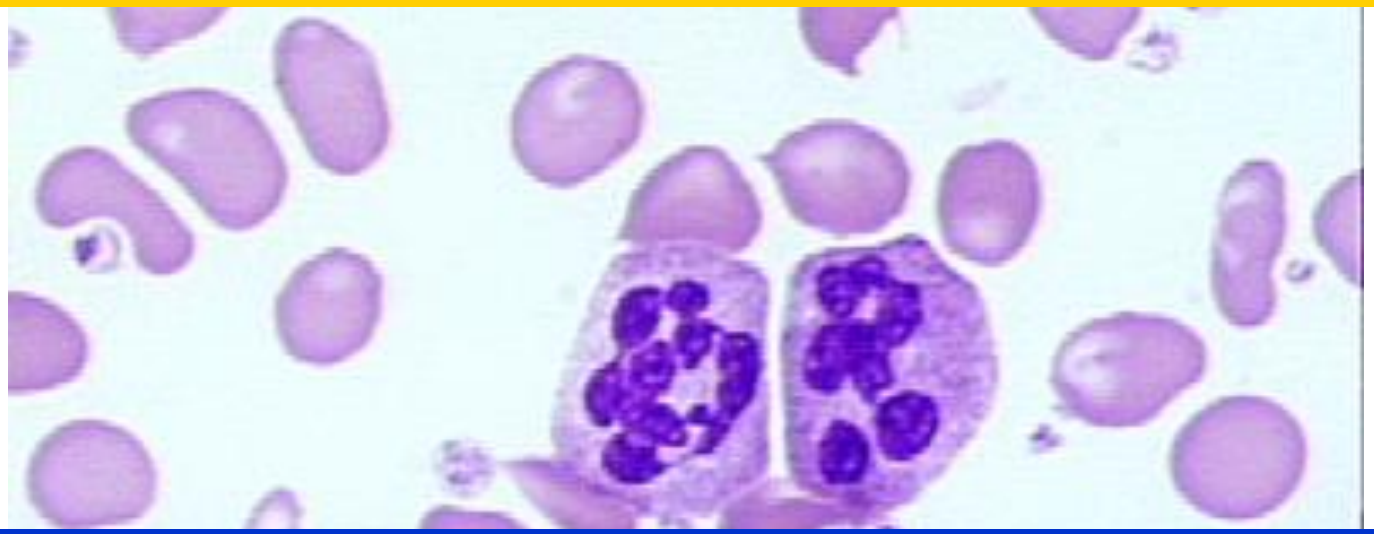
A c

$$\text{True Hb} = \text{measured Hb} - [\text{'Hb' of lipaemic plasma} \times (1 - \text{Hct})]$$

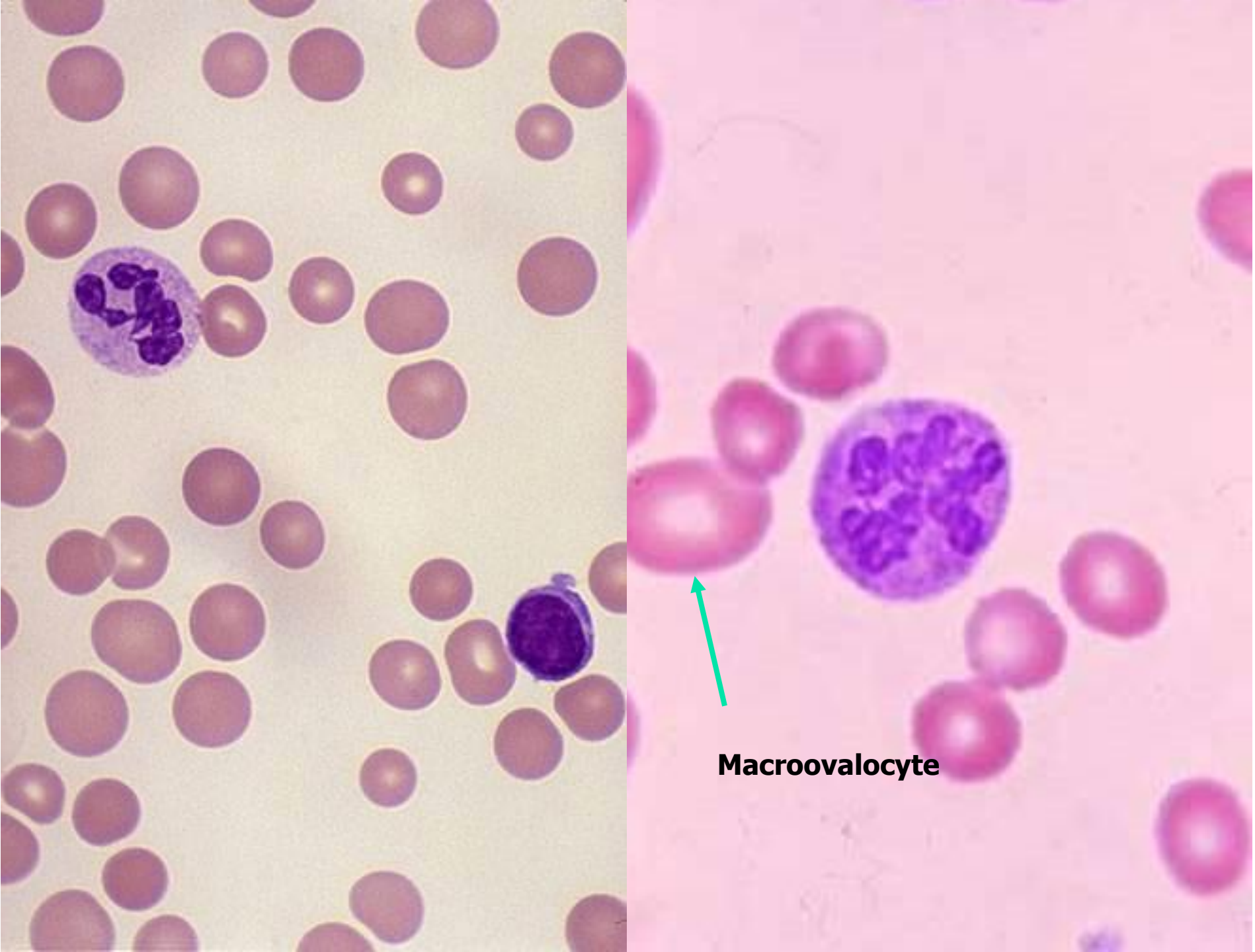
Hypersegmented Neutrophils

Hypersegmentation

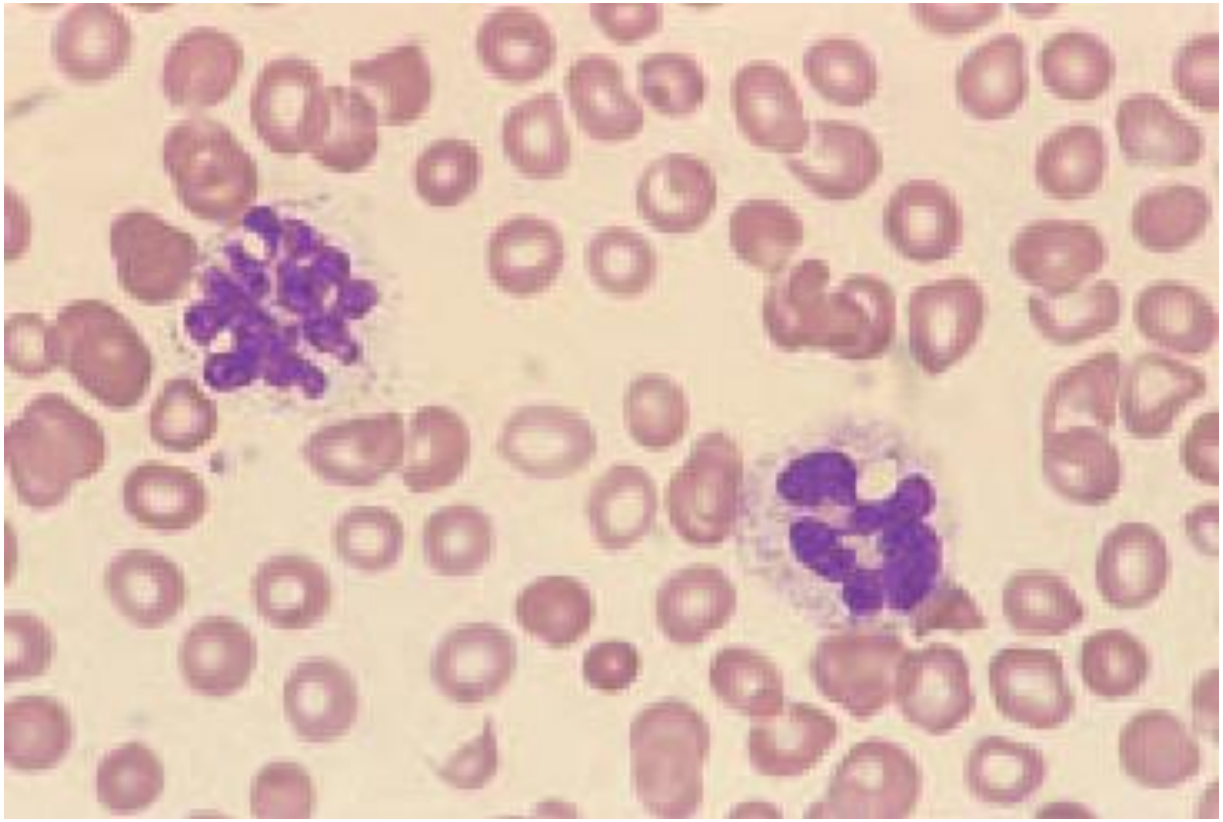
1 PMN with six lobes or >3% with 5 lobes



More than **3** cells having 5 lobes or a single cell with 6 lobes found in the course of a 100 cell differential is evidence of hypersegmentation. Hypersegmentation is sometimes referred to as a **myeloid "right shift".**


Macroovalocyte

Peripheral blood film of a patient with a MDS showing two neutrophils. Both are macropolycytes and one shows a defect of nuclear segmentation resembling myelokathexis. The size of the cells and the amount of nuclear material suggests that they are *tetraploid cells*.



Macropolycytes

*Is about **twice** the* size of a normal neutrophil ,**15–25 µm**

Analysis of its DNA content shows that it is tetraploid rather than diploid, the number of lobes present being increased proportionately.

Some macropolycytes are binucleated .

Occasionally seen in the blood of healthy subjects.

Increased numbers are seen in an inherited (***autosomal dominant***) condition in which ***1–2%*** of neutrophils are giant with ***six- to 10-lobed nuclei***, or with **twin mirror-image nuclei** .

Increased numbers, together with rather non-specific dysplastic features, have been described in **DiGeorge's syndrome**

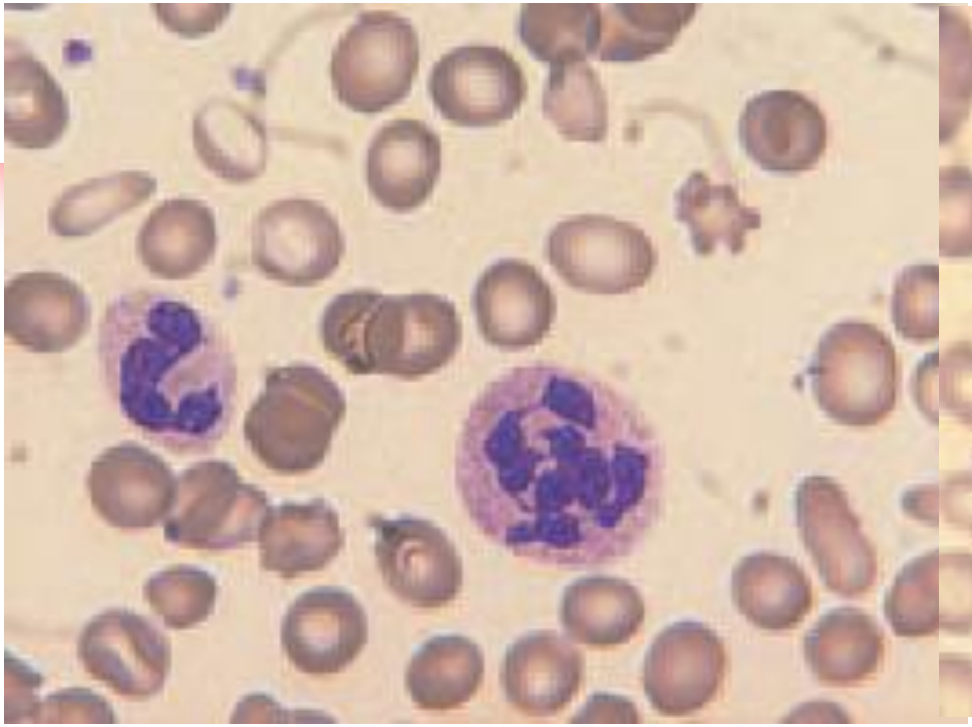
Macropolycytes

Macropolycytes, including binucleated cells, have been observed following the ***administration of G-CSF*** and are present in increased numbers in megaloblastic anaemia.

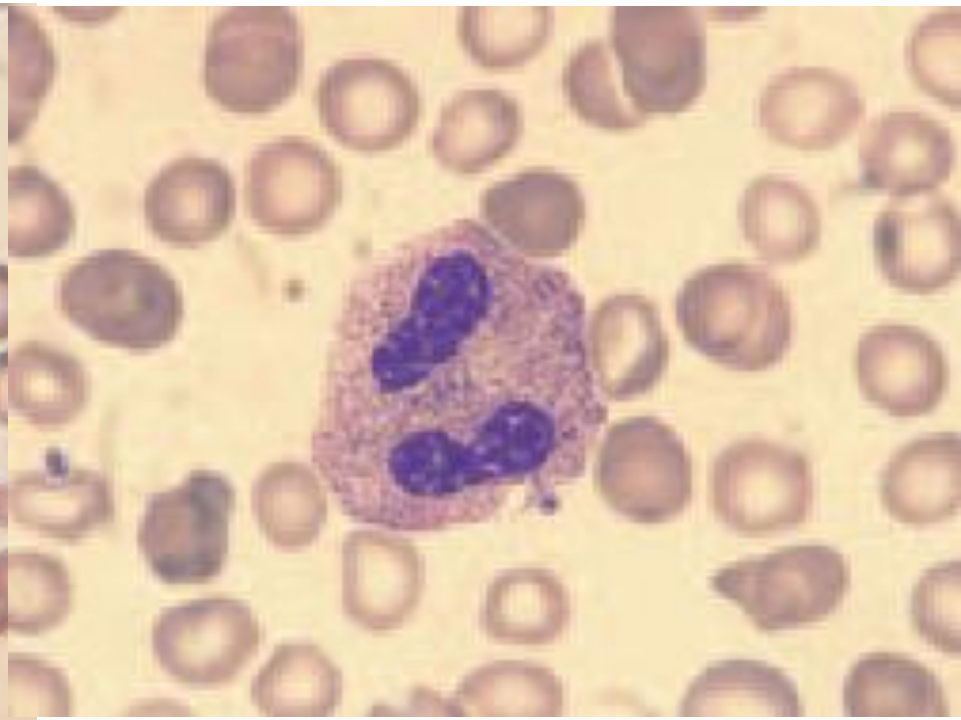
In megaloblastic anaemia they have a DNA content varying between diploid and tetraploid

In contrast to hypersegmented neutrophils, they are derived from giant metamyelocytes.

They have also been reported in **chronic infection**, **CML** and **other myeloproliferative disorders**, and following the administration of **cytotoxic drugs** and **antimetabolites**.



Peripheral blood film of a patient with a MDS showing a *macropolycyte*, which is twice the size of the adjacent normal, neutrophil. The nucleus is also twice normal size and shows increased nuclear segmentation; it is likely that this is a tetraploid cell. In addition the film shows anisochromasia.



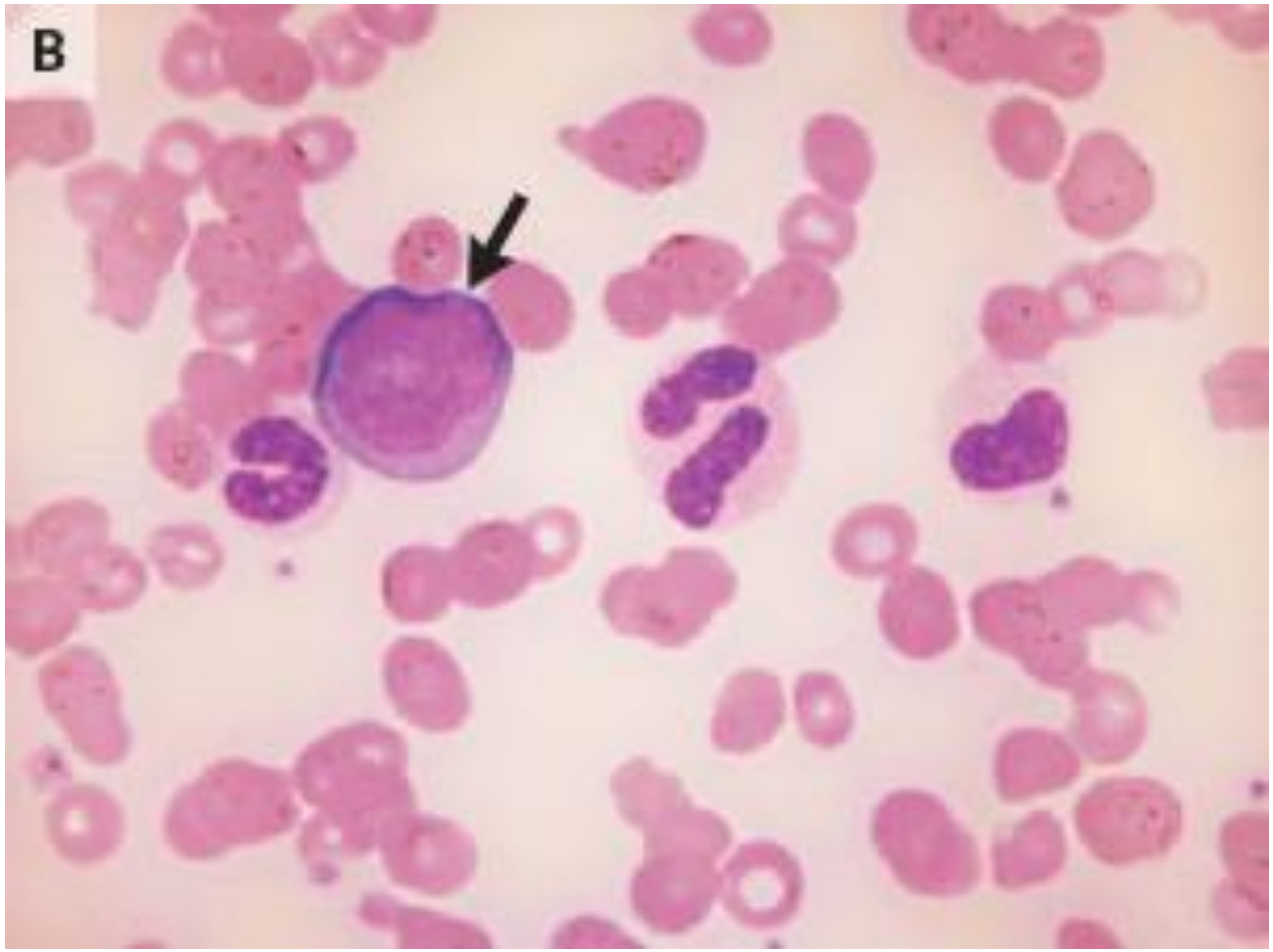
Peripheral blood film of a patient with CLL and reversible chlorambucil-induced myelodysplasia showing a binucleated tetraploid neutrophil.

Table 3.2

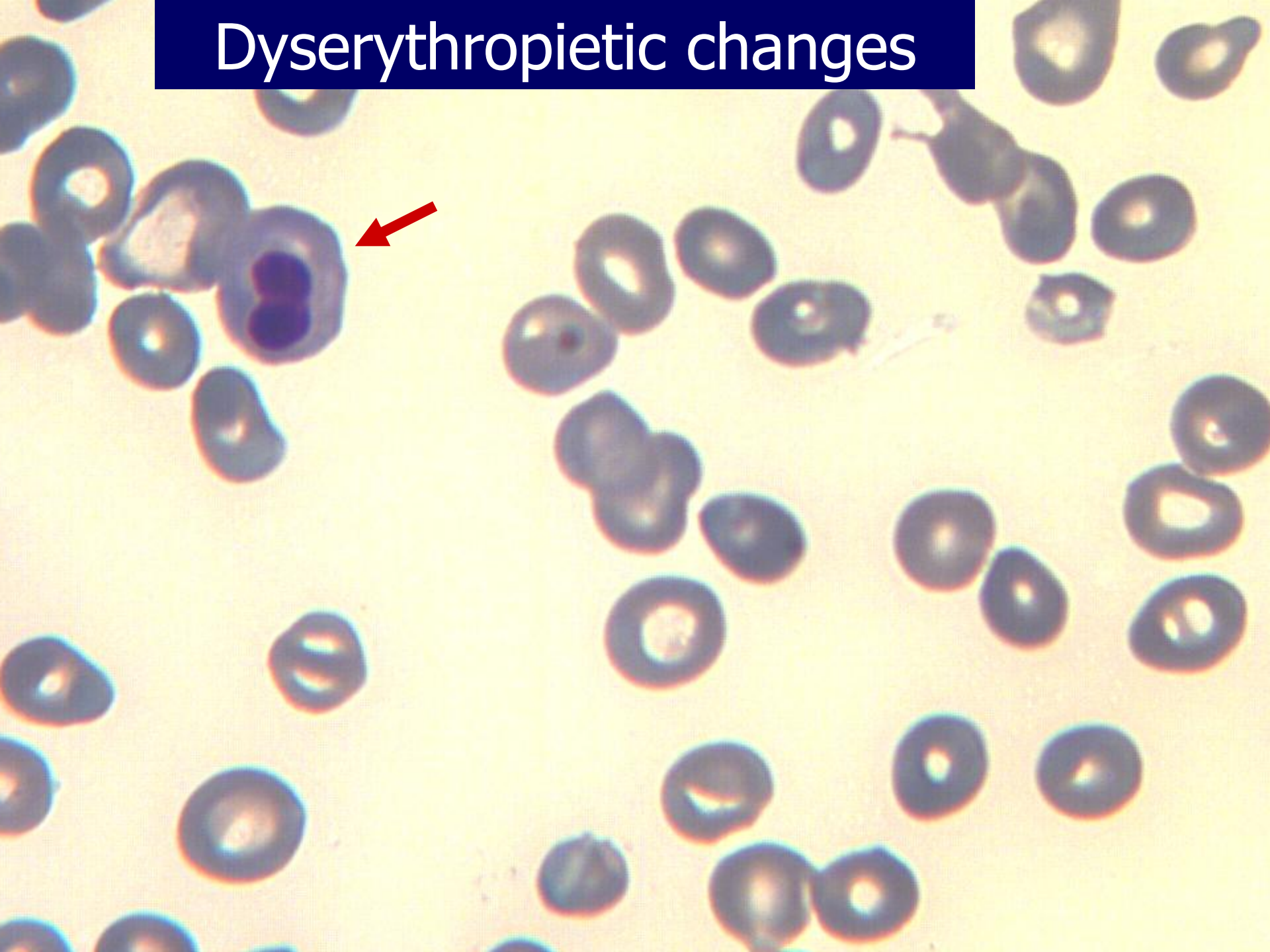
Morphologic abnormalities in myelodysplastic syndromes

Lineage	Peripheral Blood	Bone Marrow
Erythroid	Ovalomacrocytes	Megaloblastoid erythropoiesis
	Elliptocytes	Nuclear budding
	Acanthocytes	Ringed sideroblasts
	Stomatocytes	Internuclear bridging
	Teardrops	Karyorrhexis
	Nucleated erythrocytes	Nuclear fragments
	Basophilic stippling	Cytoplasmic vacuolization
	Howell-Jolly bodies	Multinucleation
Myeloid	Pseudo-Pelger-Huët anomaly	Defective granulation
	Auer rods	Maturation arrest at myelocyte stage
	Hypogranulation	Increase in monocytoid forms
	Nuclear sticks	Abnormal localization of immature precursors
	Hypersegmentation	
	Ring-shaped nuclei	
Megakaryocyte	Giant platelets	Micromegakaryocytes
	Hypogranular or agranular platelets	Hypogranulation
		Multiple small nuclei

shows ***MDS***, with a blast cell (arrow) and two neutrophils that have hypolobulated nuclei, one of which is binucleated and the other hypogranular.



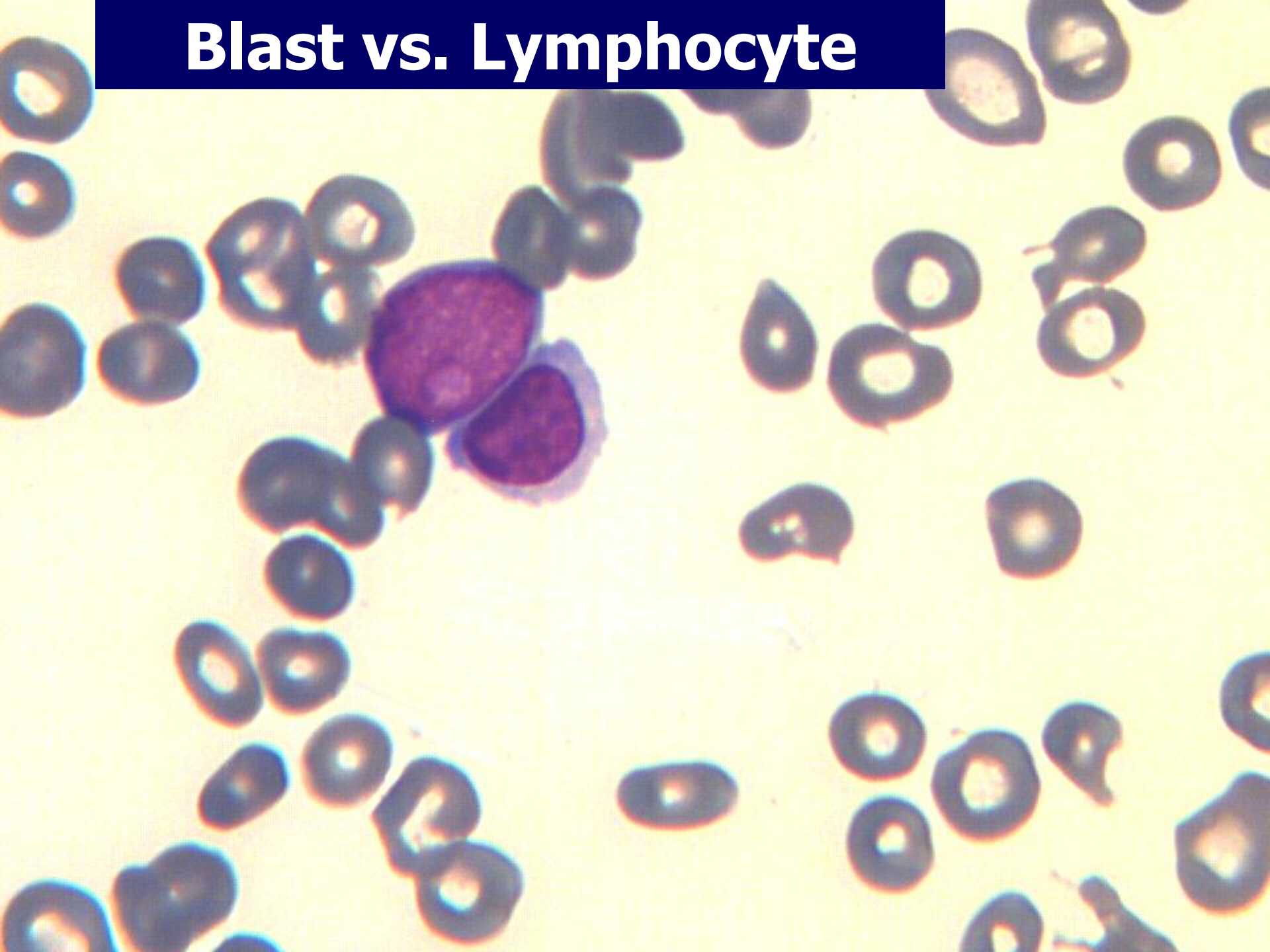
Dyserythropietic changes



Hyposegmentation

Blast

Blast vs. Lymphocyte



Hypogranularity

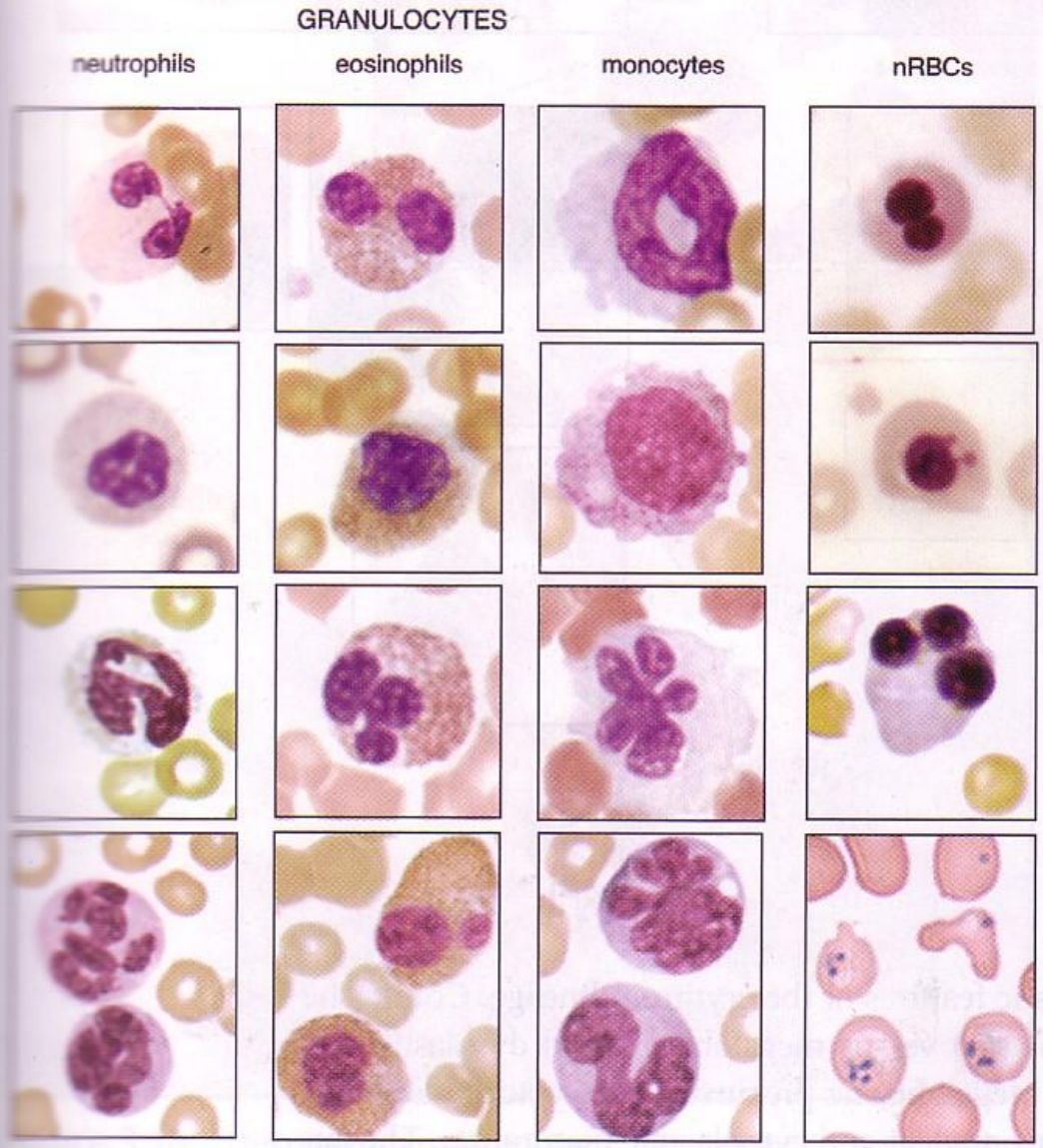
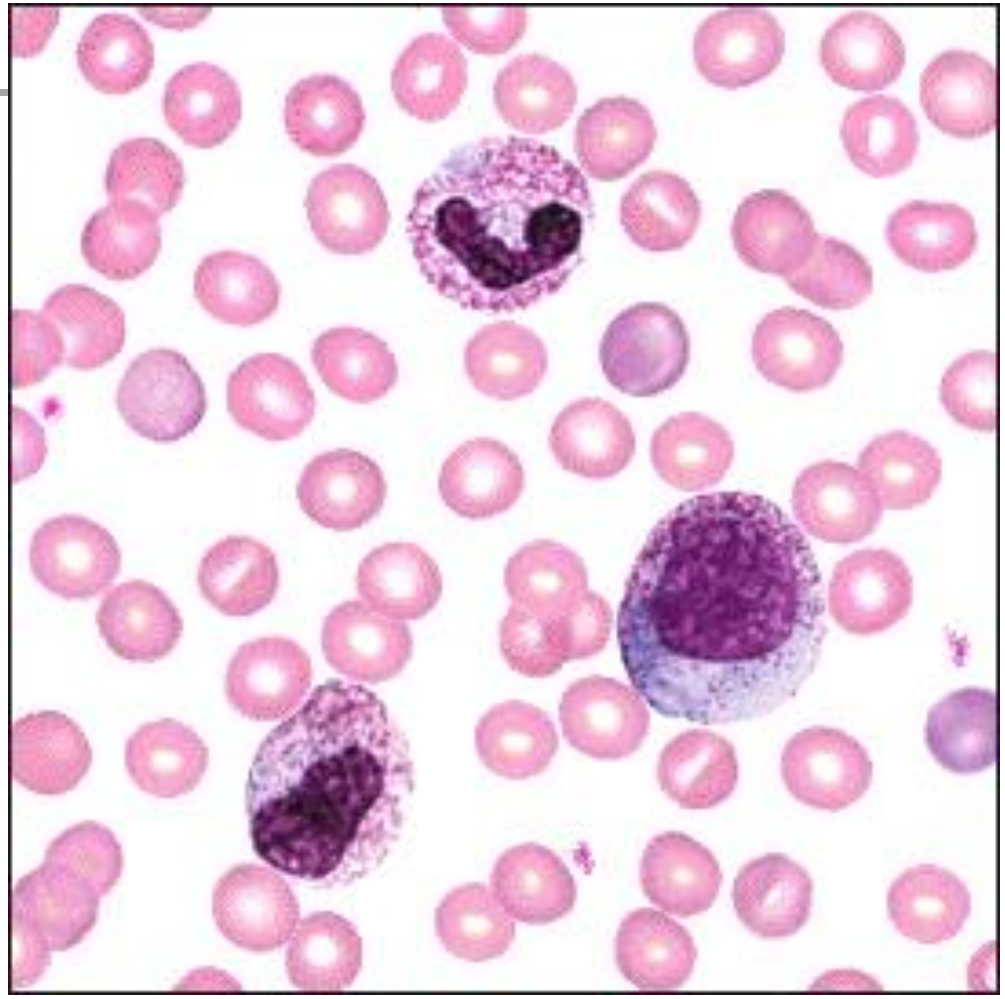


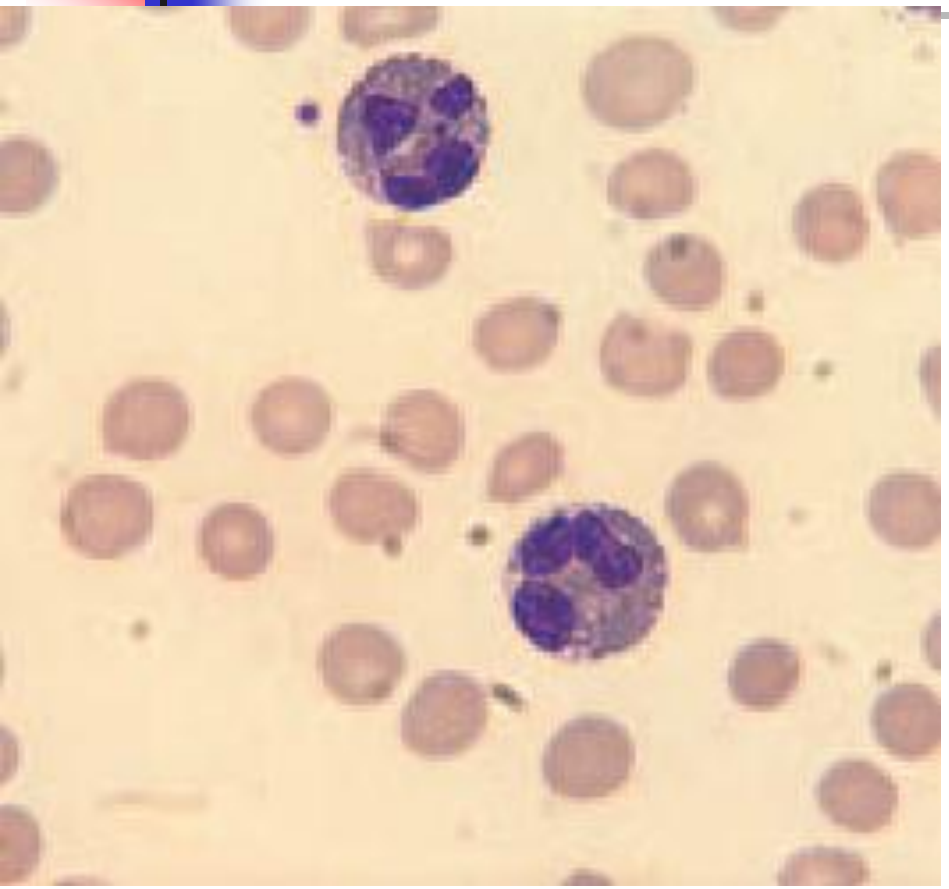
Figure 3.5 Dysplastic nuclear features in circulating cells. Composite image taken from several cases of myelodysplastic syndrome showing dysplastic nuclear features seen in circulating granulocytes and nucleated RBCs. The right lower figure shows numerous Pappenheimer bodies.

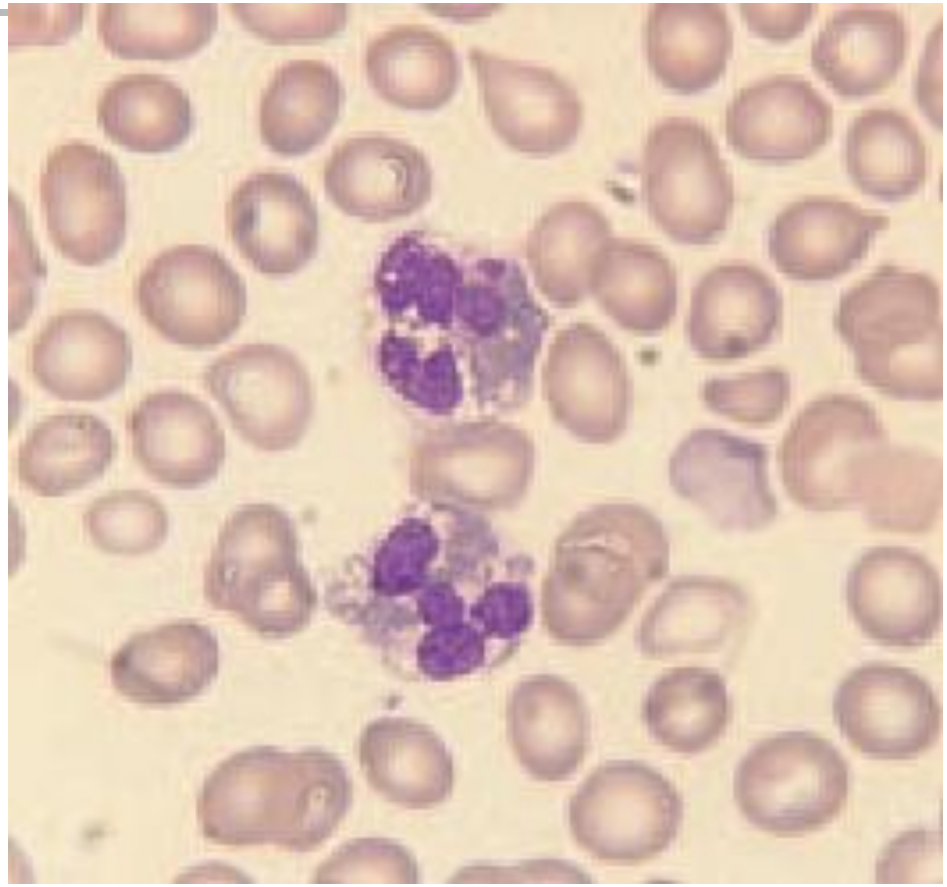
Shift to the left & reactive changes in neutrophils

response to G-CSF or GM-CSF therapy.



Eosinophilia





Idiopathic hypereosinophilic syndrome, HES

- **Eosinophilia** is commonly associated with a large number of disparate *non-clonal* and *clonal disorders*.
- In the majority of cases it is caused by ***reactive conditions*** including atopy or allergies, autoimmune disorders or infection.
- In rare cases, a ***hematological disorder*** may be associated with sustained eosinophilia, which can be either non-clonal or clonal.

Idiopathic hypereosinophilic syndrome, HES

The term HES is used when:

١. The blood eosinophil count is persistently greater than **$1.5 \times 10^9/l$**

٢. For at least **6** months,

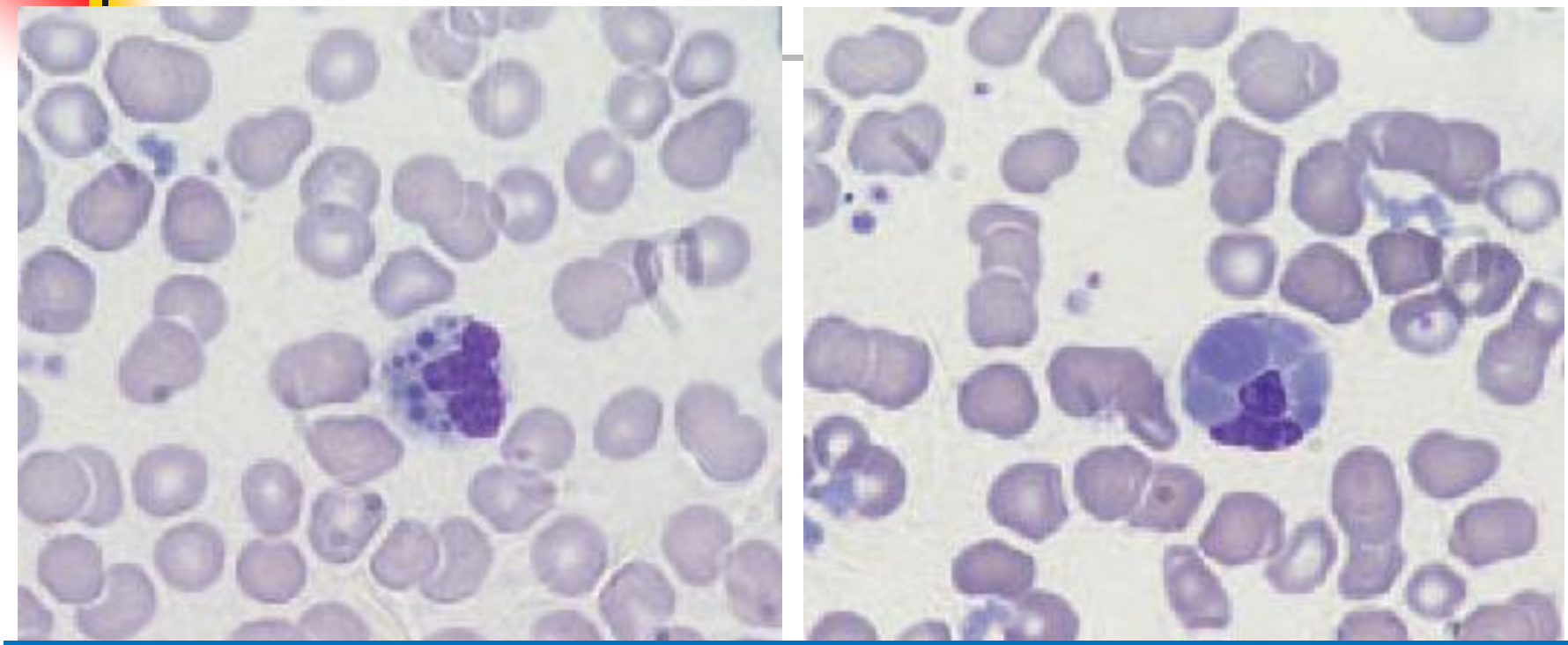
٣. With ***damage to end organs*** such as heart, gastrointestinal tract, skin, joints or nervous system and

٤. ***No evidence of clonality***.

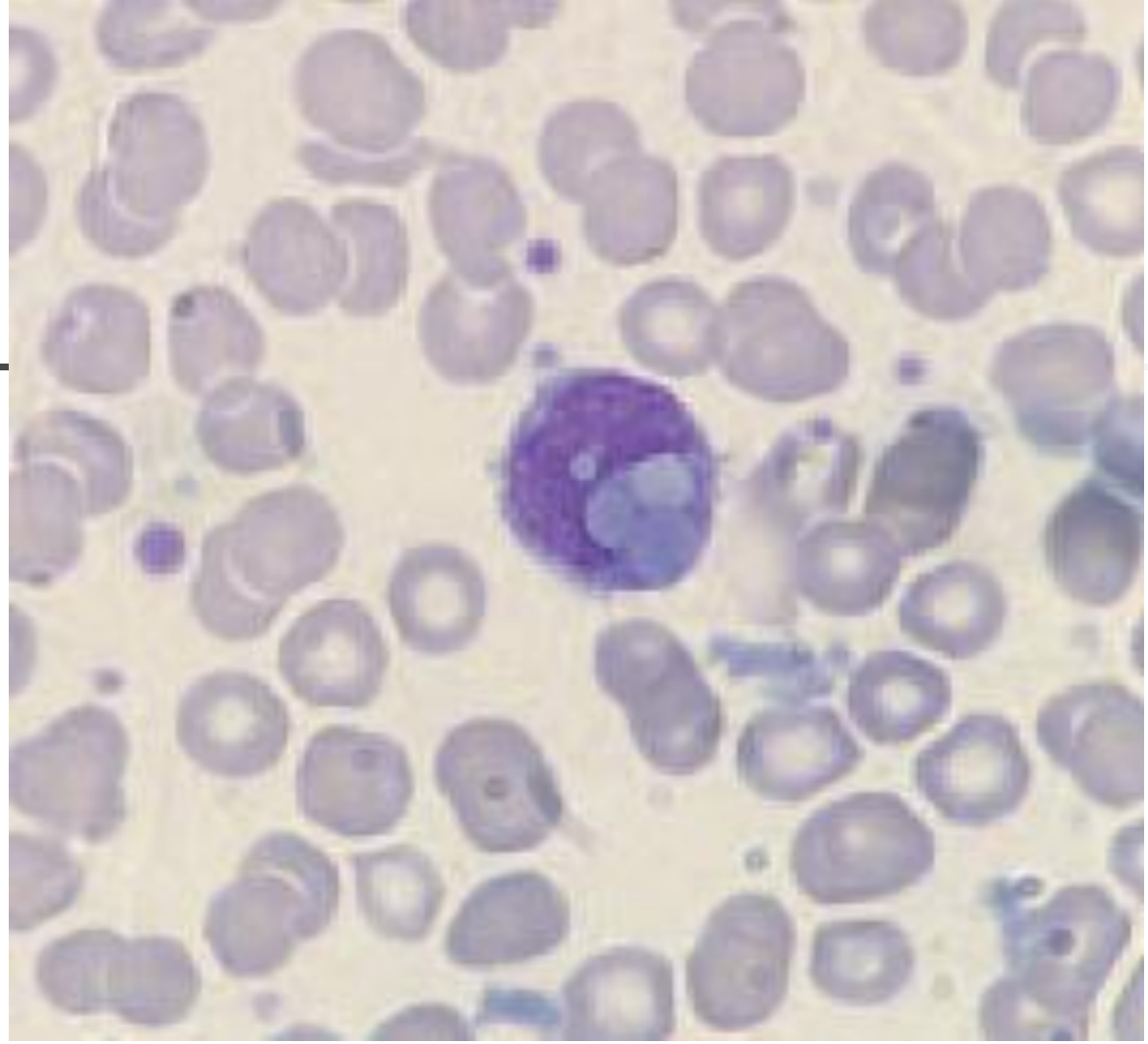
Clonal eosinophilia is most frequently associated with chronic myeloproliferative disorders (***Eos-MPN***), and particularly chronic eosinophilic leukemia (***CEL***).

It is only rarely seen in myelodyplastic syndromes (MDS) or acute leukemias

Cryoglobulinaemia

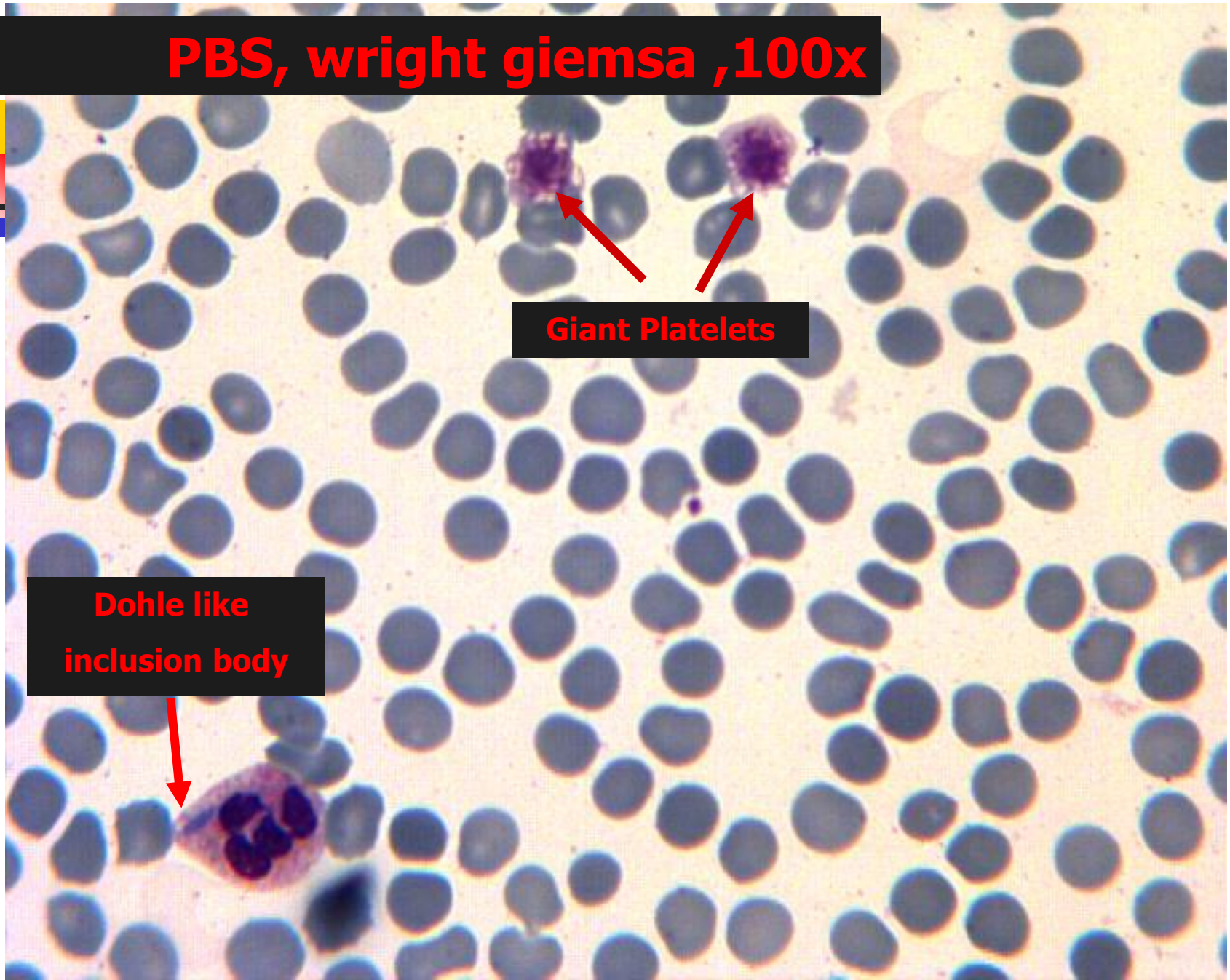


Peripheral blood film of a patient with ***cryoglobulinaemia*** showing cryoglobulin that has been ingested by neutrophils and appears as: (a) ***small round inclusions***; and (b) ***large masses*** filling the cytoplasm and displacing the nucleus. Some extracellular cryoglobulin is also present.

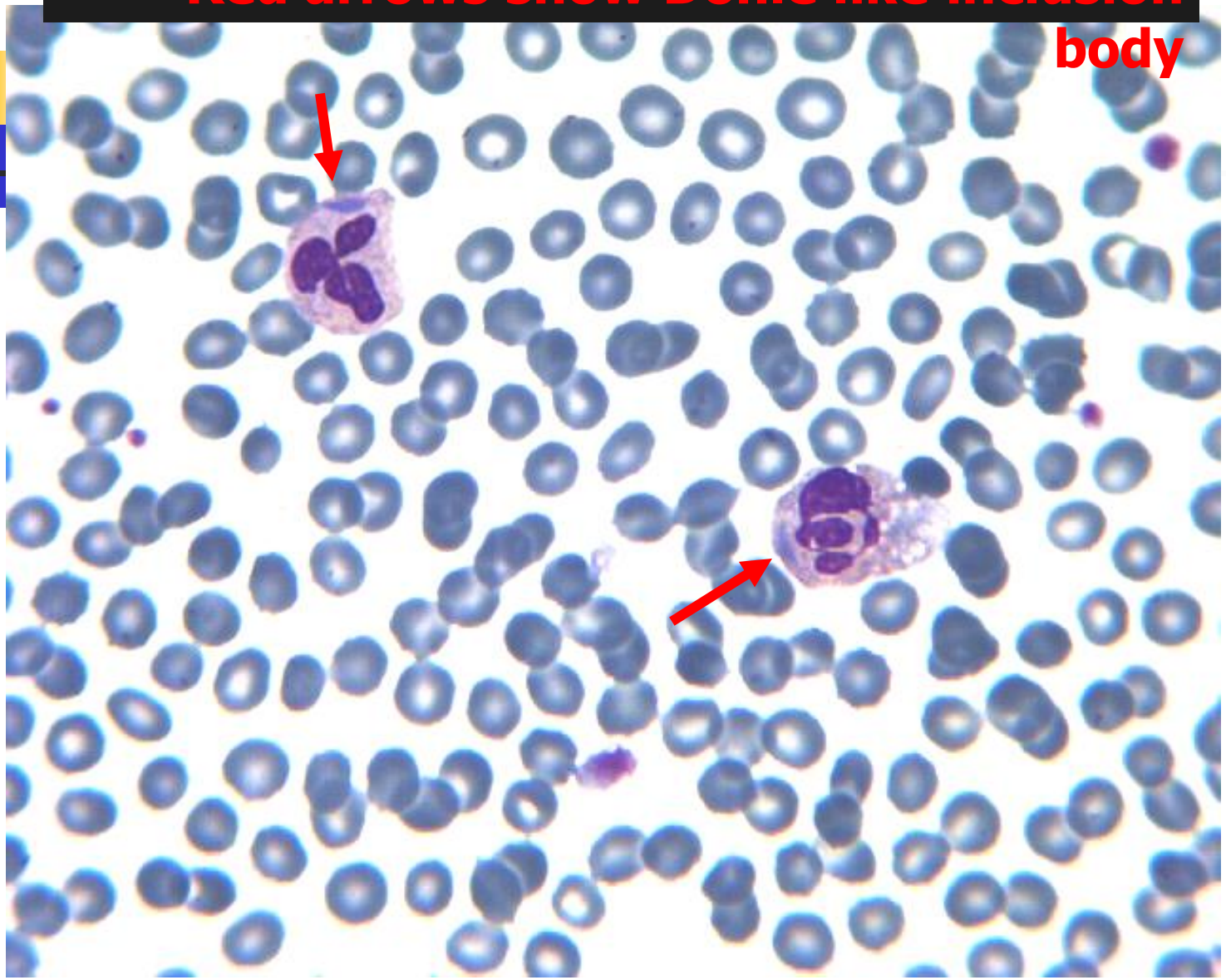


Peripheral blood film of a patient with cryoglobulinaemia showing cryoglobulin within a monocyte.

PBS, wright giemsa ,100x



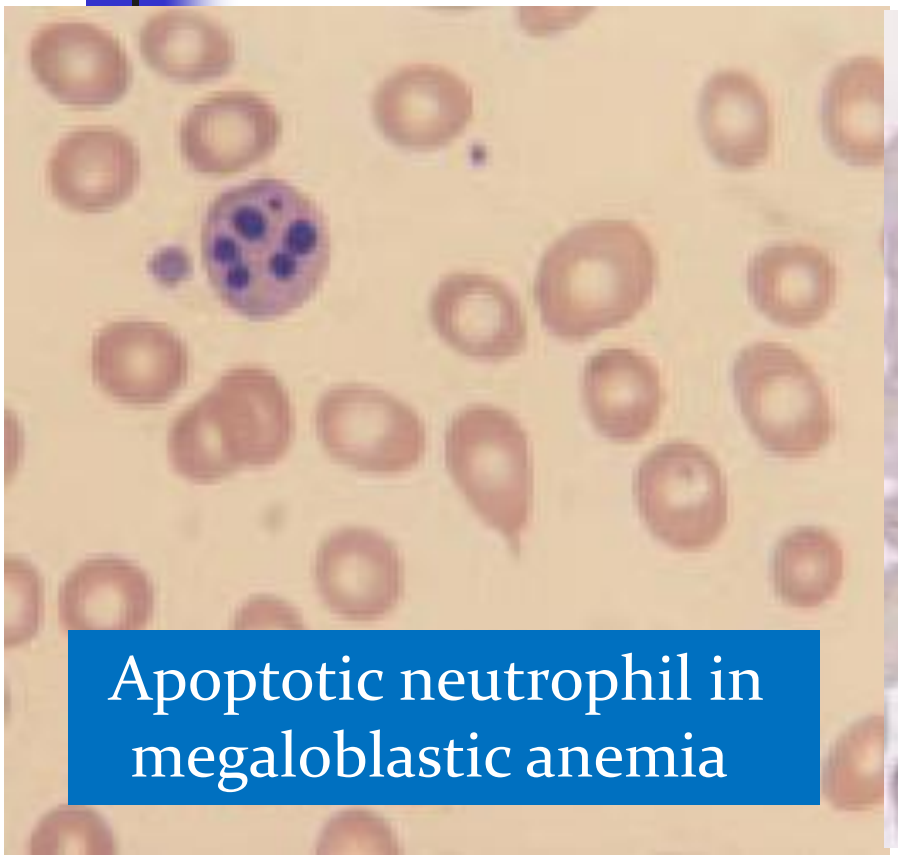
Red arrows show Dohle like inclusion body



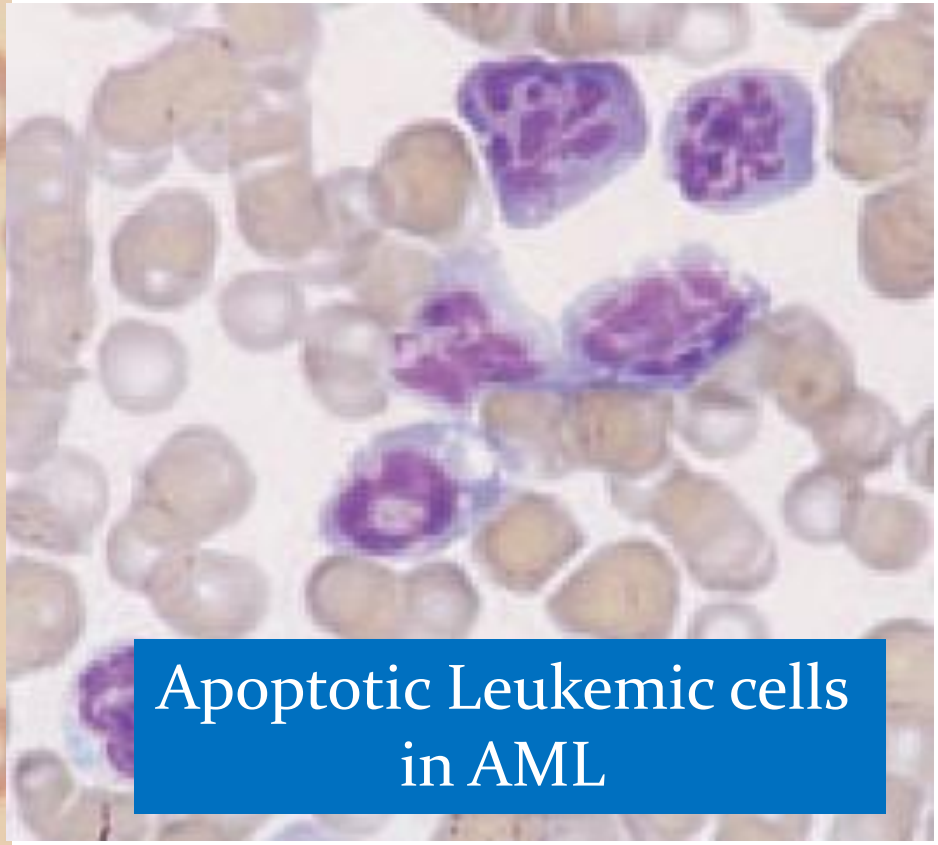
A neutrophil containing refractile bilirubin crystals.

Rarely, **bilirubin crystals** are seen within neutrophils of infants and children with a markedly elevated plasma bilirubin; they are refractile and faintly yellow ;they have been found to form *in vitro* **when EDTA-anticoagulated blood is allowed to stand for at least 30 minutes**

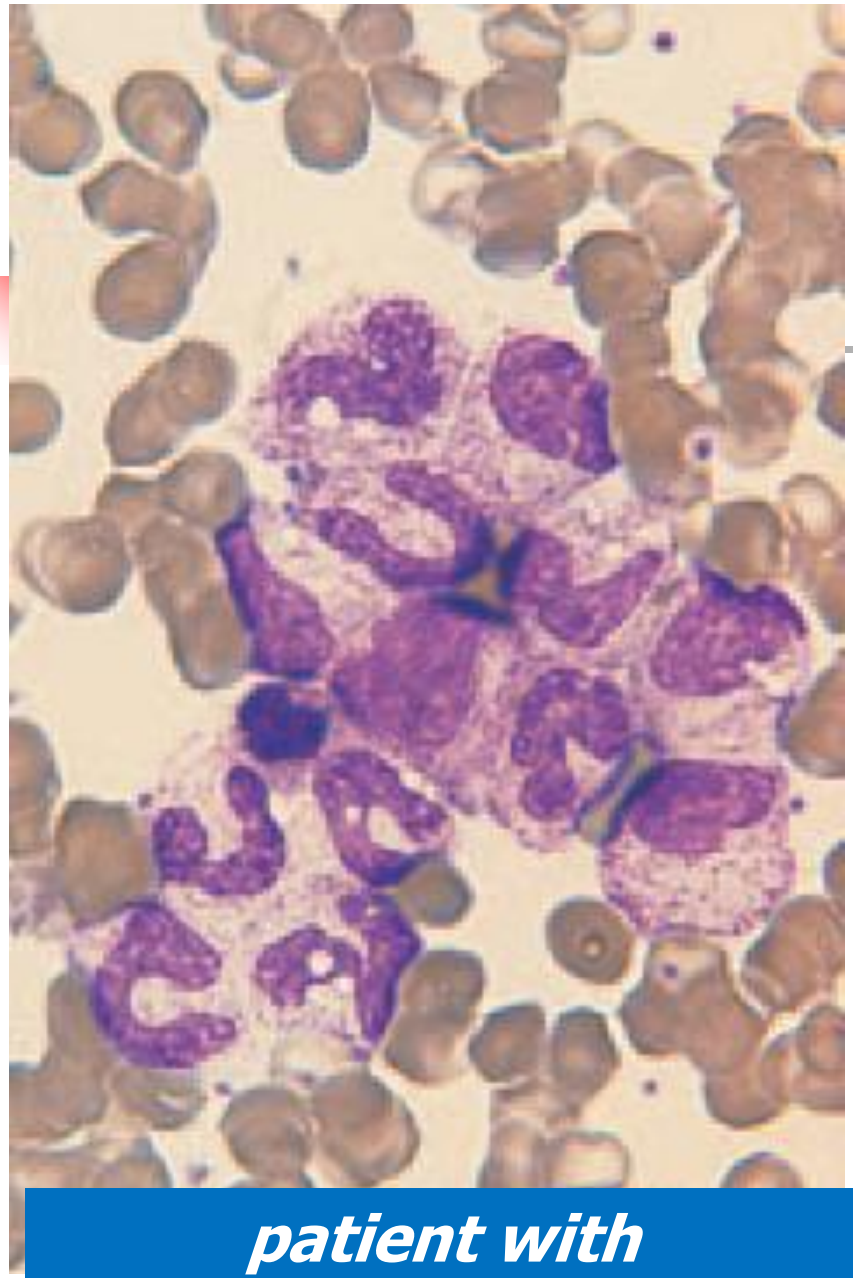
Necrobiotic (apoptotic) neutrophils and other myeloid



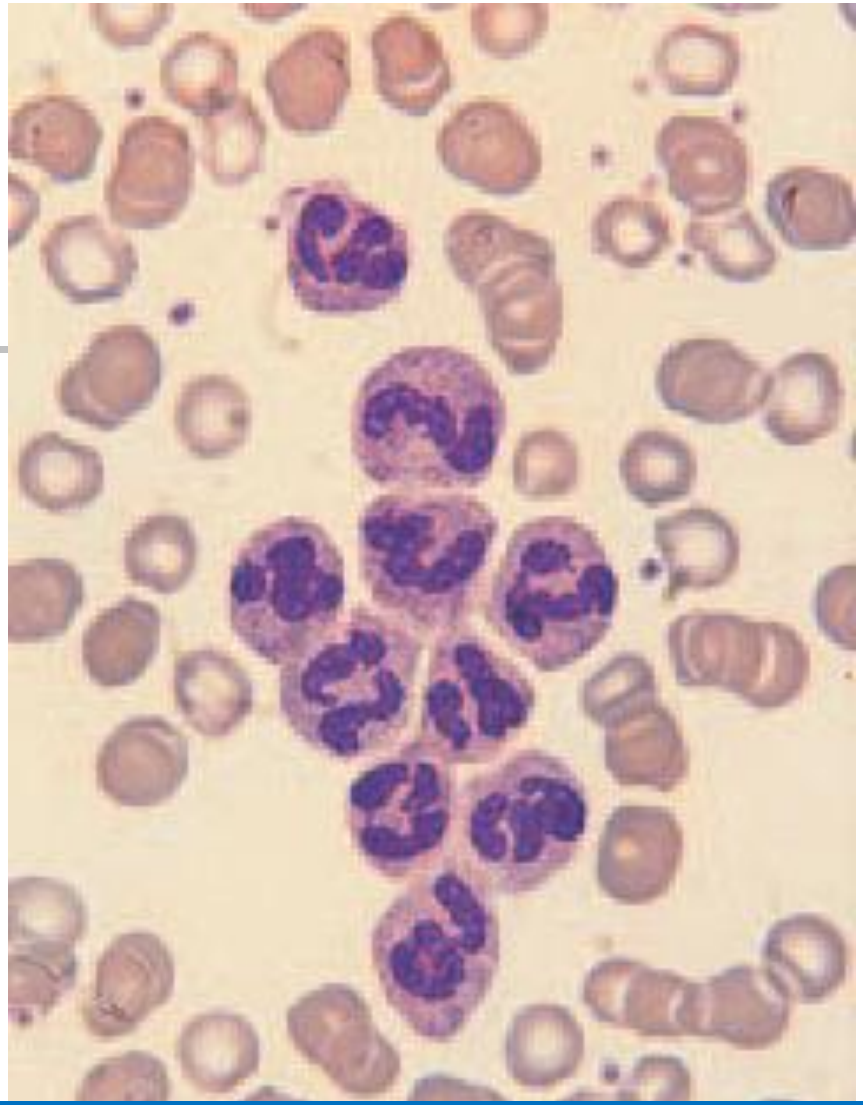
Apoptotic neutrophil in megaloblastic anemia



Apoptotic Leukemic cells in AML



patient with overwhelming sepsis



Patient with rheumatoid arthritis showing neutrophil aggregation caused by a **cold Ab**.

Neutrophil aggregation

Aggregation of neutrophils with or without aggregation of platelets develops *in vitro in some patients when* ***EDTA-anticoagulated*** **blood is allowed to stand.**

This is an ***antibody mediated time-dependent phenomenon*** which is not of any clinical significance although it may lead to ***erroneous automated WBCs.***

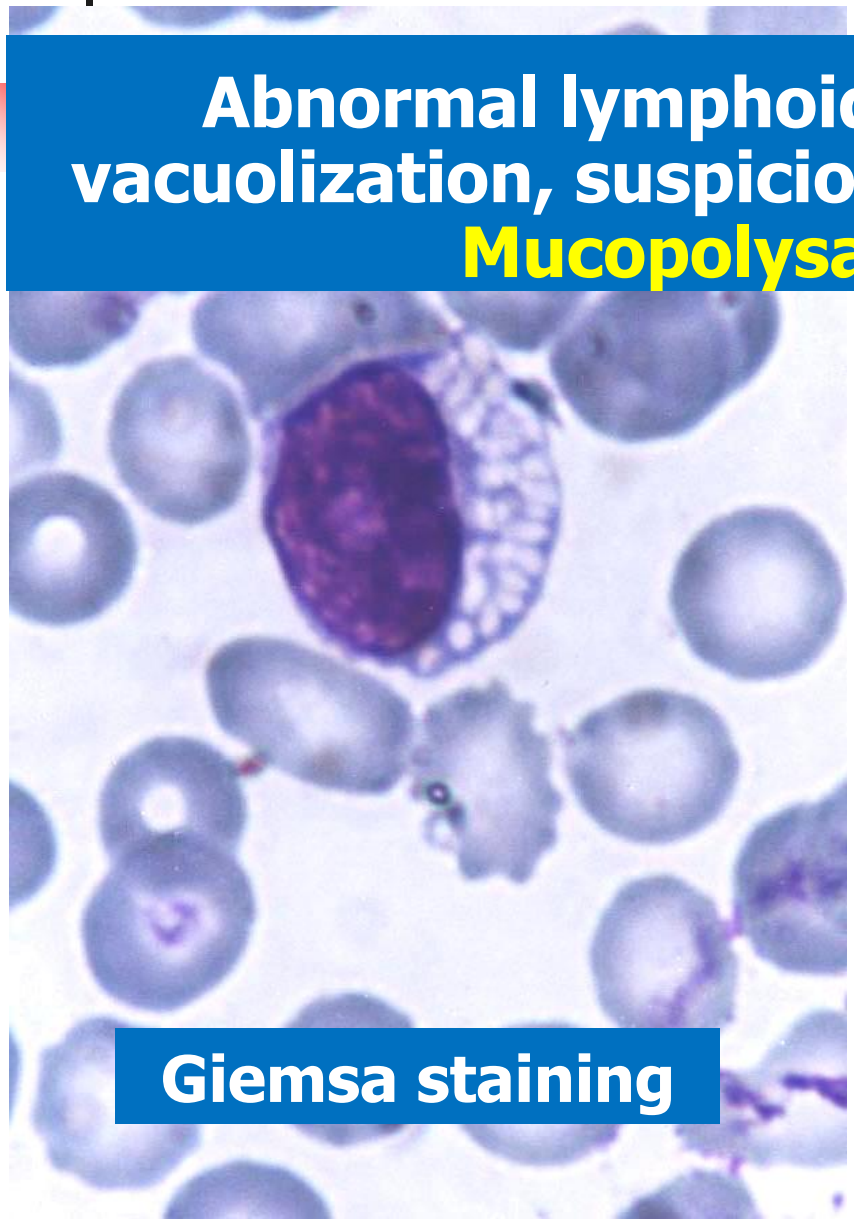
Neutrophil aggregation has also been observed as a transient phenomenon in association with ***infectious mononucleosis*** and in ***acute bacterial infection***

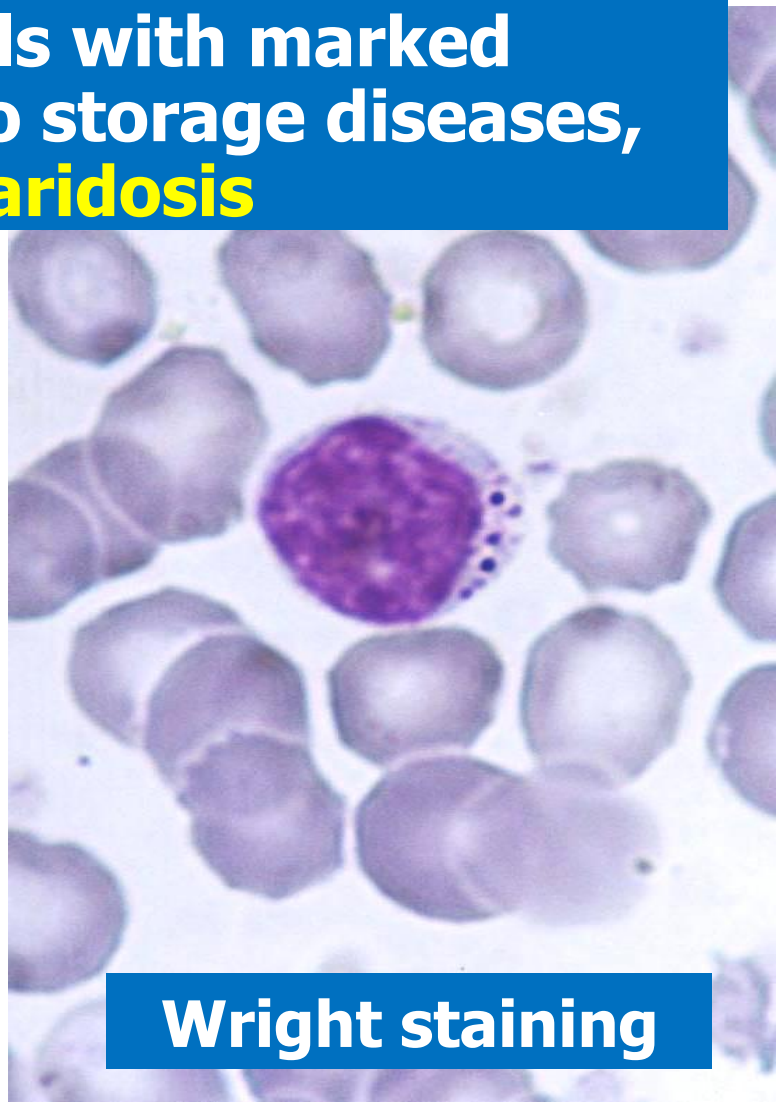
Occasionally, it is observed in a patient ***over many months or years*** and may then be ***associated with autoimmune disease***

In some patients when the cause is a ***cold-acting antibody***, red cell agglutinates coexist.

What is the main finding? What do you report?

Abnormal lymphoid cells with marked vacuolization, suspicious to storage diseases, Mucopolysaccharidosis





Mucopolysaccharidosis

Dense azurophilic granules, resembling toxic granulation in neutrophils, are seen in all leukocytes. Most characteristic of these disorders are the ***metachromatic granules*** surrounded by a clear zone seen in lymphocytes.

بخش چهارم :

منابع خطا مرتبط با معرف ها و محلول ها در هماتولوژی

ایزوتون / لایز / دترژنت

تهیه و تنظیم: دکتر مهرداد ونکی

Isotone(diluent)
ایزوتون رقیق کننده

- با توجه به اینکه در هر میکرولیتر خون به طور متوسط ۵ میلیون سلول وجود دارد برای شمارش دقیق و عبور تک تک سلول ها از روزنه امپدانسی دستگاه نیاز به یک مرحله رقیق سازی دقیق نمونه خون داریم
- ویژگی های رقیق کننده هماتولوژی ایده آل (ایزوتون):
- ۱- کمترین تغییرات مرفولوژیک سلولی داشته باشد
- ۲- قابلیت رسانائی مناسب وپایدار(تغییر دما محیط از محدوده ۱۵ تا ۳۰ درجه که اپتیمال ایزوتون است منجر به تغییر میزان رسانائی ایزوتون می گردد)
- ۳- Phو فشار اسمزی مناسب(حاوی گلوگز و کلرور سدیم)
- ۴- دارای حداقل پارتیکل شناور اضافی(ایجاد پالس کاذب و شمارش کاذب)
- ۵- دارای آنتی سپتیک مناسب (ممانعت از رشد قارچ و باکتری و تولید کدورت و پارتیکل اضافی در ایزوتون در زمان نگاه داری / به دلیل خاصیت انفجاری سدیم ازاید در لوله های سربی فاضلاب توصیه می شود انتی سپتیک ایزوتون ماده ای به جز سدیم ازاید باشد

لایز سل کانتر

جهت شمارش سلول های سفید و اندازه گیری هموگلوبین پاره شدن اریتروسیت ها و حذف گلبول های قرمز به طور کامل ضروری است که با لایز امکان پذیر است.

۱- ساپونین (لایز گیاهی با کاربرد قدیمی)

۲- سورفاکتانت ها (لایز جدید) :

اَلف - محلول لایز هیپوتونیک : لکوسیت ها به میزان اندک اسیب دیده ولی چون بقایای غشای اریتروسیت باقی می ماند جهت روش های اپتیکال مناسب است و جهت سل کانتر های امپدانسی مناسب نمی باشد

ب - محلول لایز کاتیونیک (فعال کننده سطحی) مناسب جهت سل کانتر های امپدانسی / عیب این محلول لیز کننده سریع اثرات آسیب سلولی وسیع آن است)

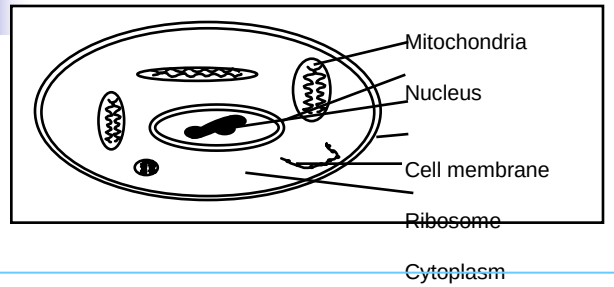
ج - محلول لایز غیر یونی (فعال کننده سطحی) : تنها محلول لایز سریع است که هیچ بقایائی از سلول اریتروسیت باقی نمی ماند و کمترین اسیب سلولی را به سلول سفید می زند

Partial diff lyse
محلول لایز دیف نسبی

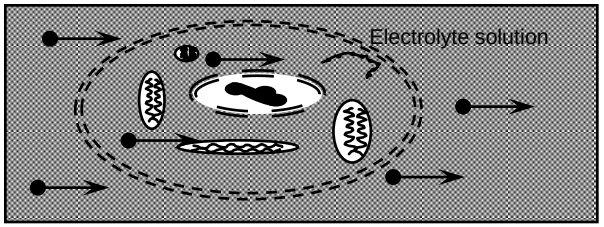
- بزرگی سلول ها در لام خون محیطی به ترتیب شامل:
- Mono>granolocyte>lymph
- بزرگی سلول ها پس از چروکیدگی ناشی از لایز دیف:
- Neutrophil(Large cell) > mono/eos/baso(mid cell)> lymph(small cell)
- لایز دیف منجر به لیز کامل اریتروسیت ها ولیز نسبی لکوسیت ها (چروکیدگی لکوسیت ها به دلیل ایجادسوراخ در غشا لکوسیت ها و خروج مایع داخل سلولی لکوسیت می باشد)
- سلول بلاست و نابالغ و لنفوسیت های اتیپیک پس از مجاورت با لایز دیف نسبی در ناحیه میانی سایز قرار می گیرند .
- سلول ها با حجم متفاوت پالس های متفاوت حاصل می نمایند که توسط آستانه های متمایز کننده از هم افتراق داده می شوند (discriminator thresholds) به عنوان مثال ذراتی باحجم ۲۰-۲فمتولیتر به عنوان پلاکت /ذرات با حجم ۳۶۰-۳۶ فمتولیتر اریتروسیت
- جایگاه شمارش لکوسیت ذراتی باحجم ۸۴-۳۵ فمتولیتر سلول کوچک (لنفوسیت) LCR.
- ذرات با حجم ۱۱۴-۸۴ فمتولیتر سلول متوسط (میانی) شامل بازوفیل و منوسیت و ائوزینوفیل و لنف اتیپیک وسلول های نابالغ MCR.
- ذرات با حجم ۳۰۰-۱۱۴ فمتولیتر شامل نوتروفیل و باند و متامیلوسیت LCR .

Leukocyte-Histogram

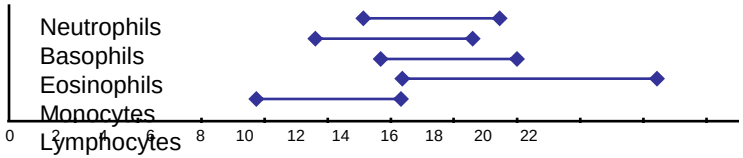
Lyse of RBC and partial lyse of WBC



After Lysis



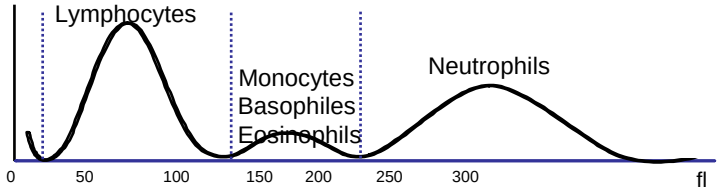
Before adding lysing reagent



Cell diameter in µm

Neutrophils	10 - 15
Basophils	9 - 14
Eosinophils	11 - 16
Monocytes	12 - 20
Lymphocytes	7 - 12

After adding lysing reagent



Cell diameter in fl

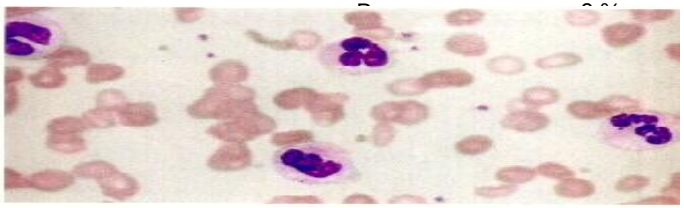
Lymphocytes	30 - 80
Monocytes	60 - 120
Basophils	70 - 130
Eosinophils	80 - 140
Neutrophils	120 - 250

Elevated number of WBC

Neutrophilia

WBC-Histogram

Results		Differential	
WBC	+ 23.8 x 10^9/L	Band	8 %
LYM%	8.1%	Seg	77 %
MXD%	7.9%	Lymph	7 %
NEUT%	84.0%	Mono	7 %
		Eo	1 %



(x 400)

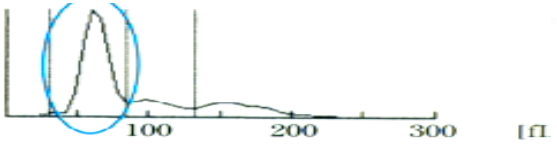
Clinical diagnosis: Neutrophilia

Prominent peak with broad distribution (NEUT%) for large leukocytes.

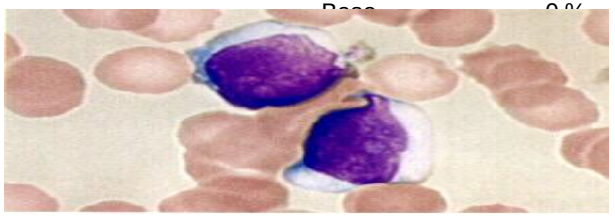
In case of Lymphocytopenia a similar curve is obtained.

Lymphocytosis

WBC-Histogram



Results		Differential	
WBC	7.9 x 10^9/L	Band	4 %
LYM%	+ 64.7%	Seg	20 %
MXD%	15.8%	Lymph	64 %
NEUT%	– 19.5%	Mono	4 %
		Eo	5 %



(x 1000)

Clinical diagnosis: Lymphocytosis

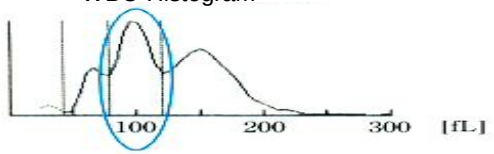
High, pointed peak in lympho area (LYM%).

In case of Neutropenia a similar curve is obtained.

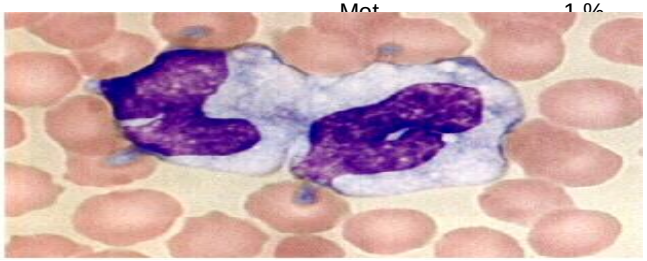
Increase number of WBC

Monocytosis

WBC-Histogram



Results			Differential	
WBC		7.7 x 10^9/L	Stab	8 %
LYM%	F1 *	13.2%	Seg	37 %
MXD%	F2 *	37.7%	Lymph	17 %
NEUT%		49.1%	Mono	35 %
			Eo	1 %
			Baso	0 %
			Mot	1 %



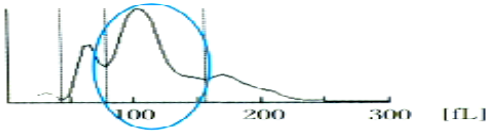
(x 1000)

Clinical diagnosis: Monocytosis

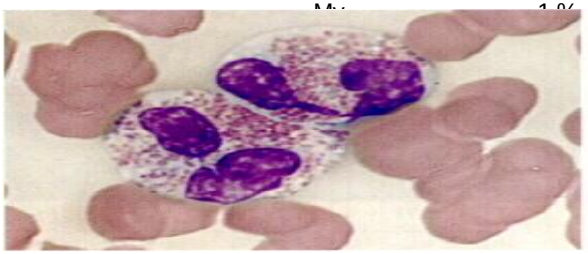
Monocytes, which are the largest leukocytes in normal peripheral blood, become smaller than neutrophils under the influence of the lysing reagent. On the histogram, they fall in the middle cell ratio (MXD%) ( ) . Similar patterns can be seen in eosinophilia. These two different clinical entities need to be differentiated from each other by manual differential.

Eosinophilia

WBC-Histogram



Results		Differential	
WBC	4.3 x 10^9/L	Stab	1 %
LYM%	18,3%	Seg	19 %
MXD%	+ 62,2%	Lymph	20 %
NEUT%	– 19.5%	Mono	9 %
		Eo	47 %
		Baso	1 %
		My	1 %



(x 1000)

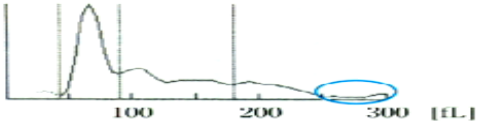
Clinical diagnosis : Eosinophilia

Eosinophils and basophils, which are categorized as granulocytes together with neutrophiles, are smaller than neutrophils due to contraction under the influence of the lysing reagent.
On the histogram, they are located in the middle cell ratio MXD% ( ) where also monocytes are present. A similar pattern can be seen in monocytosis. Both diseases must be differentiated from each other by manual differential.

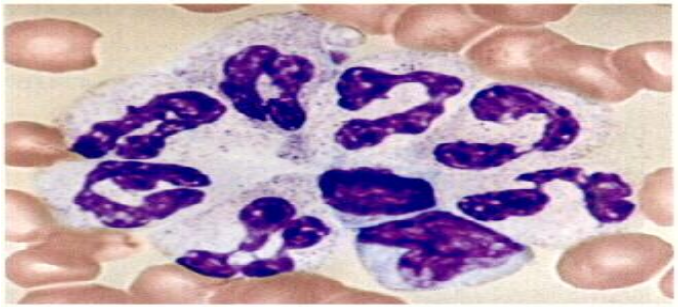
WBC Agglutination

Case 1

WBC-Histogram



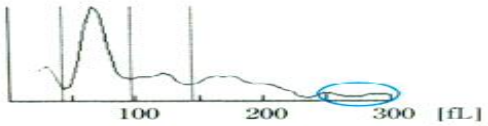
Results		
WBC	–	2.3 x 10^9/L
LYM%		39.7%
MXD%	+	32.2%
NEUT%	–	28.1%



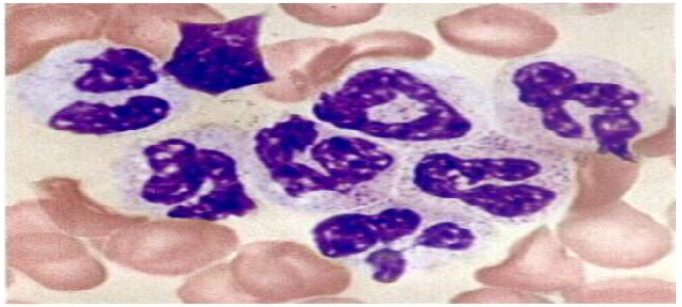
(x 1000)

Case 2

WBC-Histogram



Results		
WBC	–	2.1 x 10^9/L
LYM%		41.9%
MXD%		17.5%
NEUT%	–	40.6%

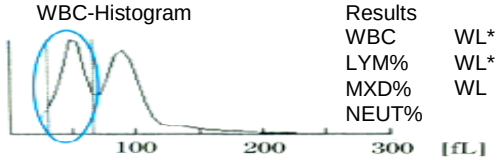


(x 1000)

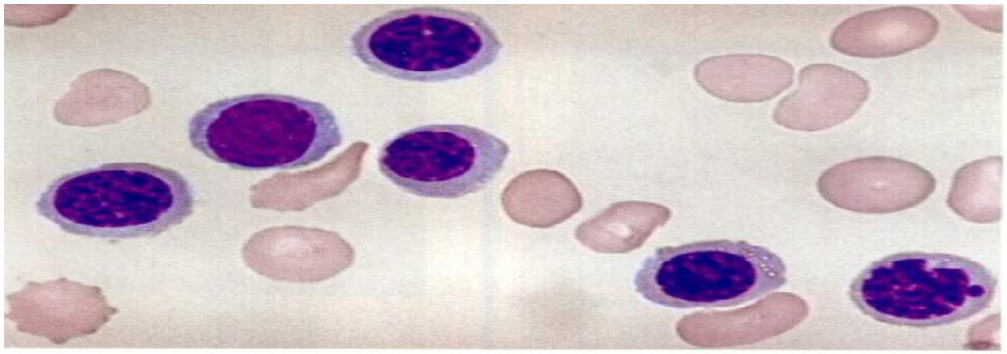
Case: WBC-Agglutination

This is a case of WBC agglutination, which occurs rather rarely. The histogram does not shown a clear tri-modal pattern, with particles present in the region above 250 fl ( ). The count of leukocytes is likely to be falsely low. Depending on the nature of leucocytes antibodies, agglutination may be dissolvable and measurement may become possible upon incubation the at 37 º C or upon washing the samples with isotonic saline.

Nucleated red blood cells (NRBC)



Results		
WBC	WL*	56.1 x 10^9/L
LYM%	WL*	42.7%
MXD%	WL	-.---
NEUT%		-.---



(x 1000)

Case: Orthochromatic Erythroblasts (NRBC's) at a concentration of 1352/100 WBC

This is a sample with an extreme number of NRBC. The valley between the erythrocytes ghost area and the small leucocytes area exceeds the limit, and WL flags are given. NRBC are likely to contribute significantly to the population on the WBC histogram ( ) ; therefore most of them are counted as leukocytes. Measurement of samples having NRBC must be corrected by the following equation:

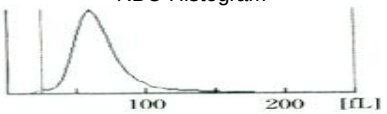
$$\text{corrected WBC-Count} = \frac{\text{measured WBC-Count} \times 100}{(100 + \text{Count of NRBC's *})}$$

*** NRBC-Count: The number of NRBC per 100 leukocytes.**

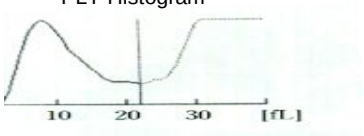
Anemia

Iron Deficiency Anaemia

RBC-Histogram

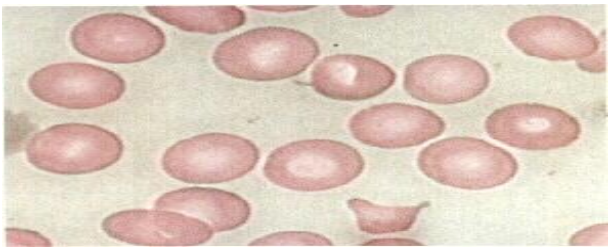


PLT-Histogram



Result

RBC		4.48 x10^{12}/L
HGB		8.8g/dl
HCT		29.3%
MCV	–	65.4fl
MCH	–	19.6pg
MCHC	–	30.0g/dl
RDW-CV		**18.2%**



(x 1000)

1. Case:

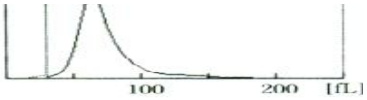
Results:
MCV, MCH and MCHC shows low values and RDW-SD shows a high value.

Differential:
hypochromic RBC´s

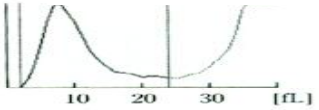
Thus this case is identified as microcytic hypochromic anemia

Suspected Thalassemia

RBC-Histogram

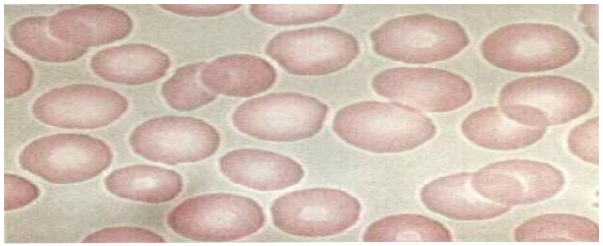


PLT-Histogram



Result

RBC	**+**	**5.97 x10^{12}/L**
HGB		**12.7g/dl**
HCT		**41.1%**
MCV	**–**	**68.8fl**
MCH		**21.3pg**
Result		
RDW		**14.7%**



(x 1000)

2. Case:

Results:
MCV, MCH and MCHC shows low values

Differential:
no prominence in the smear

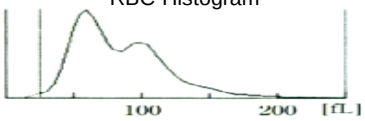
Due to the increase in erythrocyte count and the low RDW value this case is cassified as a thalassaemia minor.

Anemia

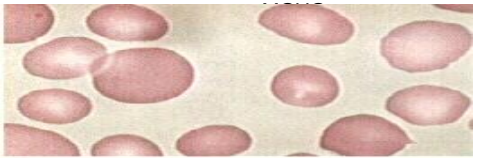
Iron def. anaemia under treatment

2nd Week of treatment

RBC-Histogram



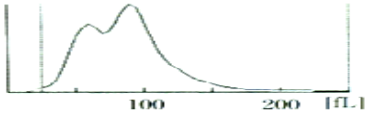
Results		
RBC		4.37 x10^{12}/L
HGB		10.4g/dl
HCT		35.3%
MCV	–	80.8fl
MCH	–	23.8pg
		29.5g/dl
		35.7%



(x 1000)

4nd week of treatment

RBC-Histogram



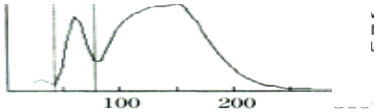
Results		
RBC		5.14 x10^{12}/L
HGB		13.2g/dl
HCT		42.5%
MCV	–	82.7fl
MCH	–	25.7pg
	–	31.1g/dl
MP*	+	1.9%

(x 1000)

The initial effect of the treatment can be seen in data of the 2th week, where the RBC histogram indicates the appearance of normocytic cells while a large number of microcytic cells still are visible in the smear. The RBC histogram of the 4th week still shows a 2-peak curve, but the peak of larger cells became more prominent than the other peak. Compared to the top diagram, this shows an further increase in the number of normocytes as a result of the treatment.

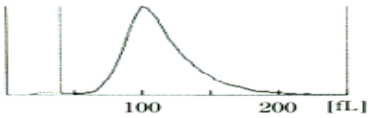
Macrocytic Anaemia (CML)

WBC-Histogram

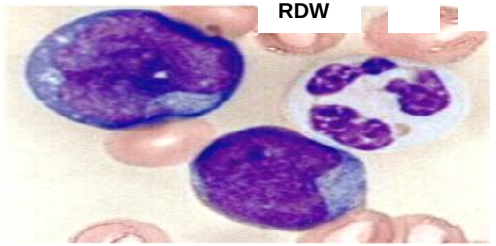


Results		
WBC	+	17.3 x10^{9}/L
LYM%		16.4%
MXD%	T2	-.---
NEUT%	T2	-.---

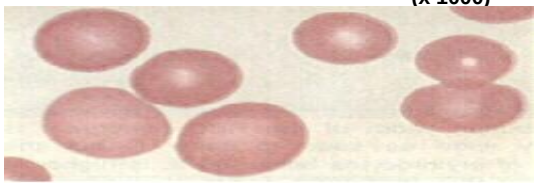
RBC-Histogram



Results		
RBC	–	1.64 x10^{12}/L
HGB	–	6.2g/dl
HCT	–	18.2%
MCV	+	110.0fl
MCH		37.8pg
MCHC		34.1g/dl
RDW		15.2%



(x 1000)

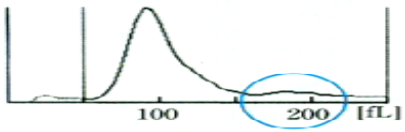


(x 1000)

This is a macrocytic anaemia with development of chronic myelogenous leukemia (CML). The RBC histogram suggests the existence of macrocytes, while the WBC histogram does not show, the valley normally seen between the MXD and the large cell ratio, suggesting the appearance of leukocytes with various sizes.

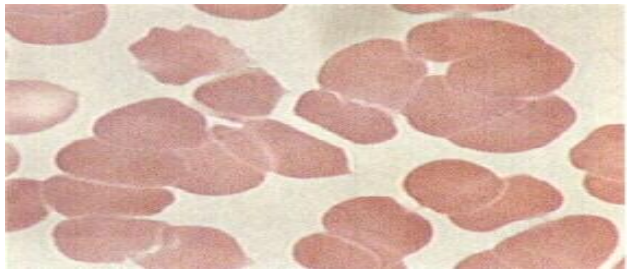
Cold Agglutinins

RBC-Histogram



Results

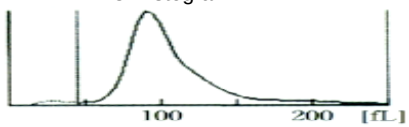
RBC	RU*	2.23 x10^{12}/L
HGB		14.4g/dl
HCT	RU*	24.9%
MCV	RU*	111.7fl
MCH	RU*	64.6pg
MCHC	RU*	57.8g/dl
RDW	*	25.4fl



(x 1000)

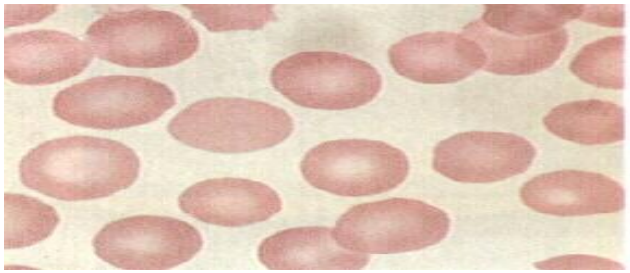
Incubation 30 min

RBC-Histogram



Results

RBC	4.35 x10^{12}/L
HGB	14.5g/dl
HCT	43.5%
MCV	100.0fl
MCH	33.3pg
MCHC	33.3g/dl
RDW	14.7fl



(x 1000)

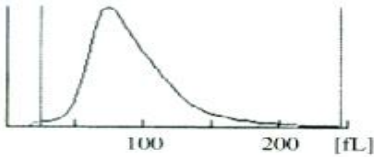
Case: Cold agglutinins

Because in this case erythrocytes have passed through the detector as clusters of several cells, the RBC, HCT,MCH, MCV, MCHC and RDW values are abnormal. The RBC histogram shows a second peak.
After the clusters have been dissolved by incubation, all erythrocytes are detected as single cells. Therefore the second peak on the RBC histogram does not appear and the RBC, HCT, MCV, MCH, MCHC and RDW values are normal.

Poikilocytosis

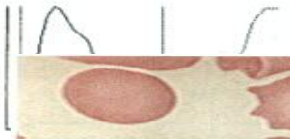
Case 1

RBC-Histogram

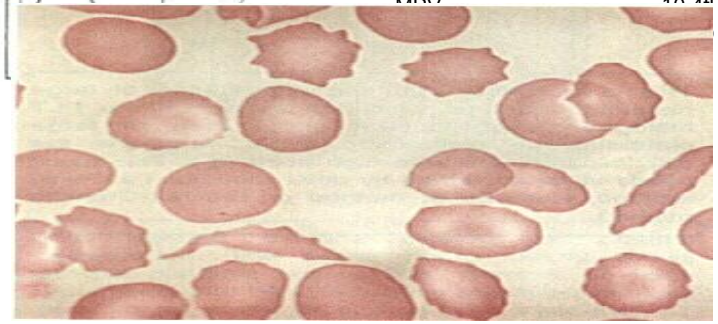


Results		
RBC		3.62 x10^{12}/L
HGB		11.1g/dl
HCT		31.9%
MCV		88.1fl
MCH		30.7pg
MCHC		34.8g/dl
RDW	+	25.5%

PLT-Histogram



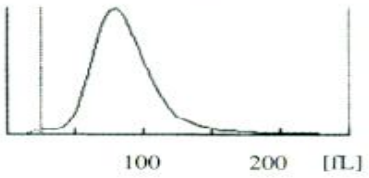
Results	
PLT	152 x10^{9}/L
PDW	16.2fl



(x 1000)

Case 2

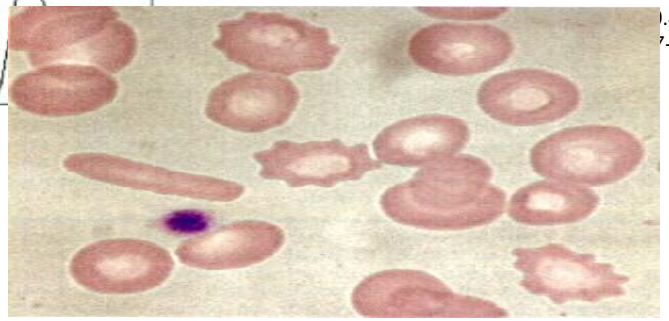
RBC-Histogram



Results		
RBC		2.67 x10^{12}/L
HGB	–	6.2g/dl
HCT	–	22.5%
MCV	–	84.3fl
MCH	–	23.2pg
MCHC	–	27.6g/dl
RDW	+	20.1%

PLT-Histogramm

Results	
PLT	235 x10^{9}/L
PDW	11.7fl



(x 1000)

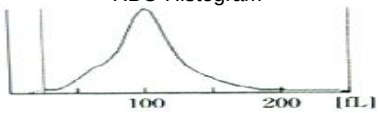
Two cases: Poikilocytosis with a lot of echinocytes

The abnormally wide distribution on the RBC histogram suggests the appearance of various sizes of erythrocytes with a high percentage of microcytes.

Anisocytosis

Case1

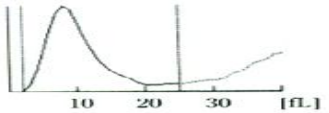
RBC-Histogram



Results

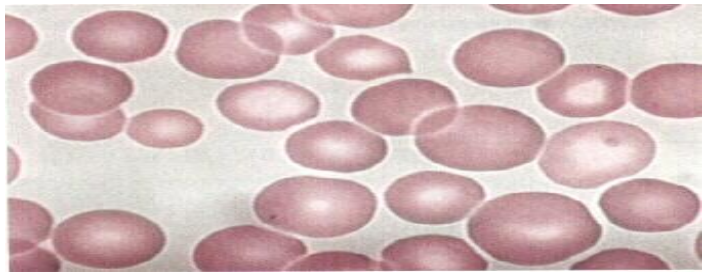
RBC	4.15 x10^{12}/L
HGB	14.0g/dl
HCT	40.8%
MCV	98.3fl
MCH	33.7pg

PLT-Histogram



Results

RDW 22.7

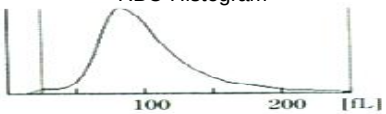


(x 1000)

Microcytes and macrocytes are visible among normocytes in the smear, and the distribution on the RBC histogram is abnormally wide. This suggest the appearance of various sizes of erythrocytes.

Case2

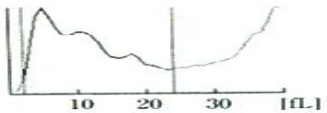
RBC-Histogram



Results

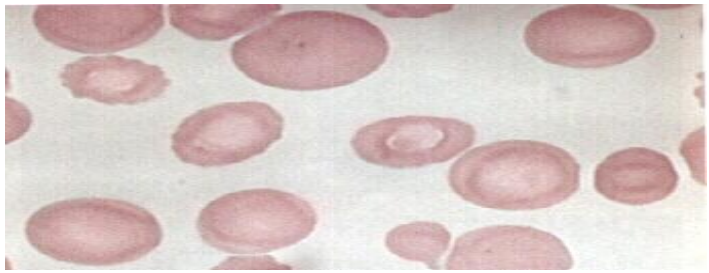
RBC	2.95 x10^{12}/L
HGB	9.9g/dl
HCT	28.7%
MCV	97.3fl
MCH	33.6pg

PLT-Histogram



Results

RDW + 26.4



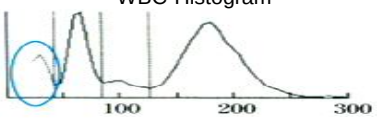
(x 1000)

The distribution width of the RBC histogram is abnormally wide as seen in case 1, but the proportion of erythrocytes below 90 fl is higher in case 2. The PLT histogram indicates abnormality and the PL and DW flags are given. This suggest that microcytes may have interferred with the Platelet count. Such result needs to be confirmed by other methods, like Fonio method or counting chamber.

Platelet Aggregation

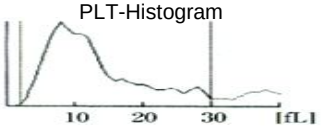
Case 1

WBC-Histogram

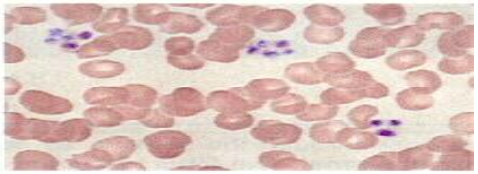


Results		
WBC		6.0 x10⁹/L
LYM%		27.5%
MXD%		7.9%
NEUT%		64.4%

PLT-Histogram



Results		
PLT		86 x10⁹/L
PDW	+	18.6fl
MPV		12.8fl
P-LCR	+	43.7%



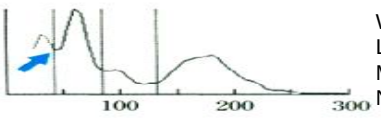
(x 400)

Case 1: Platelet Aggregation

The smear clearly shows that platelets are aggregating. The WBC histogram shows a peak in the ghost area ( ) , while the PLT histogram shows a wide distribution. Although these large particles usually affect the leucocyte counts, the leukocytes distribution of case 1 is well separated from the ghost area on the WBC histogram, probably without any effect of small particles in the ghost area. There is no WL Alarm given .

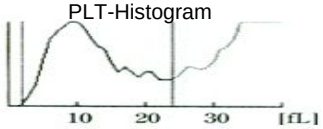
Case 2

WBC-Histogram

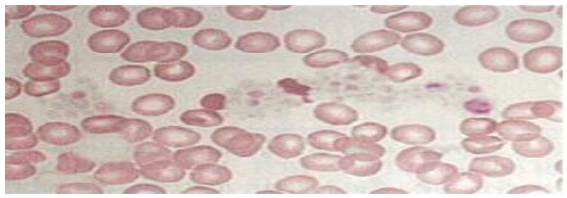


Results			
WBC	WL*		6.4 x10⁹/L
LYM%	WL*		41.4%
MXD%	WL*		14.0%
NEUT%	WL*		44.6%

PLT-Histogram



Results			
PLT	PU		55 x10⁹/L
PDW	DW		---.-fl
MPV	DW		---.-fl
P-LCR	DW		-.---%



(x 400)

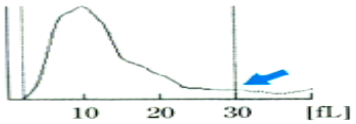
Case 2: Platelet Aggregation

This sample contains larger aggregation clusters as shown in the smear. These clusters are considered affect the leukocyte counts, because the distribution curve on the WBC histogram intersects the discriminator line between the ghost and the Small cell ratio at a high point, and the WL flags are given. The PLT histogram suggests the presence of large particles. Analysis of a fresh blood sample is required to obtain correct platelet values.

Large Platelets

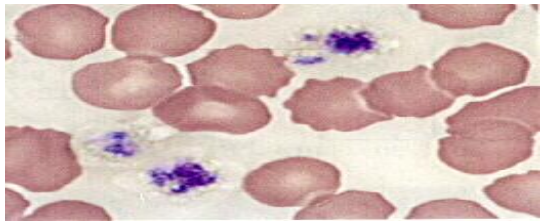
Case 1

PLT-Histogram



Results

PLT		237 x10⁹/L
PDW	+	18.0fl
MPV		12.4fl
P-LCR	+	44.1%



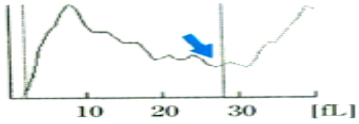
(x 1000)

Case 1: Giant platelets

The abnormally wide distribution on the PLT histogram suggests the appearance of giant platelets. The distribution curve intersects the discriminator line at a low point, which shows that the platelet count has been measured correctly.

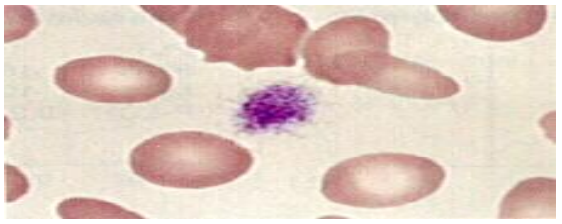
Case 2

PLT-Histogram



Results

PLT	PU	71 x10⁹/L
PDW	DW	---.-fl
MPV	DW	---.-fl
P-LCR	DW	-.---%

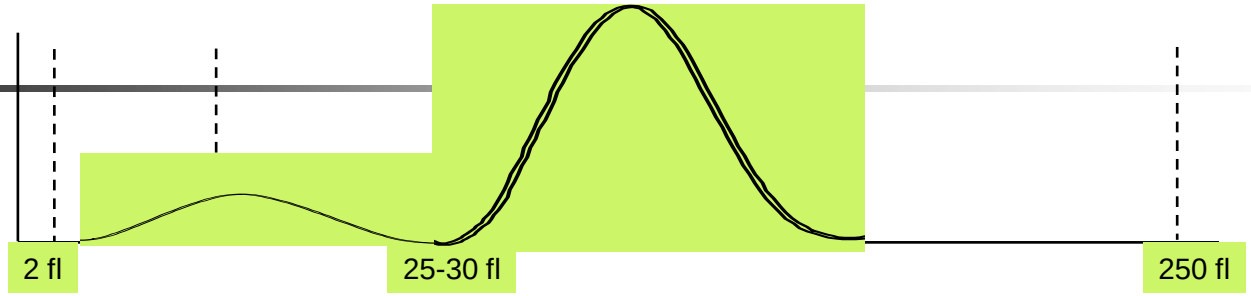


(x 1000)

Case 2: large platelets

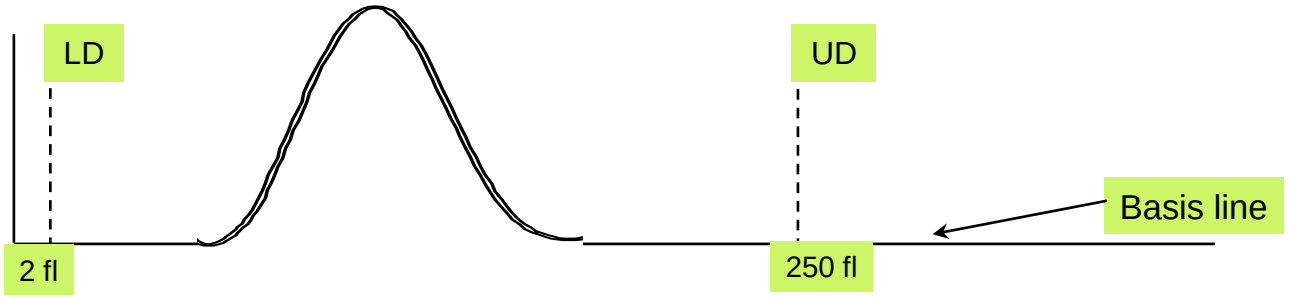
Although the wide distribution on the PLT histogram suggests the appearance of large platelets, the distribution curve intersects the discrimination line at a high point. This result needs to be confirmed by other methods i.e Fonio method or counting chamber.

RBC- and PLT-Histograms



- The two distribution curves are separated from each other by a moving auto discriminator looking to the Plateau.
- Platelets have a size between 8 and 12 fl and are counted between 2 and 30 fl.
- Erythrocytes have a size of 80-100 fl and are counted between 25 and 250 fl.

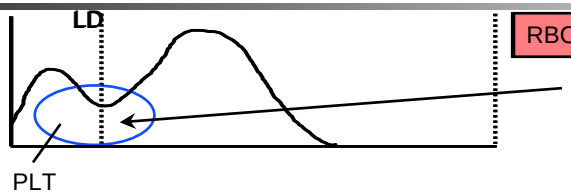
LD: Lower Diskriminator
UD: Upper Diskriminator



- The Size Distribution Curve should always start on the base line and fall between the lower and the upper discriminator.

Erythrocyte-Histogram Flagging

Mark " RL ", abnormal height at lower discriminator



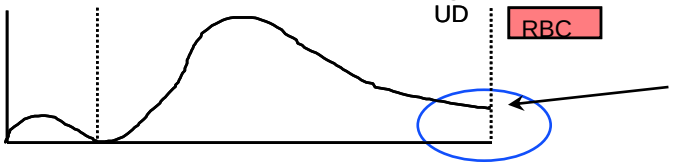
The curve does not start at the base line.

Possible causes:

- Giant Platelets
- Micro-Erythrocytes
- Platelet Clumps

Caution:
All results marked with " RL " should be controlled.

Mark " RU ", abnormal height at the upper discriminator.



The curve does not start at the base line.

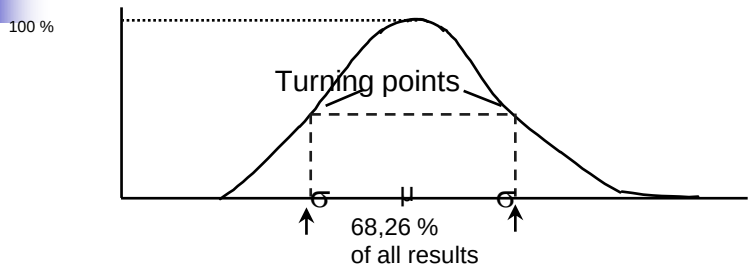
Possible causes:

- Cold Agglutinins (check MCHC > 40 g/dl)
- Erythroblasts / Normoblasts

Caution :
RBC-result and all results marked with " RL " should be controlled.

Erythrocyte-Histogram Distribution width

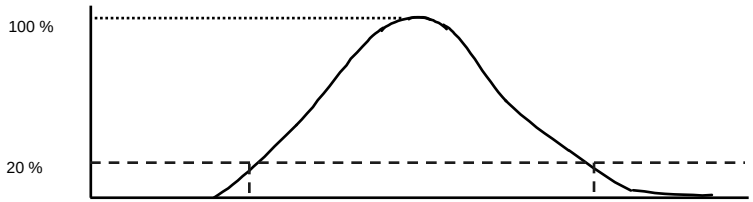
RDW-CV



RDW-CV (%) = 100 x σ/μ

RDW-CV
11 - 16 %

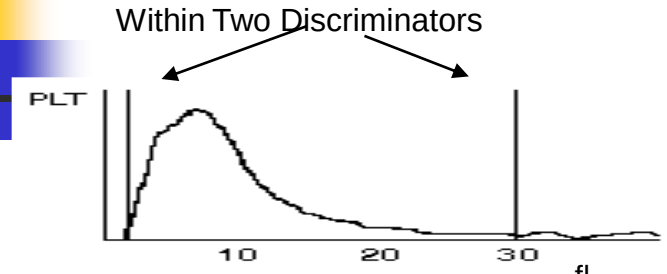
RDW-SD



RDW-SD
37 - 46 fl
Clinical relevant > 60 fl

RBC Distribution Curve as a parameter for anisocytosis

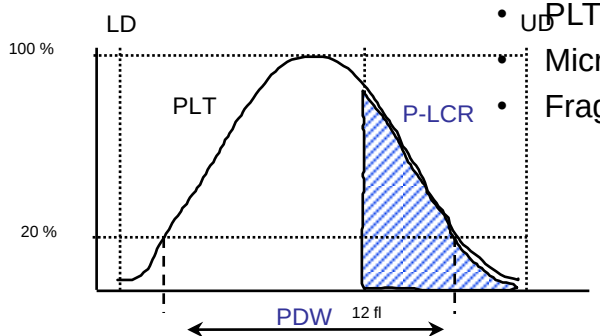
Thrombocyte-Histogram



- The histogram should lay within the two discriminators and start and end on the base line.
- PLT counted between 2 fl and 30 fl.
  1 flexible Diskriminator PL 2 to 6 fl.
  1 flexible Diskriminator PU 12-30 fl.
  1 fixed Diskriminator at 12 fl

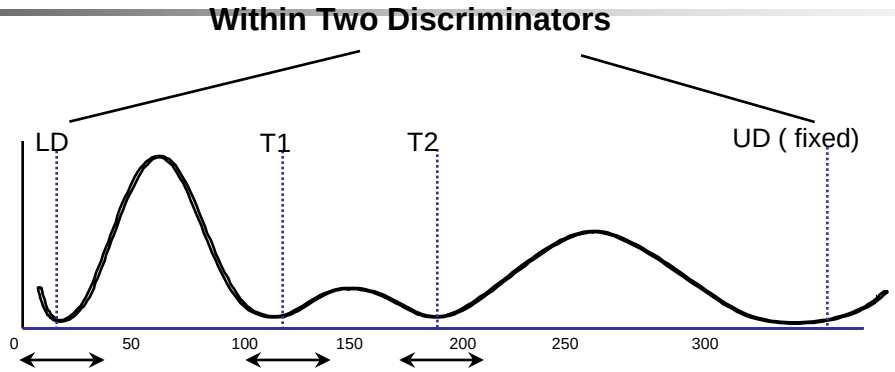
Parameter of the Thrombocyte histogram

- MPV, mean PLT volume
  reference range: 8 - 12 fl
- P-LCR, ratio of large platelets
  Reference range 15 - 35 %
- Increase could be a sign for:
  - PLT Clumps
  - Giant PLT
  - Microerythrocytes
- PDW, platelet distribution width at 20 % of peak height
  Reference range: 9 - 14 fl
  Increase could be a sign for:
  - PLT Clumps
  - Microerythrocytes
  - Fragments



$$MPV\ (fl) = \frac{Pct\ (\%)}{PLT\ (x\ 10^3/\mu l)}$$

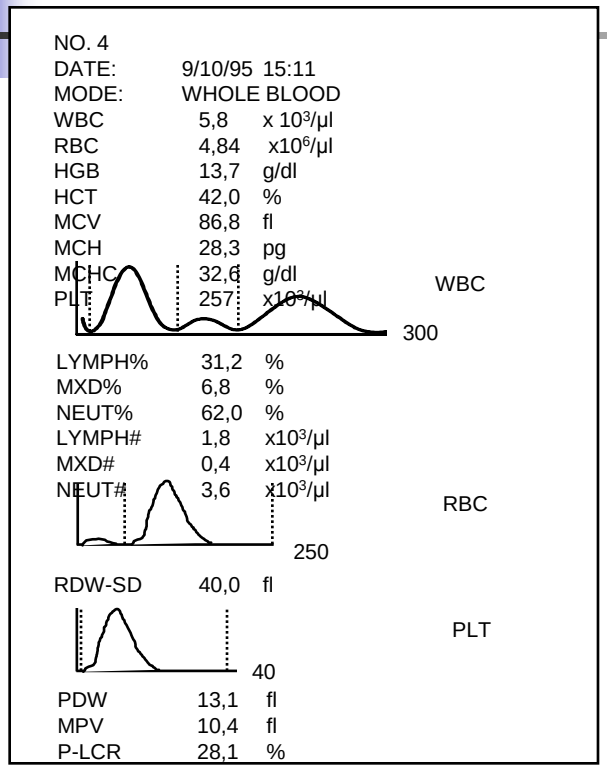
Leukocyte-Histogram



Important :

- **The distribution curve should be within the discriminators. The curve should start and end at the basis line.**
- **The LD is flexible, but can not be lower than 30 fl.**
- **The WBC-channel shows Leukocytes and Thrombocytes (Erythrocytes are lysed).**
- **The volume of the Thrombocyts is usually between 8 - 12 fl, therefore the LD at the WBC-Histogramm seperates the Leukocytes from the Thrombocytes. (Thrombocytes were not counted).**

Summery of all flags



The following cases are analysed with the SYSMEX KX-21. Differences of the Histogram-Version are instrument specific and have no analytical influence.

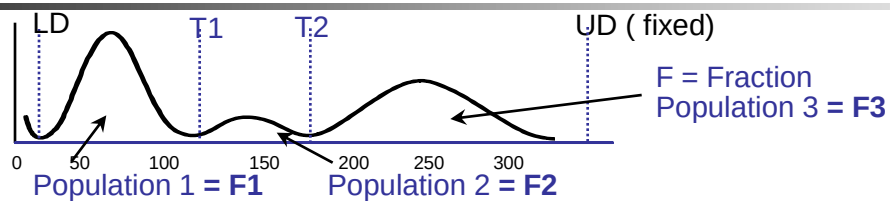
WL: Abnormal height at lower discriminator of WBC Histogram (LD)
WU: Abnormal height at upper discriminator of WBC Histogram (UD)
T1: Valley 1 not found
T2: Valley 2 not found
F1, F2, F3: Abnormal height at the points T1 or T2; adjacent fractions are marked

RL: Abnormal height at lower discriminator of RBC Histogram (LD)
RU: Abnormal height at upper discriminator of RBC Histogram (UD)
MP: Multiple peaks: Distinguish ?? of two RBC Populations
DW:The distribution (RDW) can not be detected because the Histogram does not cross the 20 % limit twice.
PL: Abnormal height at lower discriminator of PLT Histogram (LD)
PU: Abnormal height at upper discriminator of PLT Histogram (UD)
MP: Multiple Peaks found
DW:The distribution (PDW) can not be detected because the Histogram does not cross the 20 % limit twice.

3. Flag “T1” and “T2”

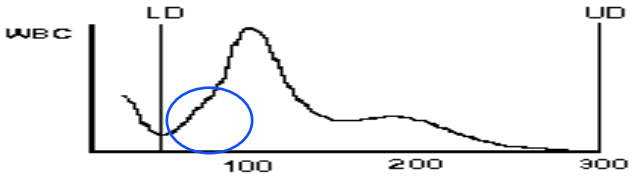
Leukocyte-Histogram Flagging

T1 and T2 are valley discriminators defined by the plateau.
This discriminators separates the Leukocytes populations.

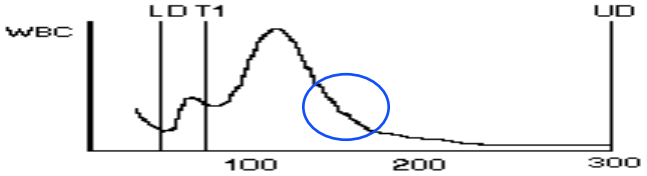


- **The discriminators are flexible and will be set automatically according to the sample.**
- **In special cases is a separation from the valley discriminators not possible.**

T1: T1 could not be detected No plateau was found.
>**T 1** flag



T2: T1 was detected but not T2
>**T2** flag



Attention:
- Confirm the result with the microscope if T1 or T 2 flag was indicated.
- The WBC result will be correct if no flag is indicated. All Leukocytes are counted.

بخش پنجم :
منابع خطا در شمارنده های سلولی اتوماتیک در هماتولوژی

تهیه و تنظیم: دکتر مهرداد ونکی

RBC automation count
افزایش کاذب شمارش گلبول های سفید

- ۱-حضور NRBCفراوان در نمونه
- ۲- پلاکت غول اسا به تعداد فراوان
- ۳- انگل مالاریا
- ۴- کرایوگلوبولینمی و کرایوفیبرینوژنمی
- ۵- طحال برداری
- ۶- تجمع پلاکتی فراوان
- ۷- پدیده Carry over: دادن یک نمونه با کانت بسیار بالا (بالای ۵۰ هزار) در سل کانتر منجر به افزایش کاذب در کانت سفید نمونه های بعدی می گردد (گاها لکوپنی نمونه بعدی را نرمال جلوه می دهد) پیشگیری: شستشوی مکرر سل کانتر پس از دادن نمونه با شمارش بالای سفید
- ۸- در سل کانتر های امپدانسی اریتروسیت های لیز نشده با محلول لیز دستگاه منجربه شمارش کاذب سفید می گردند خصوصا در هموگلوبینوپاتی ها

RBC automation count
کاهش کاذب شمارش گلبول های سفید

- ۱-لیز سلول سفید ناشی ازنمونه خون کهنه(بیش از سه روز مانده / زمان مجاز نگاه داری نمونه خون ۲۴ ساعت در یخچال می باشد) یا شکنندگی سلول سفید در برخی لوسمی ها (اسماچ سل در لوسمی لنفوئید مزمن)
- ۲-اورمی و لیز لکوسیت ها
- ۳- تجمع لکوسیت ها به علت لکو آگلوتینین سرد یا گرم یا اثر ضدانعقاد

RBC automation count
افزایش کاذب شمارش گلبول های قرمز

- ۱- حضور پلاکت های غول آسا به تعداد فراوان
- ۲- هیپرلکوسیتوز (بالای ۵۰۰۰۰) علاوه بر شمارش کاذب در اریتروسیت ها منجر به افزایش هموگلوبین و هماتوکریت ومیانگین حجم گلبولی (MCV) می گردد(در هنگام شمارش گلبول قرمز خون تنها با محلول ایزوتون رقیق می گردد و لکوسیت ها نیز در هنگام شمارش کنار گلبول قرمز حضور دارند)
- ۳- هیپر لیپیدمی
- ۴- کرایوگلوبولین و کرایوفیبرینوژن(به صورت ذرات درشت شبه گلبول قرمز)

RBC automation count
کاهش کاذب شمارش گلبول های قرمز

- ۱-میکروسیتوز شدید(MCV<50):پیرو پوئکیلوسیتوزیس
- ۲-تجمع اریتروسیت ها ناشی از آگلوتینین سرد یا گرم یا EDTA
- دراین حالت توده های به هم چسبیده اریتروسیت ها یک پالس الکتریکی حاصل می کند و به عنوان یک سلول شمارش می گردد در این حالت هماتوکریت و شمارش اریتروسیت کاهش یافته و اندکس های گلبول قرمز افزایش کاذب می یابد
- ۳-همولیزشدید نمونه خون با کاهش هماتوکریت و شمارش اریتروسیت همراه است و تنها شمارش سفید و هموگلوبین قابل اعتماد است.

Plat count

نکات مهم در گزارش دهی پلاکت در صورت عدم دسترسی به بیمار جهت دریافت نمونه مجدد

- گزارش در صورت وجود تجمع پلاکتی (تایید شده از روی لام و با عدسی ۱۰) :
- Plat count is falsely low due to aggregation
- Or plat count isnot reliable (falsely low) due to aggregation
- / please repeated on new sample
- جهت گزارش تخمینی پلاکت از روی لام ثبت جمله زیر ضروری است:
- Estimated plat count by PBS is about …
- نحوه تخمین شمارش پلاکت : میانگین ۵ تا ۱۰ فیلد روغنی در ۱۵۰۰۰ در نمونه وریدی یا میانگین ۵ تا ۱۰ فیلد روغنی در ۲۰۰۰۰ در نمونه مویرگی
- در زمان بالا بودن شیستوسیت و میکروسیت و ترومبوسیتوزیس کاذب حاصل از آن که توسط سل کانتر گزارش می گردد بایستی به شکل زیر گزارش مکتوب
- نماییم :
- Plat count is falsely higher than true value due to interferance by microcytic RBCs or schistocytes
- Giant plat در حالت نرمال کمتر از ۵% پلاکت ها غول آسا می باشند / ماندن طولانی خون روی ضد انعقاد پس از سه ساعت منجر به تولید پلاکت غول آسا کاذب می گردد / در صورت نیاز به بررسی پلاکت غول آسا گسترش در طول ۶۰-۱۰ دقیقه تهیه شود

Plat count
افزایش کاذب شمارش پلاکت در سل کانتر

- ۱- فراگمانت و شیستوسیت فراوان در نمونه خون
- ۲ – میکرو اسفروسیت فراوان
- ۳-حضور کرایوگلوبولین و کرایو فیبرینوژن
- ۴- حضور قطعات سیتوپلاسمی لکوسیت ها(پس از شیمی درمانی / لوسمی موئی شکل / لوسمی میلوئید حاد /النفوم و عفونت شدید) گاها حضور قطعات لکوسیتی ترومبوسیتوپنی واقعی بیمار لوسمی حاد را ماسکه نموده و نیاز واقعی بیمار به پلاکت تامین نشده و بیمار را دچارعارضه خونروی شدید می نماید لذا تخمین پلاکت در کنار شمارش اتومیشن پلاکت در بیماران لوسمی حاد پیشنهاد می گردد.
- ۵-شمارش ذرات ارتیفکت به جای پلاکت(ذرات شناور ایزوتون / اجسام هاول جولی / اجسام پاپن هایمر و هینز / مخمر های واقعی در خون بیماران شیمی درمانی

Plat count
کاهش کاذب شمارش پلاکت در سل کانتر

- ۱- حضور لخته ریز (میکرو پلاکت) در نمونه خون
- ۲ - تجمع پلاکت(خونگیری مشکل / آنتی بادی ضدپلاکت)
- ۳- اقماری شدن پلاکت
- ۴- اثر ضدانعقاد هپارین
- ۵- تعداد بالای پلاکت غول آسا(برنارد سولیر / می هگلین / هیپر اسپلنیزم)
- نکته : موارد ترومبوسیتوپنی کاذب در سل کانتر بسیار شایعتر از ترومبوسیتوزیس کاذب می باشد و بیشتر در بیماران بستری دیده می شود تا سرپائی .

بخش ششم :

مروری بر اطلس سیتومرفولوژی هماتولوژی

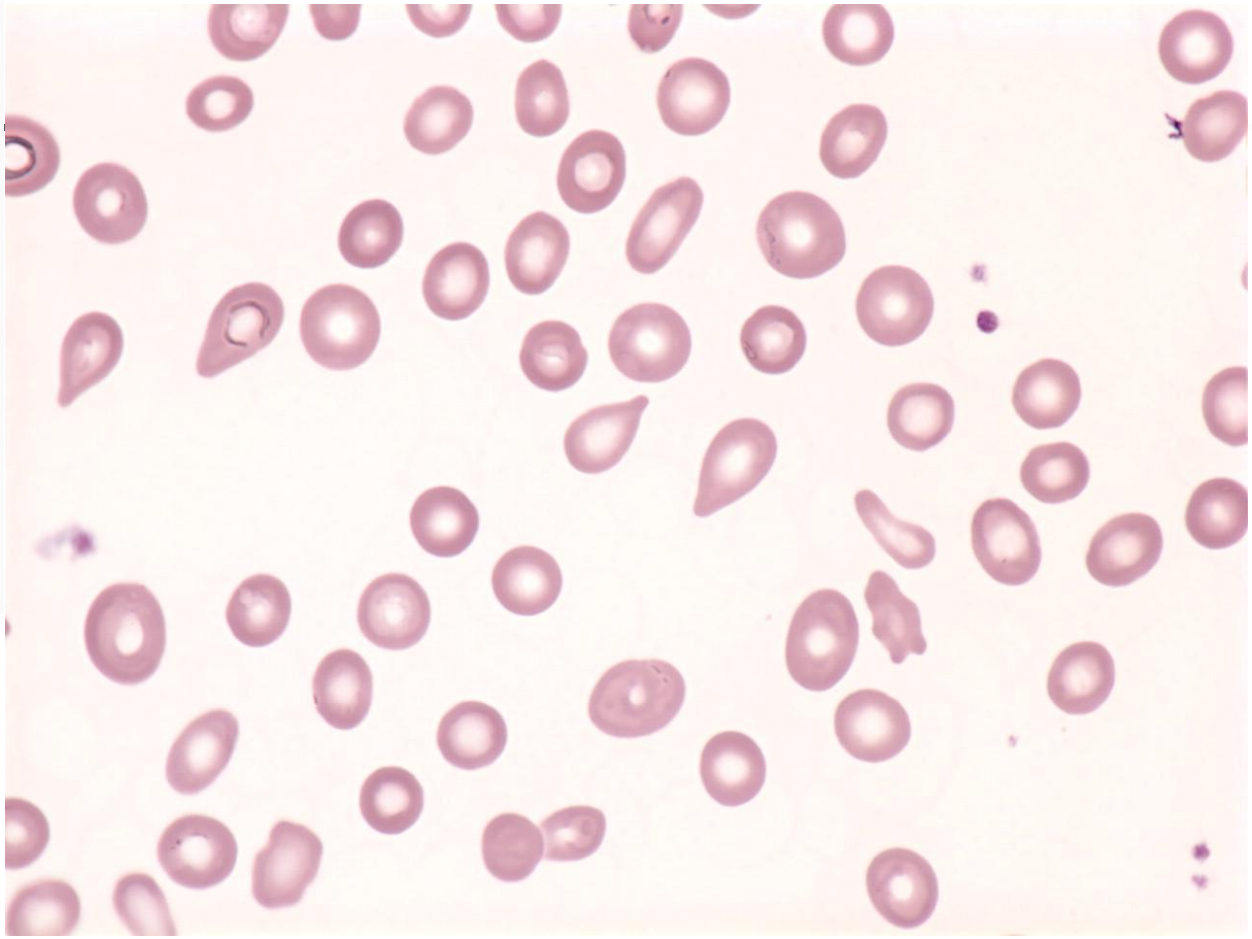
تهیه و تنظیم: دکتر مهرداد ونکی

Reference:

Atlas of PRACT1CAL HAEMATOLOGY

Dacie and Lewis TENTH ED1T10N 2006

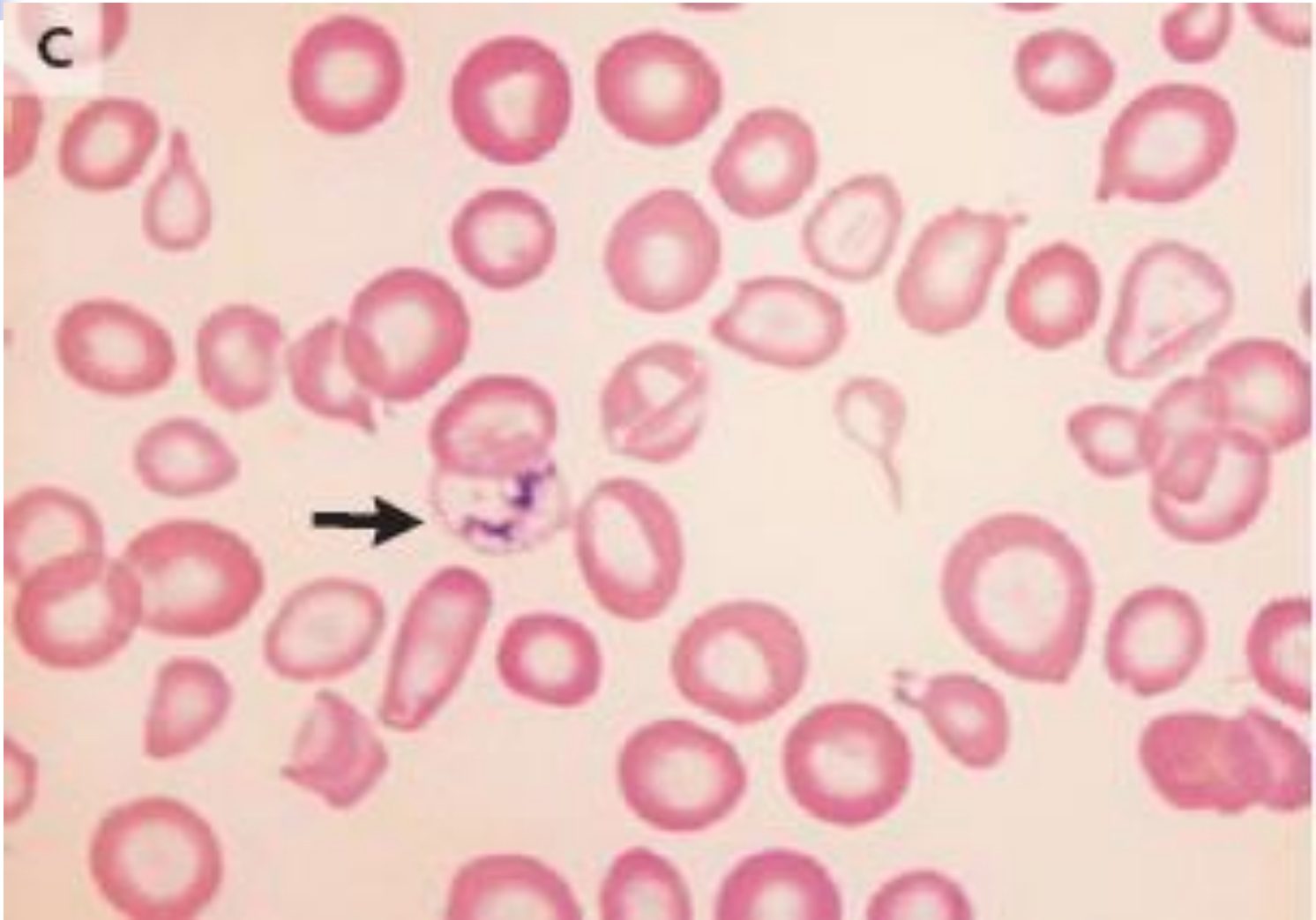
Figure 1. Dacryocytes (tear drop poikilocytes) are seen in the peripheral blood of a patient with idiopathic myelofibrosis



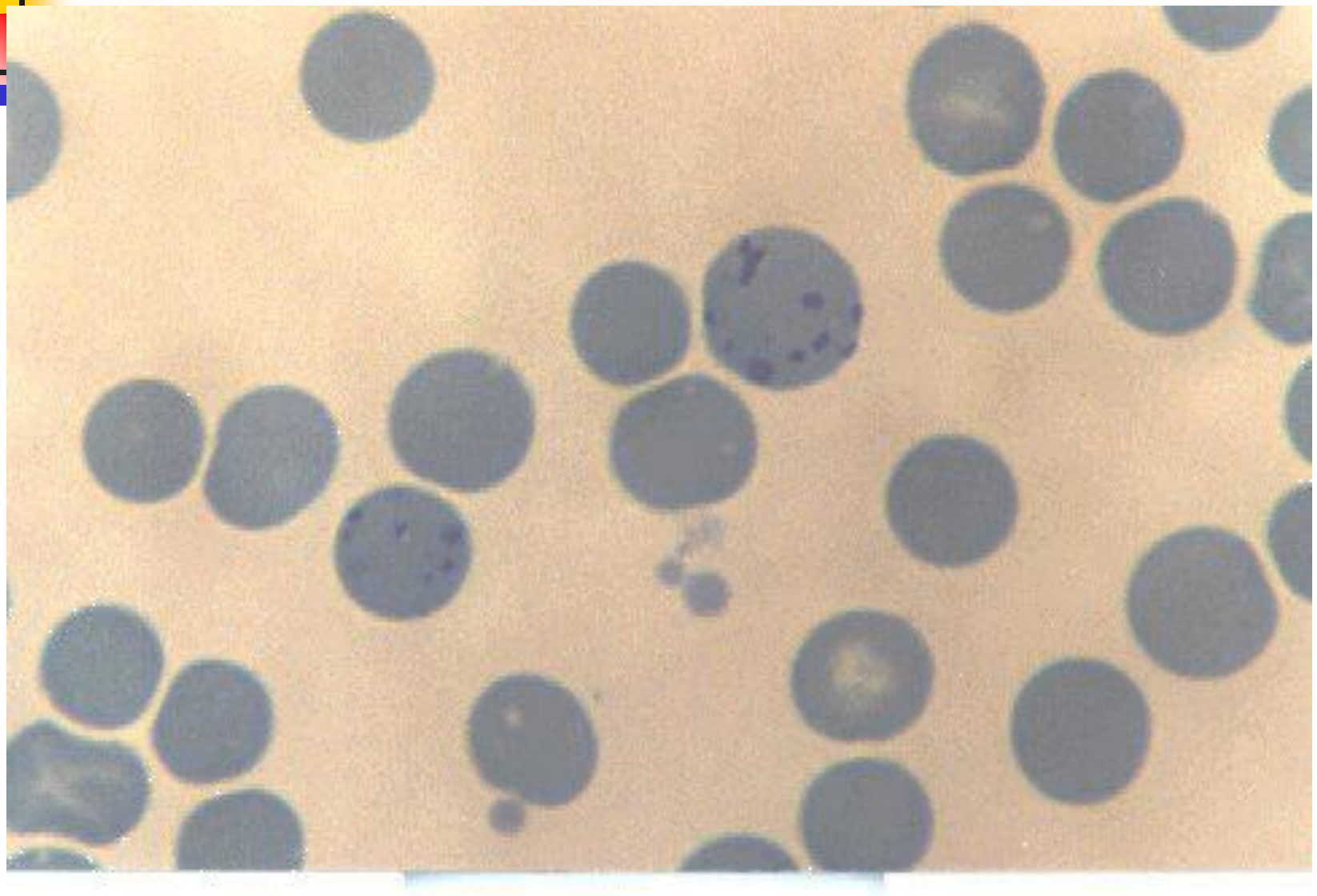
Maslak, P. ASH Image Bank 2002;2002:100453

Copyright ©2002 American Society of Hematology. Copyright restrictions may apply.

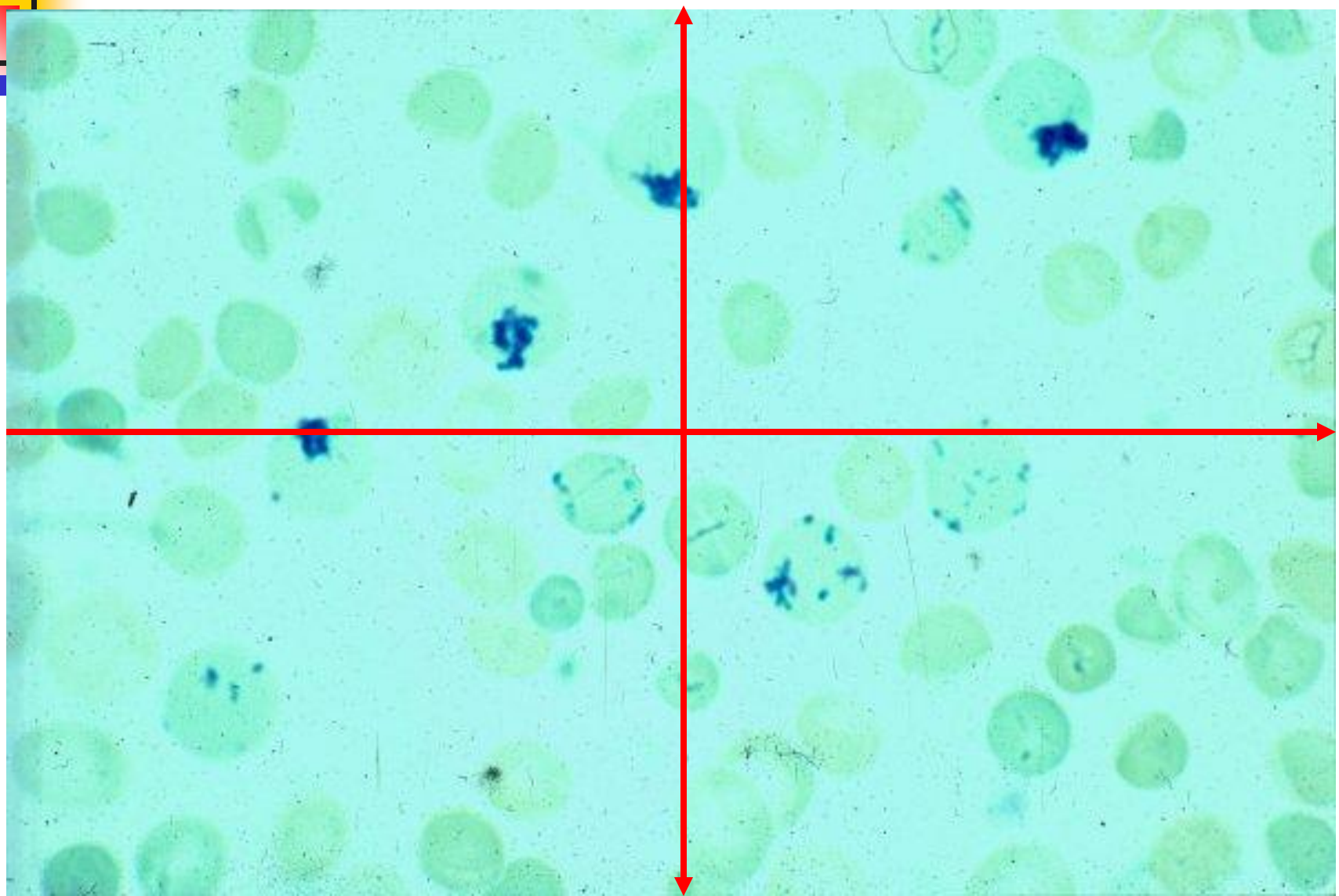
shows ***MDS*** with anisocytosis, poikilocytosis, macrocytes, stomatocytes, and an erythrocyte with prominent Pappenheimer bodies (arrow); the smear is also ***dimorphic***, showing both well-hemoglobinized macrocytes and hypochromic microcytes.



Reticulocyte



Reticulocyte



Specimen storage

At room temperature, reticulocyte counting should be done within ***six hours*** after blood collection.

Apparent **in vitro maturation** and subsequent disappearance of some of the reticulocytes.

Maturation is both **time** and **temperature** dependent

This loss can be **up to 20%** per 24 hours at room temperature

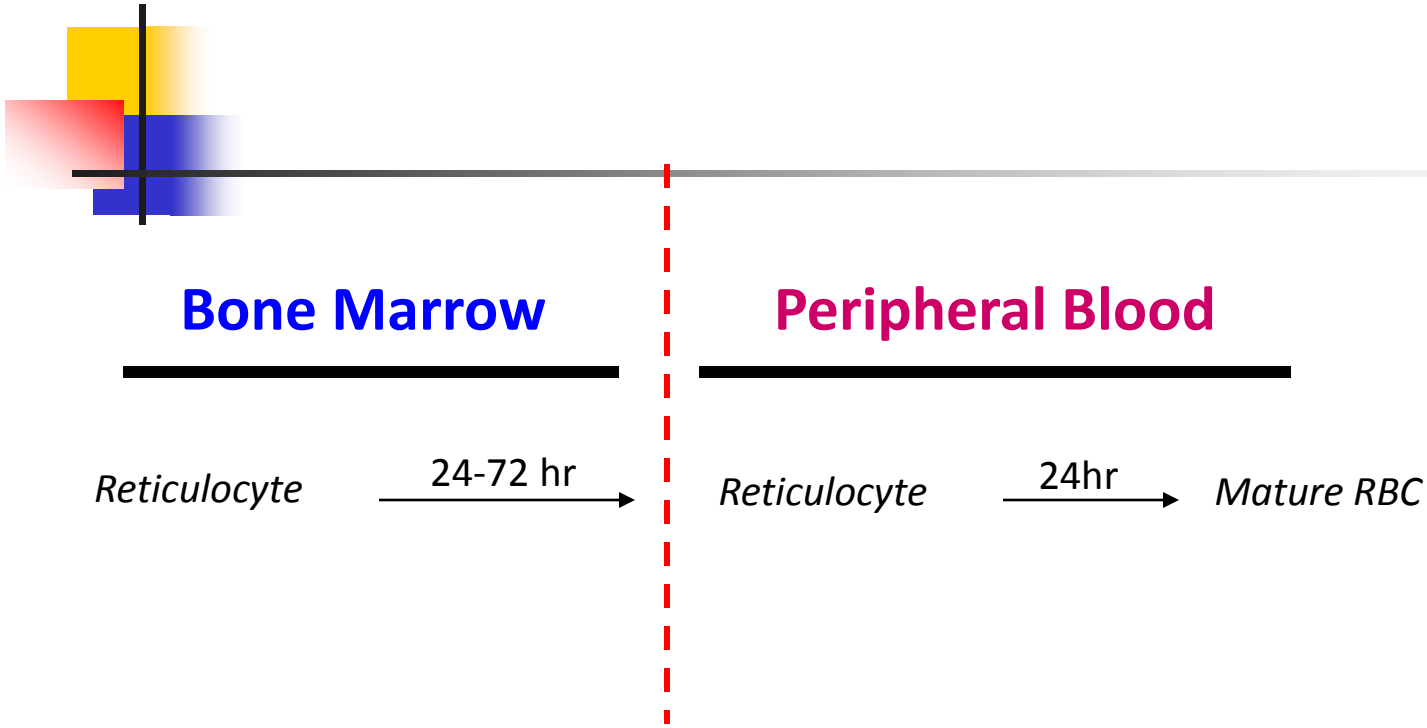
Specimens stored at 2 to 6 °C may be stable for *up to 72 hours*

Retic. count

- The film is examined with an oil immersion lens moving from field to field in a *battlement pattern*.
- **Normally ,500 erythrocytes will be counted on each of two slides.**
- If the number of reticulocytes on these two slides do not agree within **20%,**a third slide of 500 rbc must be counted.

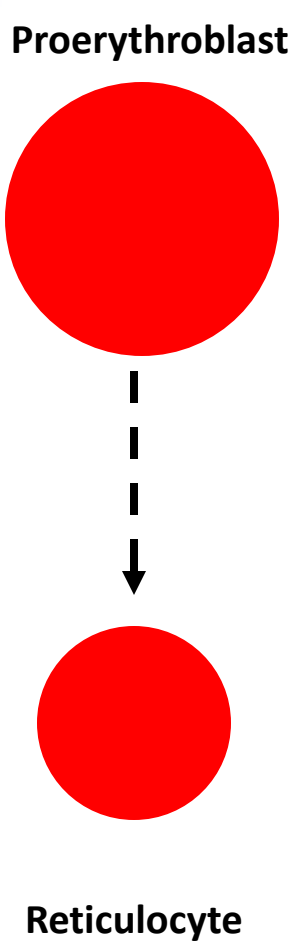
Retic. Count

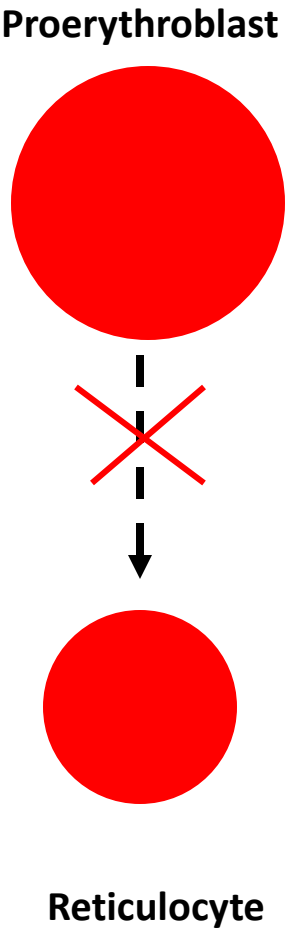
- **If no retics are seen in 500 cells,** both slides should be scanned for retics.
- **If a retic is found on scan report retic count as <0.1%.**
- **If no retics are seen, set it up again, and if no retics. are seen on the new slides then report as *no retics seen on smear.***



So Retic. count is a simple, low cost & reliable test for evaluation of effective erythropoiesis.

Effective vs. Ineffective Erythropoiesis





Hematocrit	Maturation Time (day)
45%	1
35%	1.5
25%	2.0
15%	2.5

Reticulocyte Production Index

$$\textbf{RPI} = \text{Relative Retic. Count} \times \frac{\text{Hct of Patient}}{\text{Hct of Normal}} \times \frac{1}{\text{Maturation Time}}$$

Normal Hct for Male : 45% Female : 42%

Reticulocyte Counts

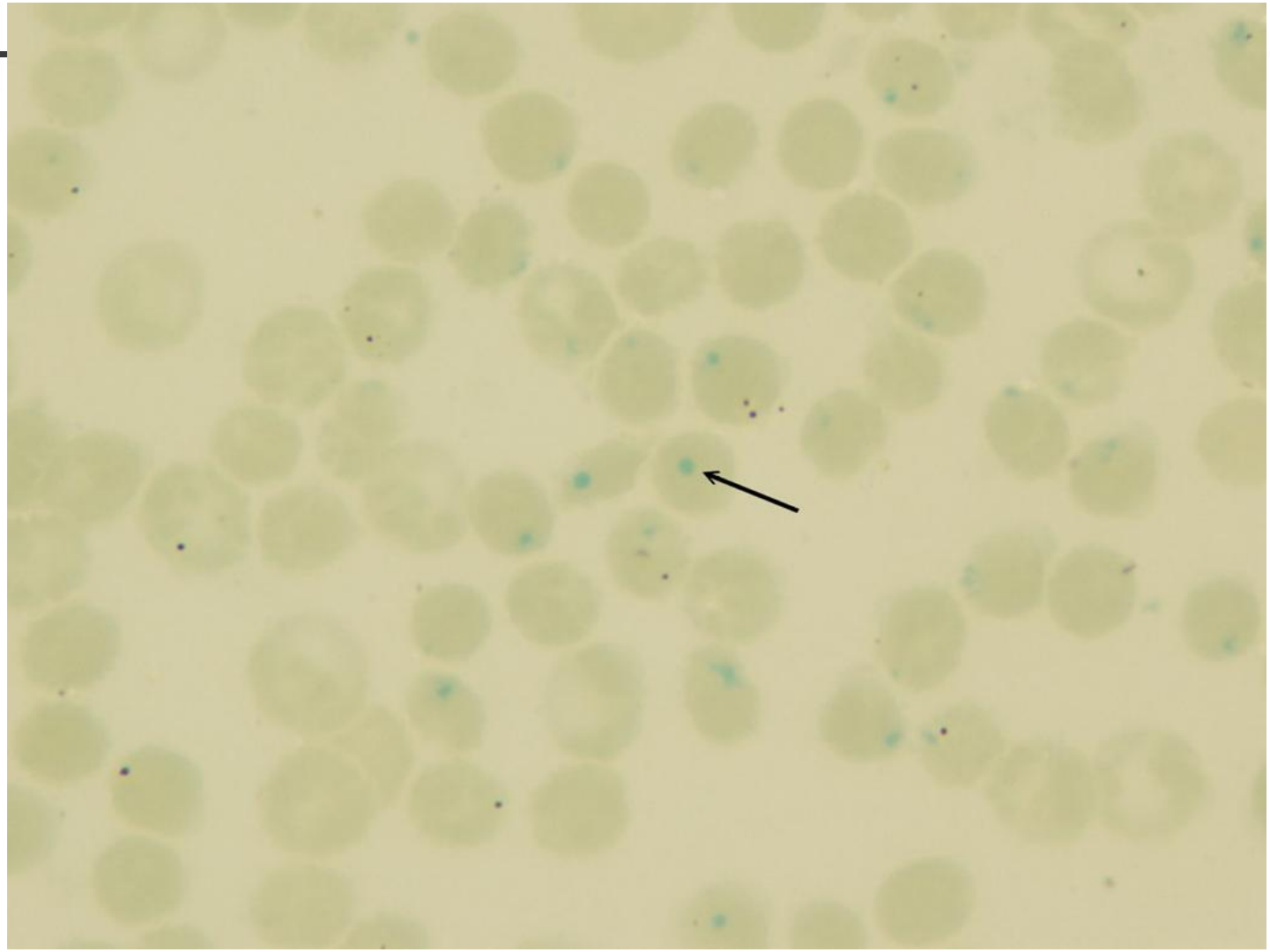
Rule of thumb***: uncorrected reticulocyte count > 5% suspect hemolysis; > 10% hemolysis very likely***

Differential diagnosis:

blood loss and recent treatment of a megaloblastic anemia

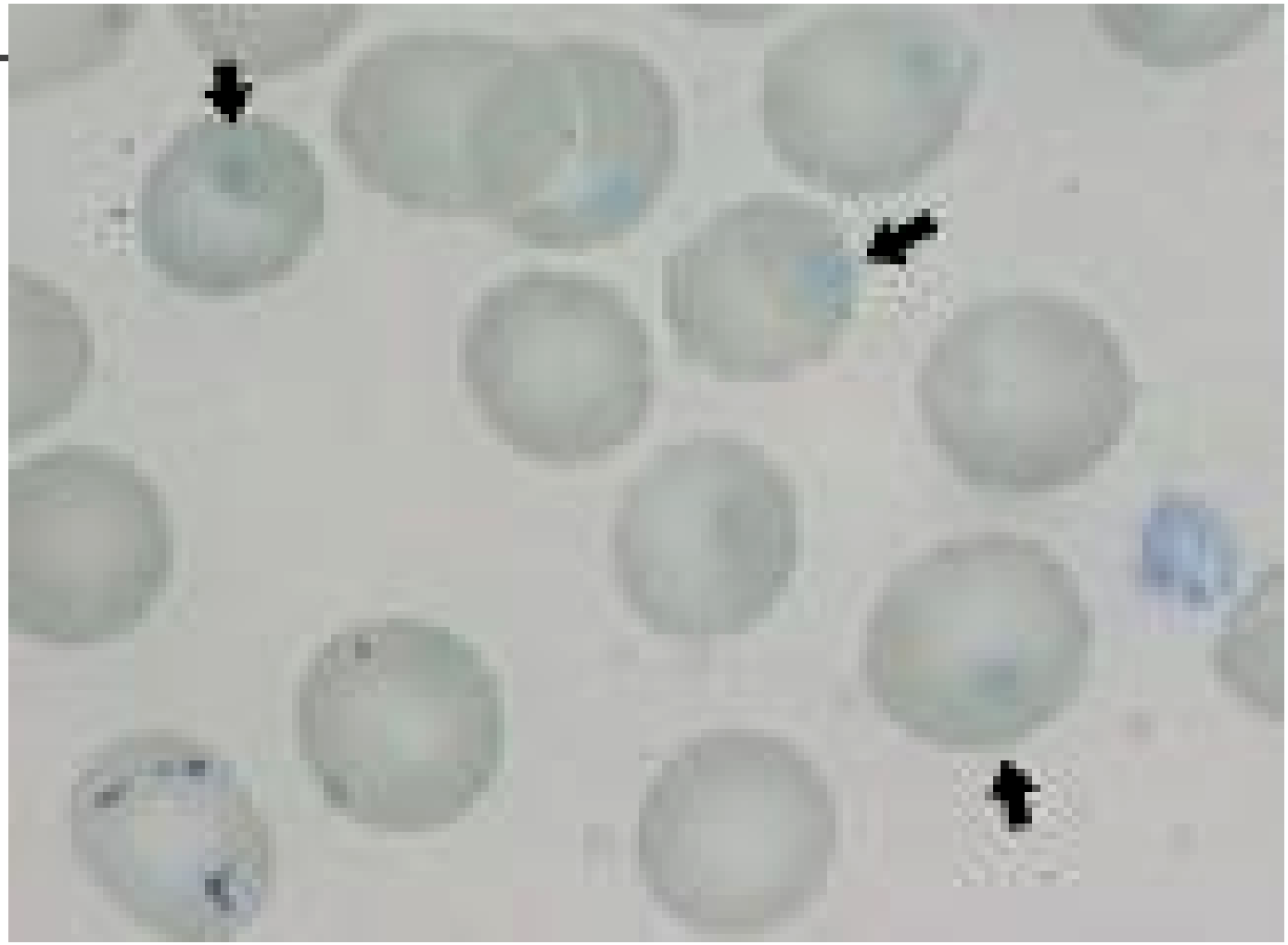
Heinz Body

Peripheral blood smear, BCB stain, 1000x

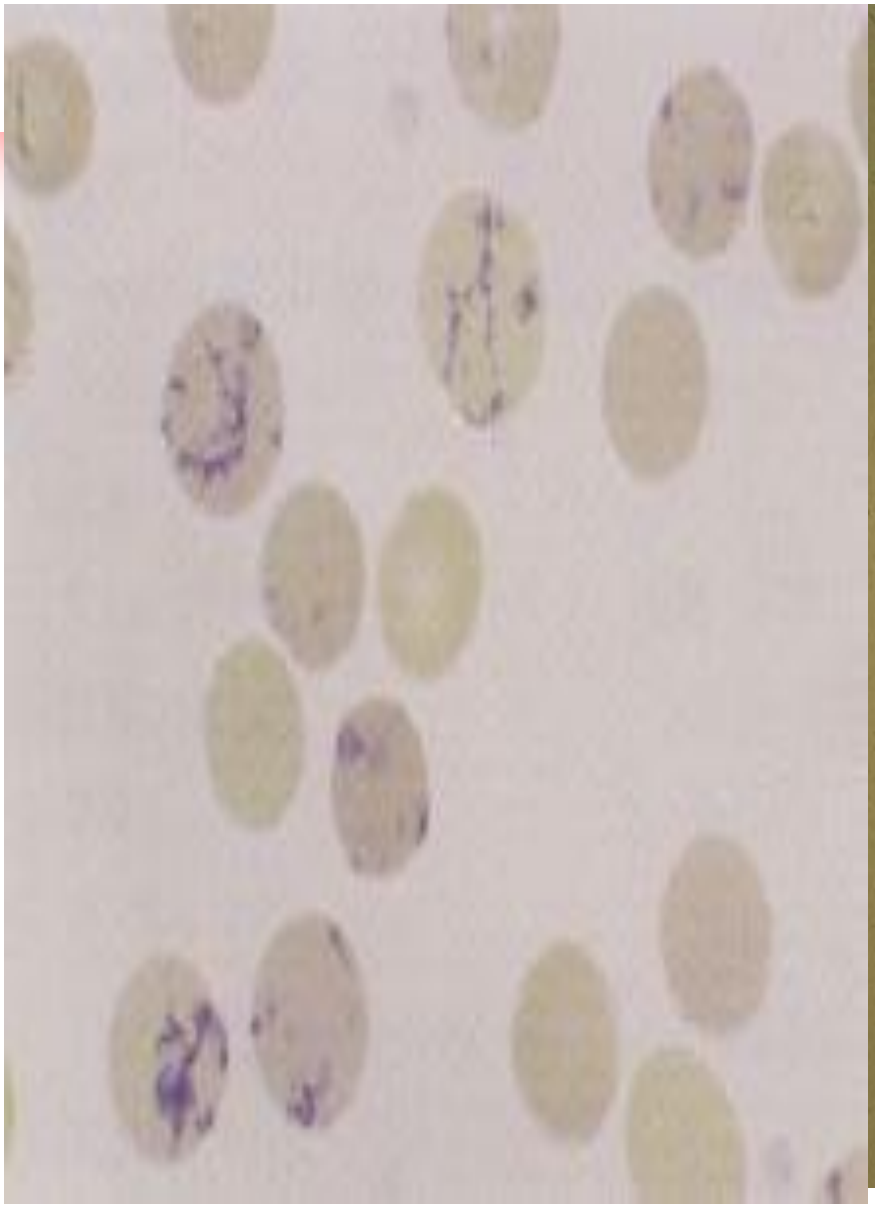


Heinz Body

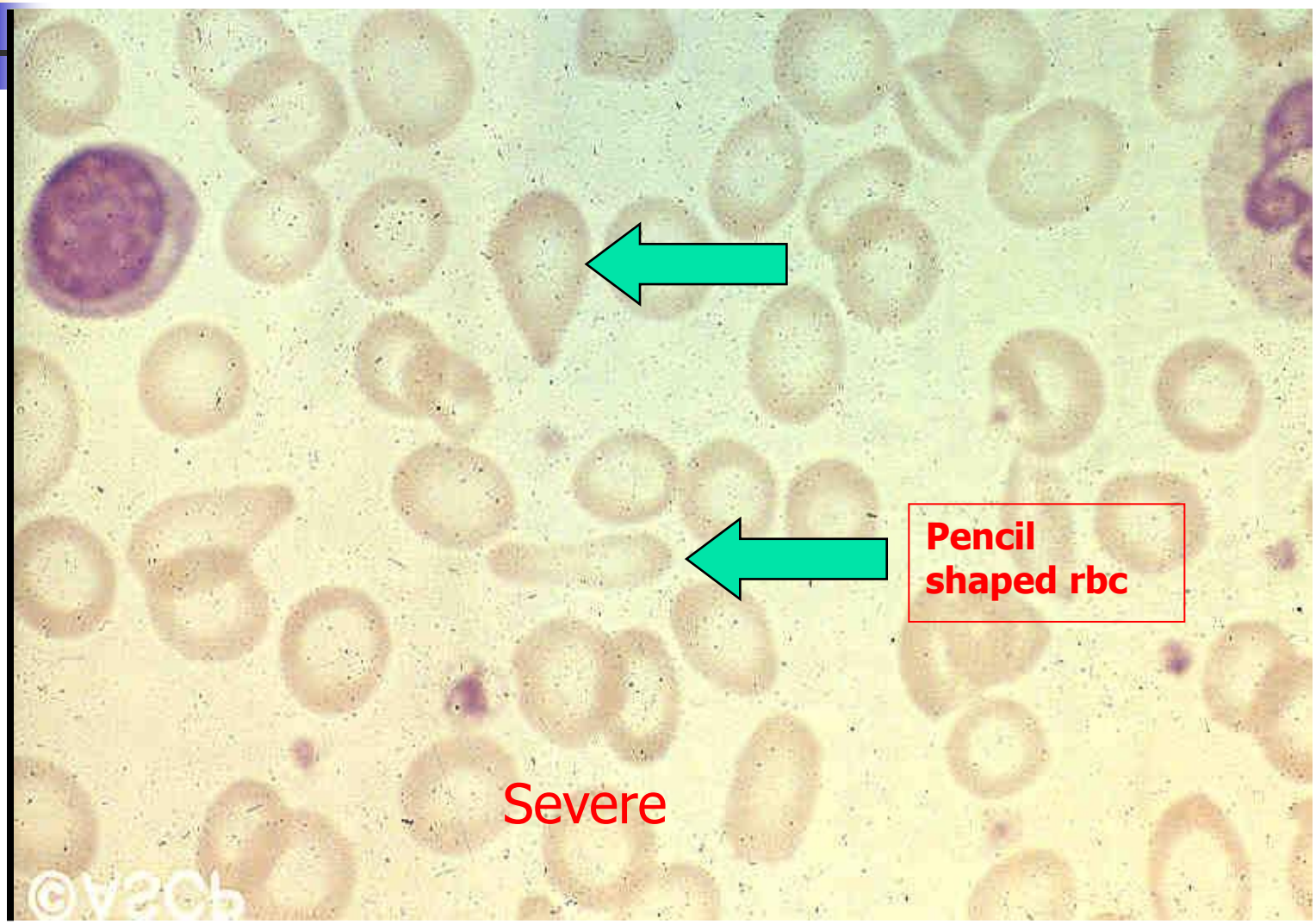
Peripheral blood smear,1000x



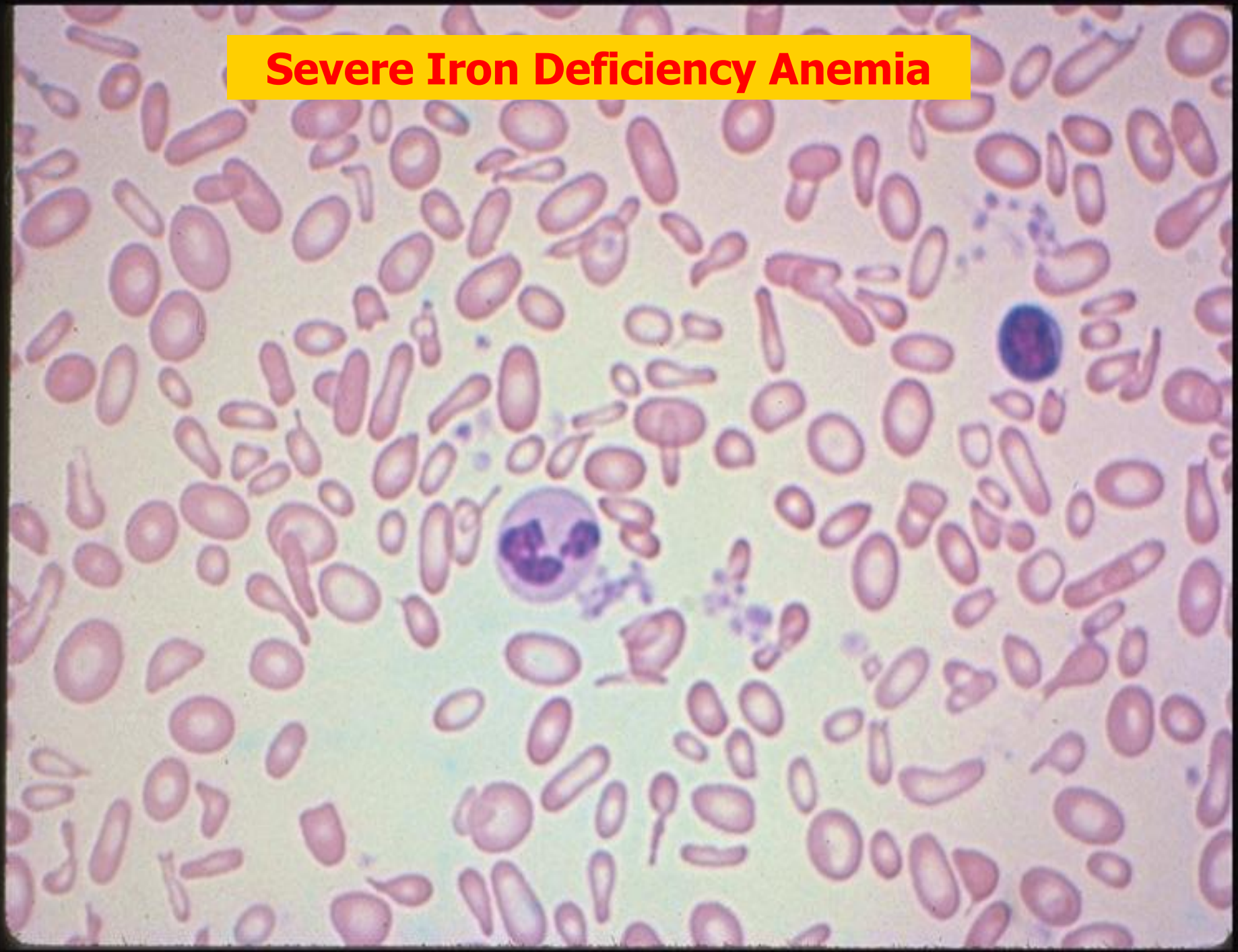
Reticulocytosis- Heinz bodies



Iron Deficiency Morphology



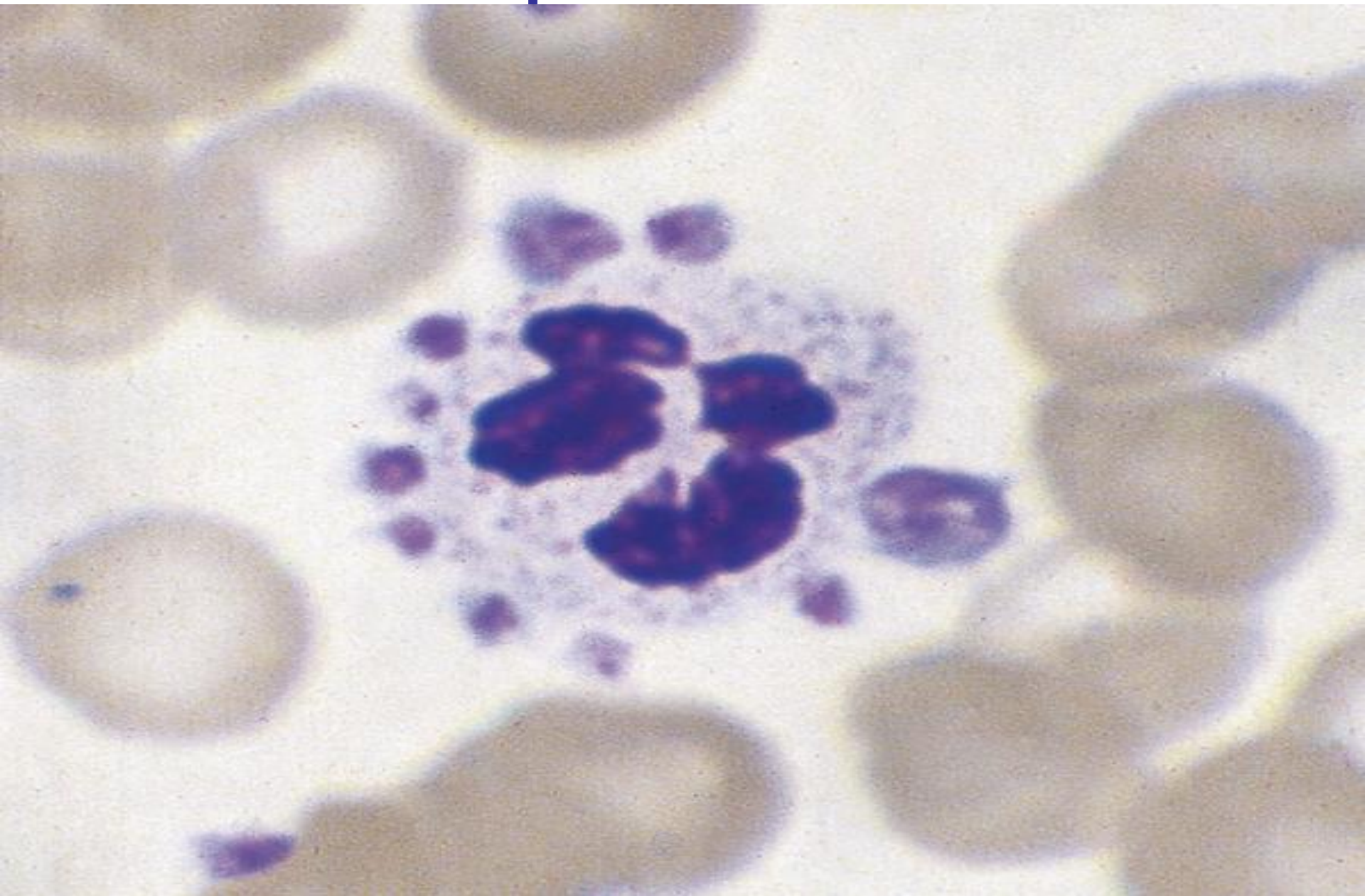
Severe Iron Deficiency Anemia



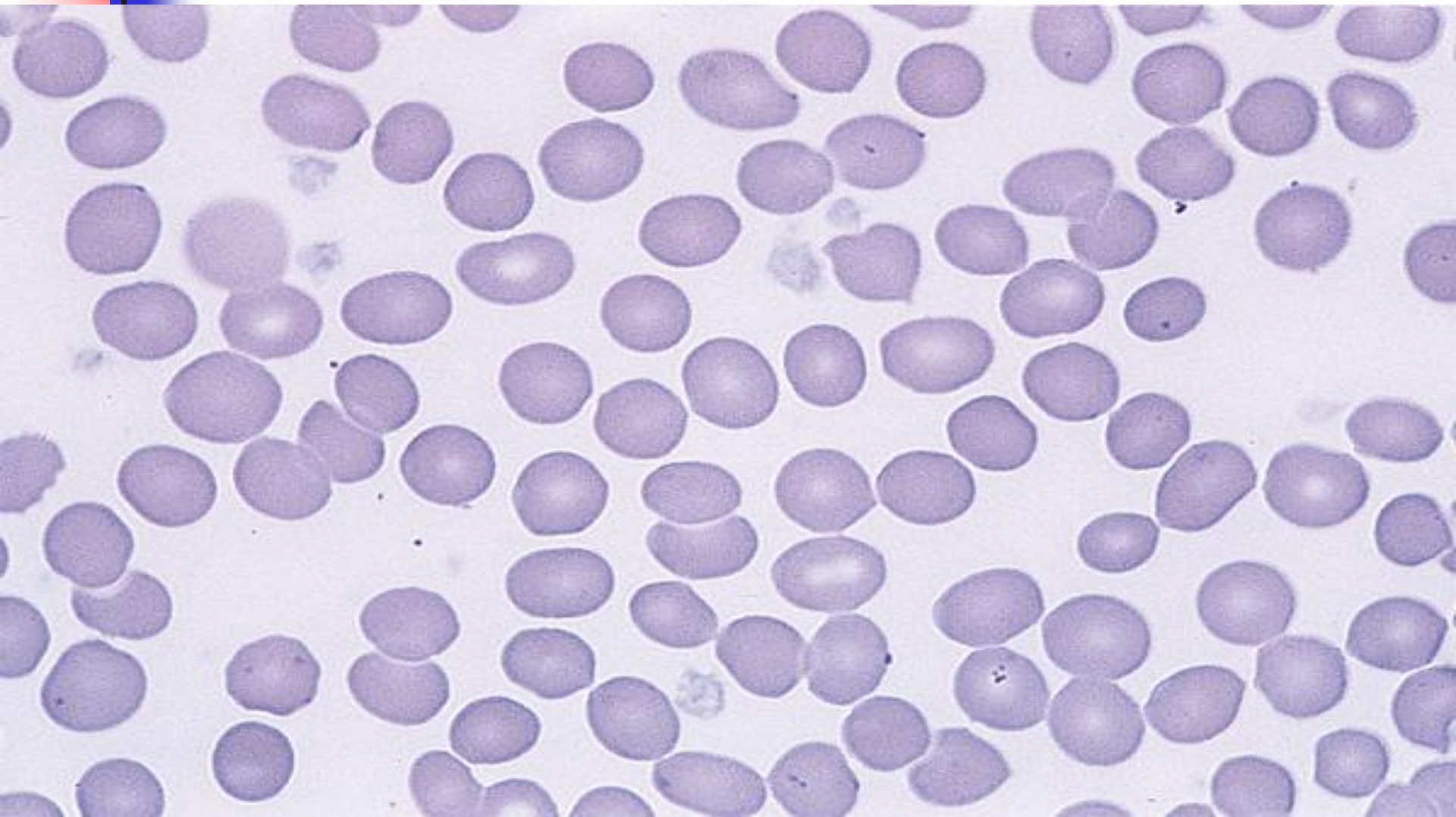
giant platelet

Shows adhesion of platelets to a neutrophil

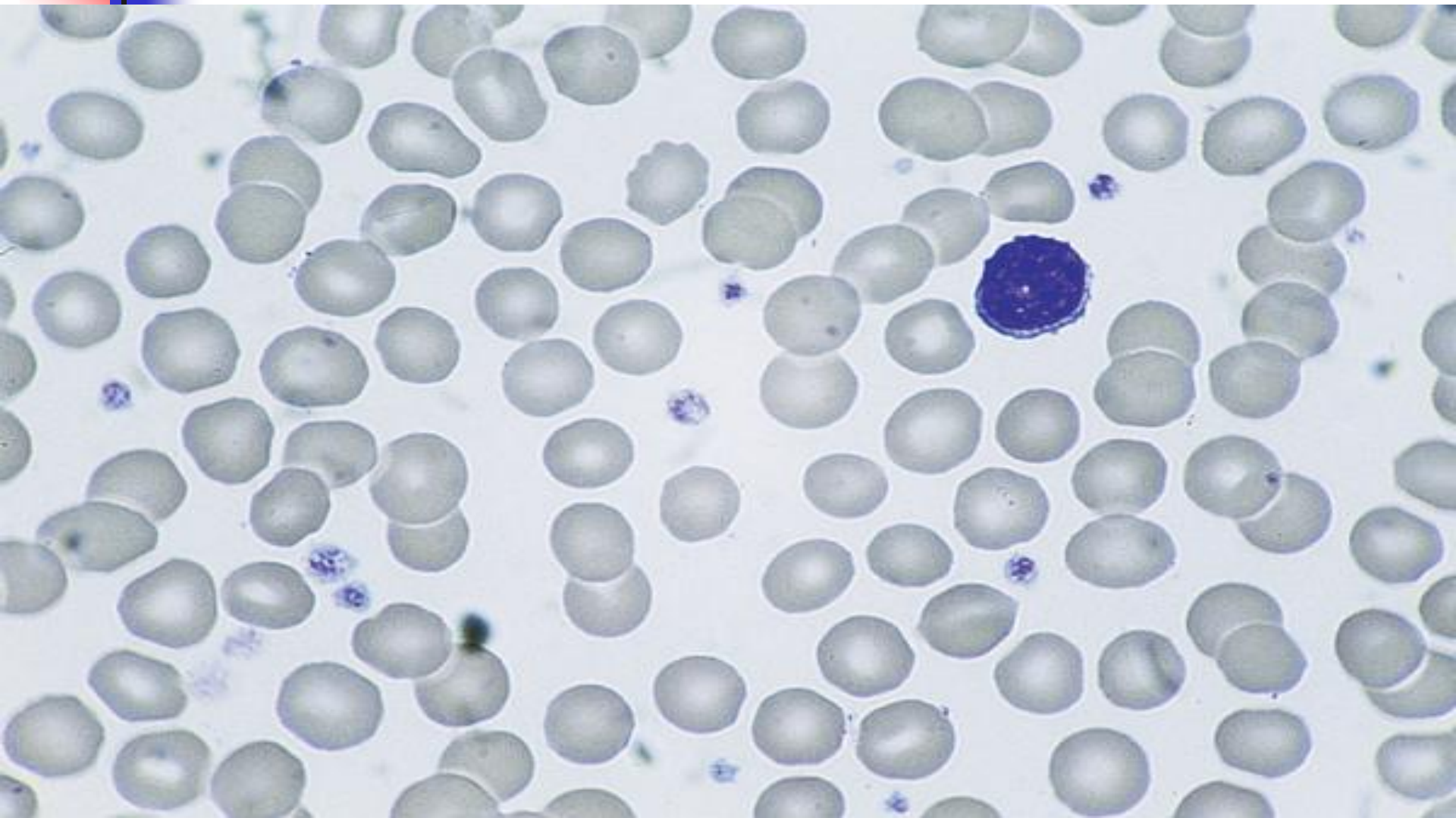
platelet satellism



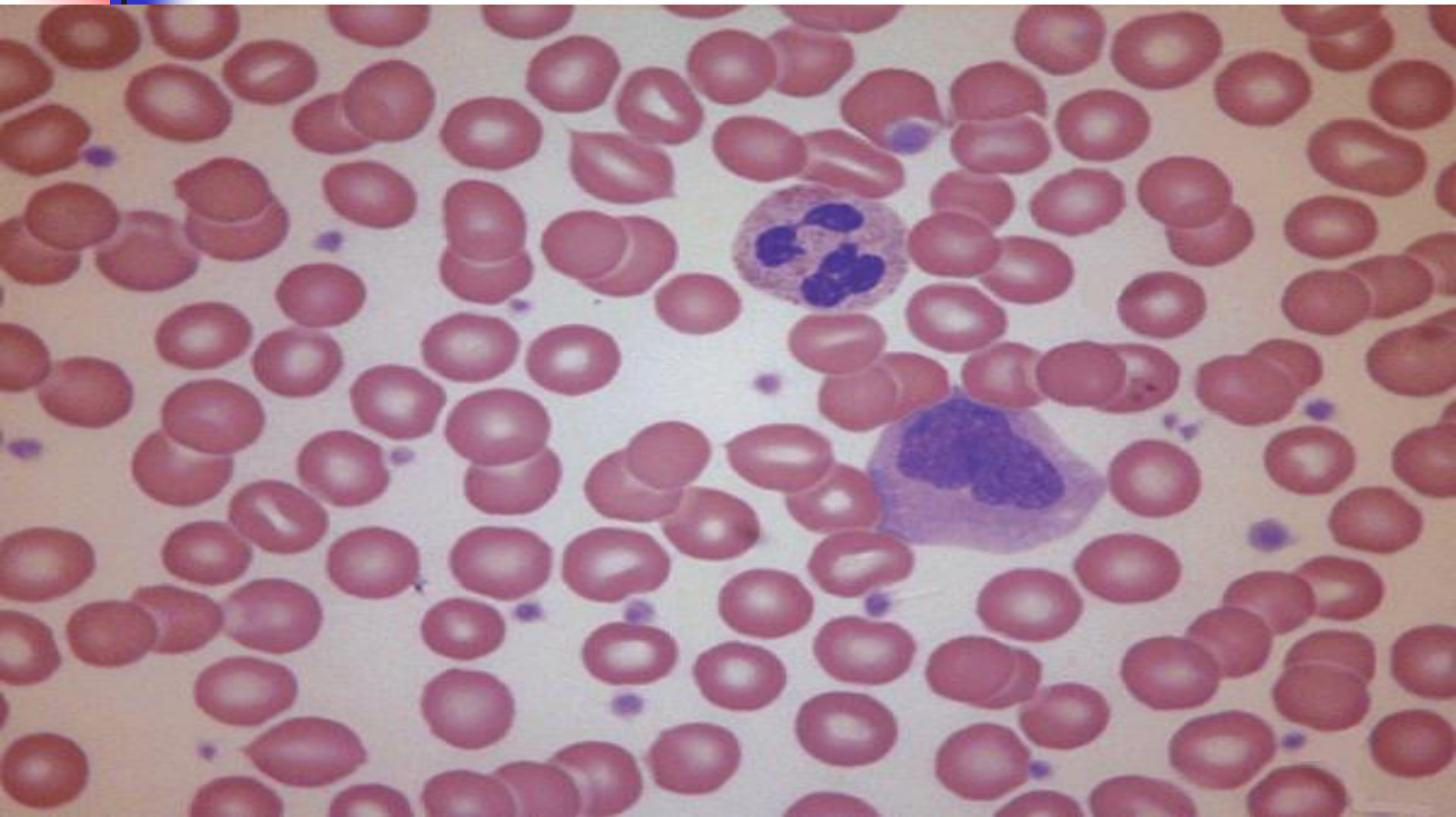
agranular platelets



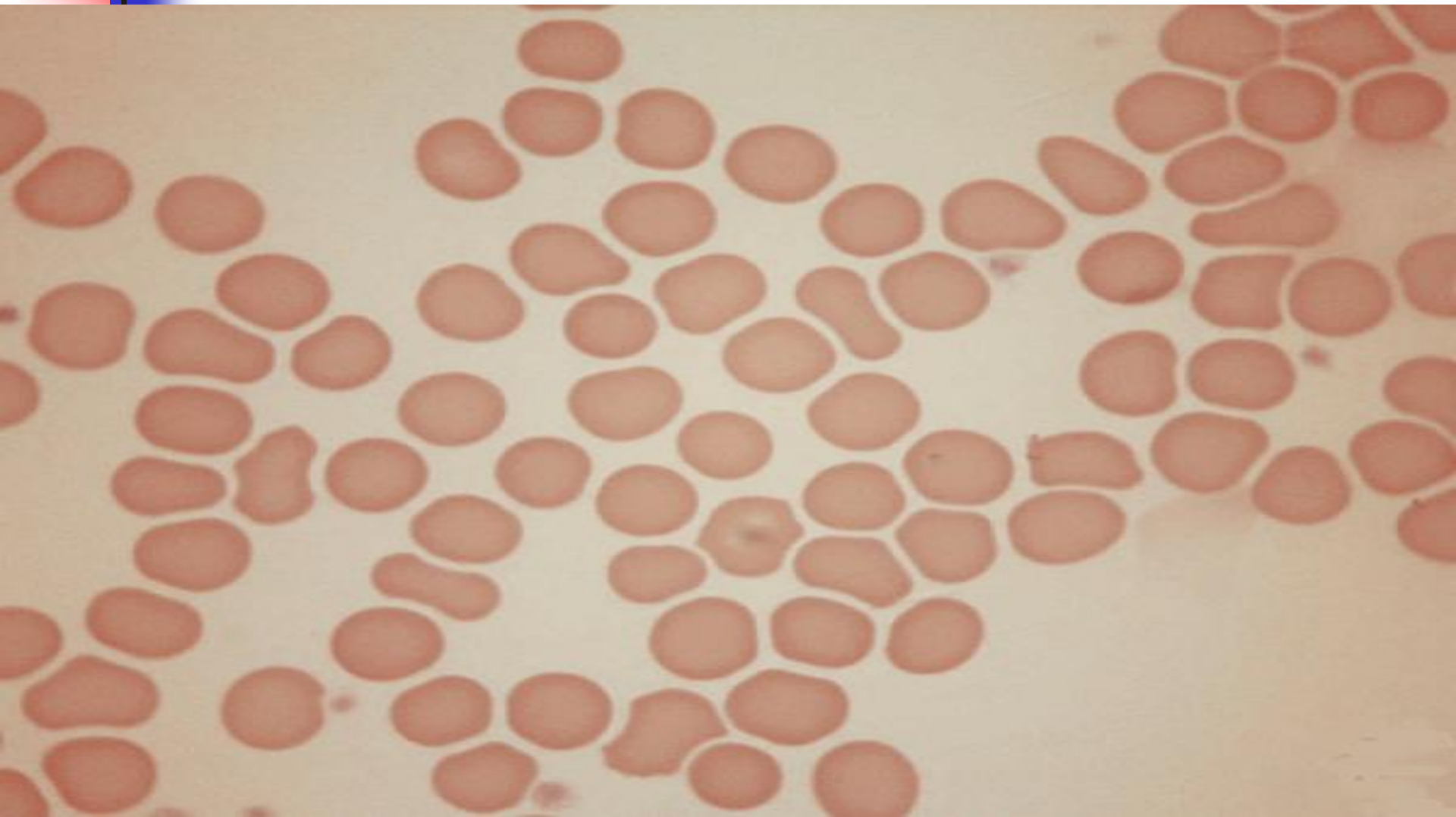
Film of a healthy adult



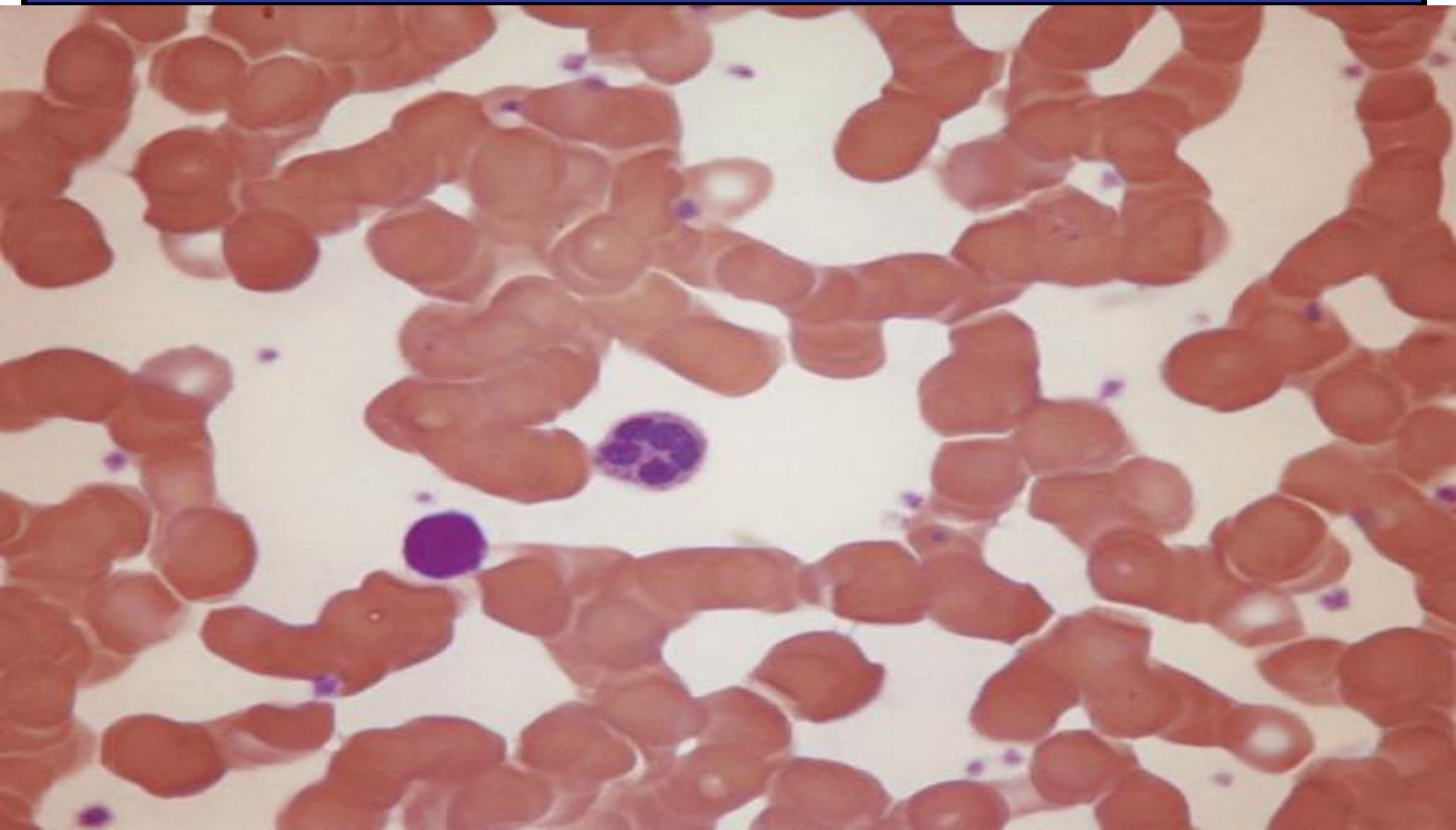
Ideal thickness for examination



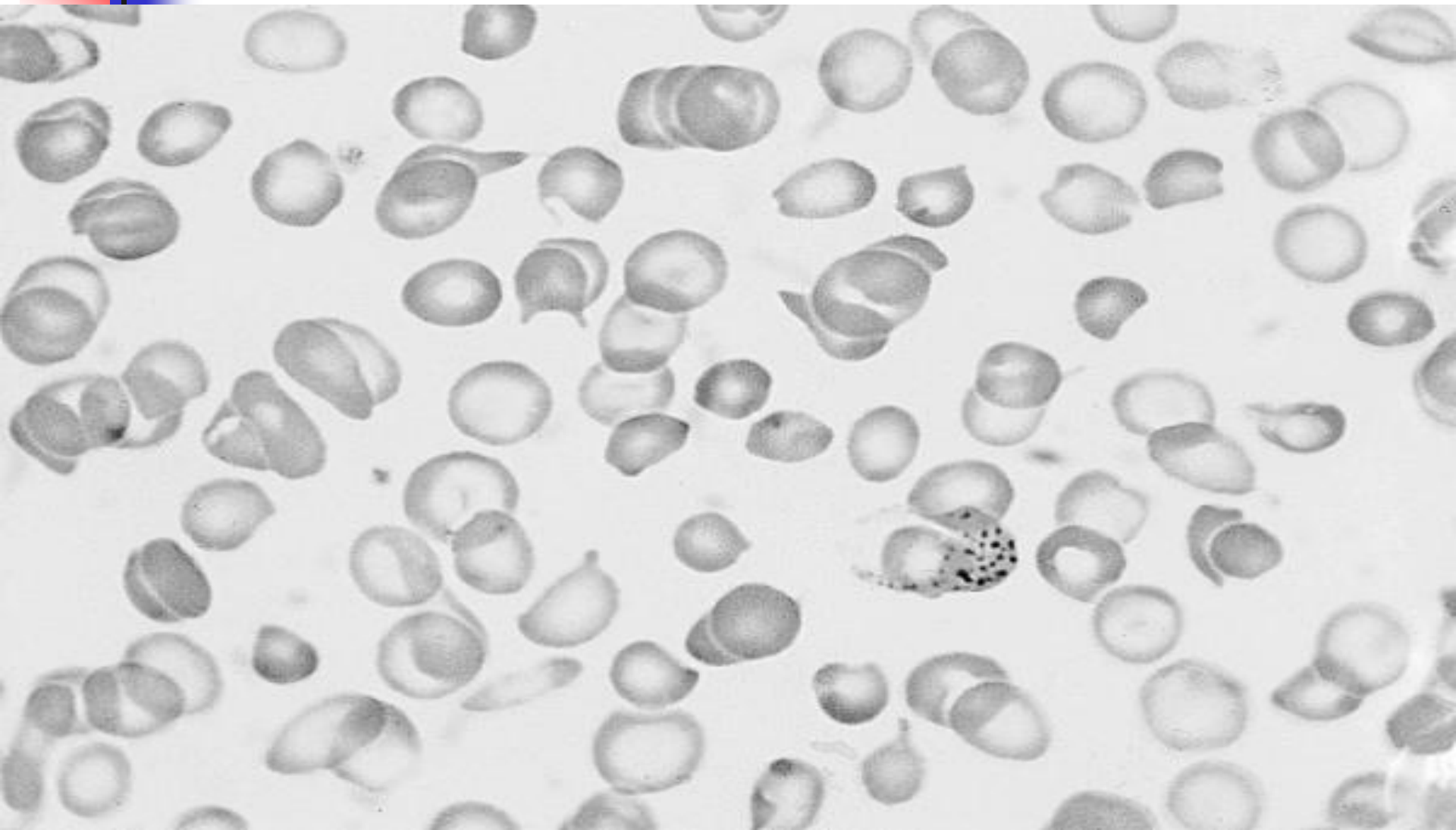
a blood film showing an area that is too thin for examination



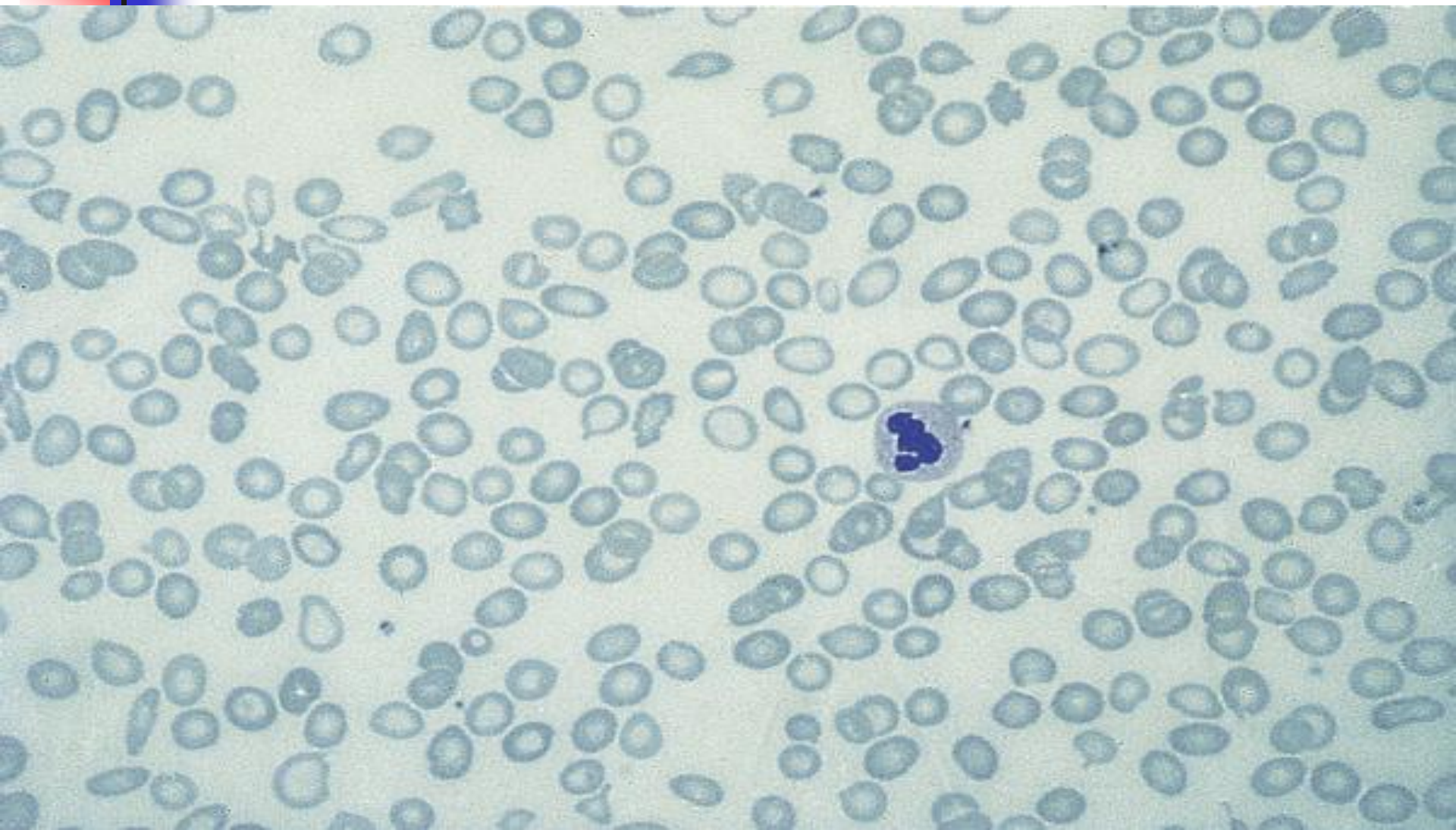
a blood film showing an area that is too thick for examination



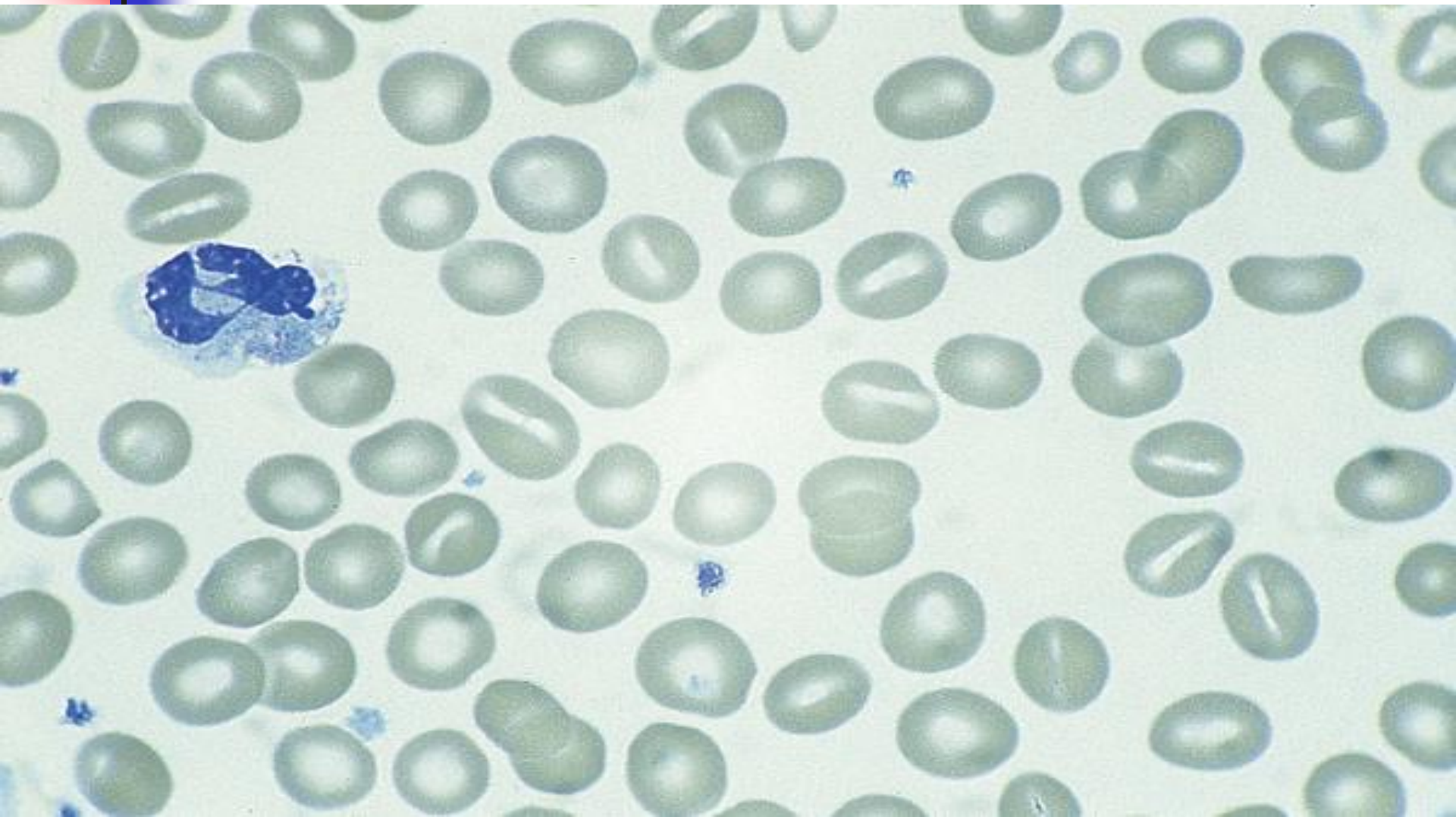
Heterozygous Hb D-Punjab/β thalassaemia. Shows anisocytosis, .poikilocytosis, hypochromia, microcytosis, and basophilic stippling



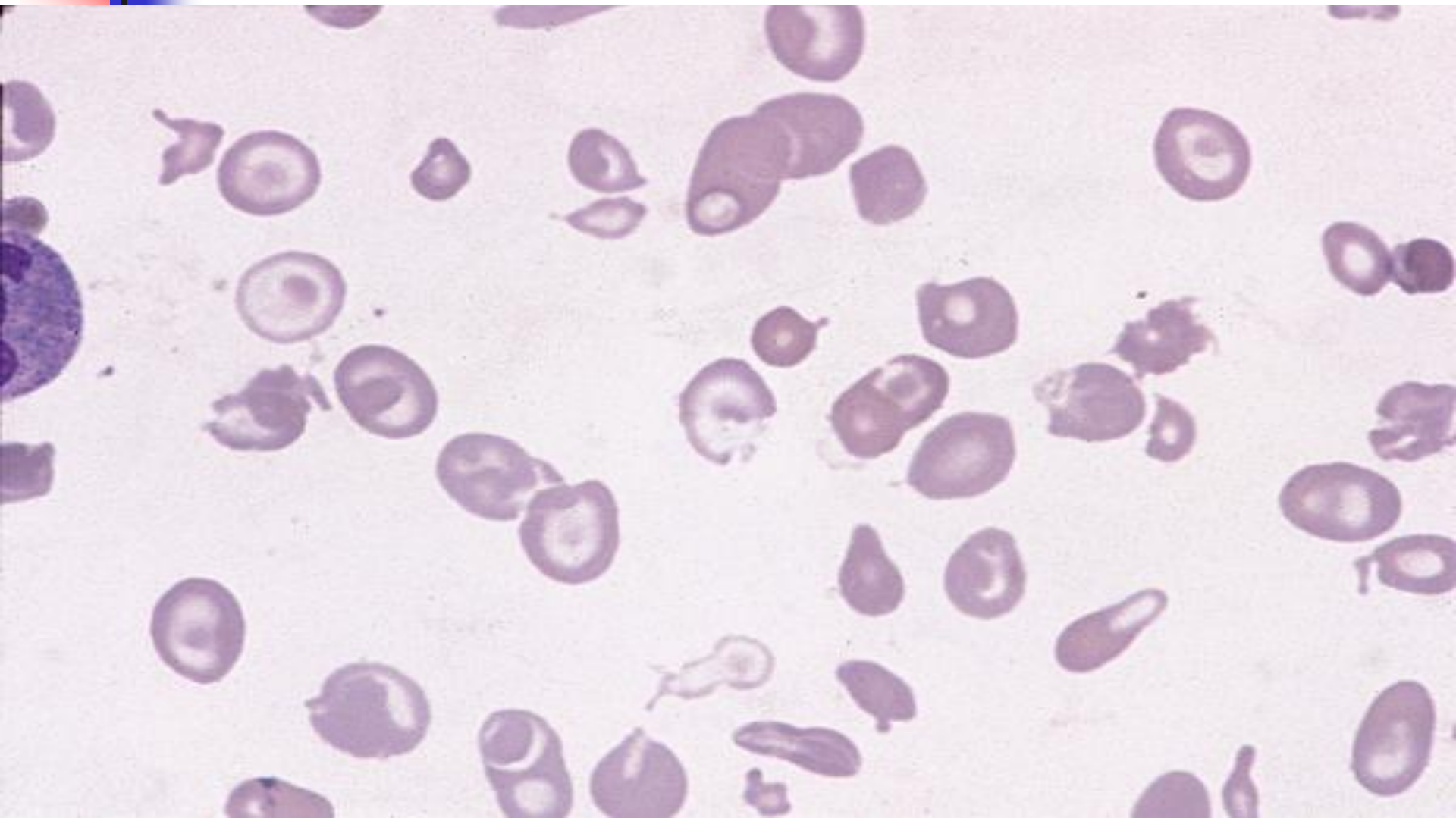
Photomicrograph of a blood film. Iron deficiency anaemia. Shows hypochromia, microcytosis, and poikilocytosis



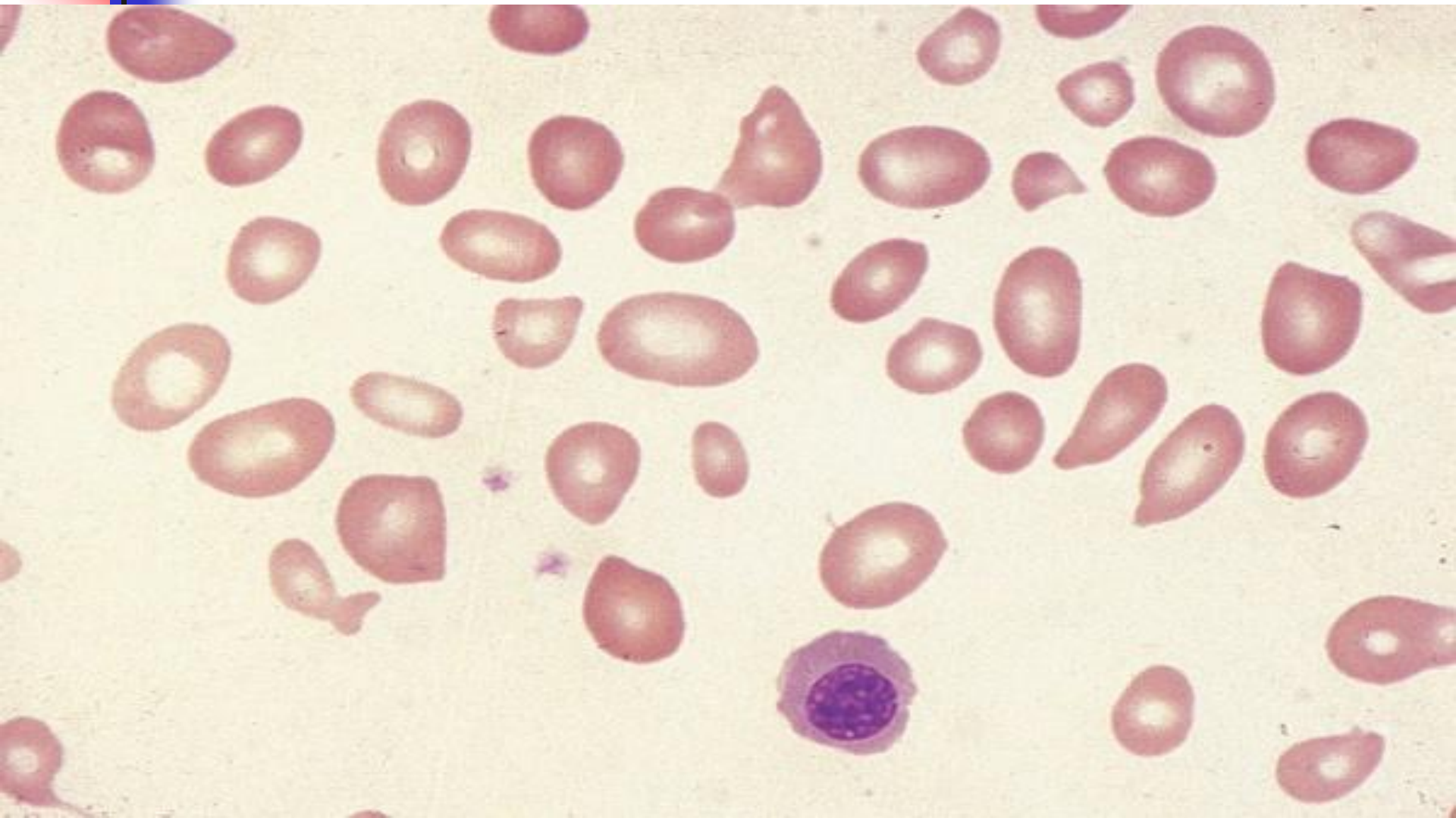
.Liver disease. Shows macrocytosis and stomatocytosis



patient with compound heterozygosity for haemoglobin E and β° .thalassaemia. Shows marked anisocytosis and poikilocytosis

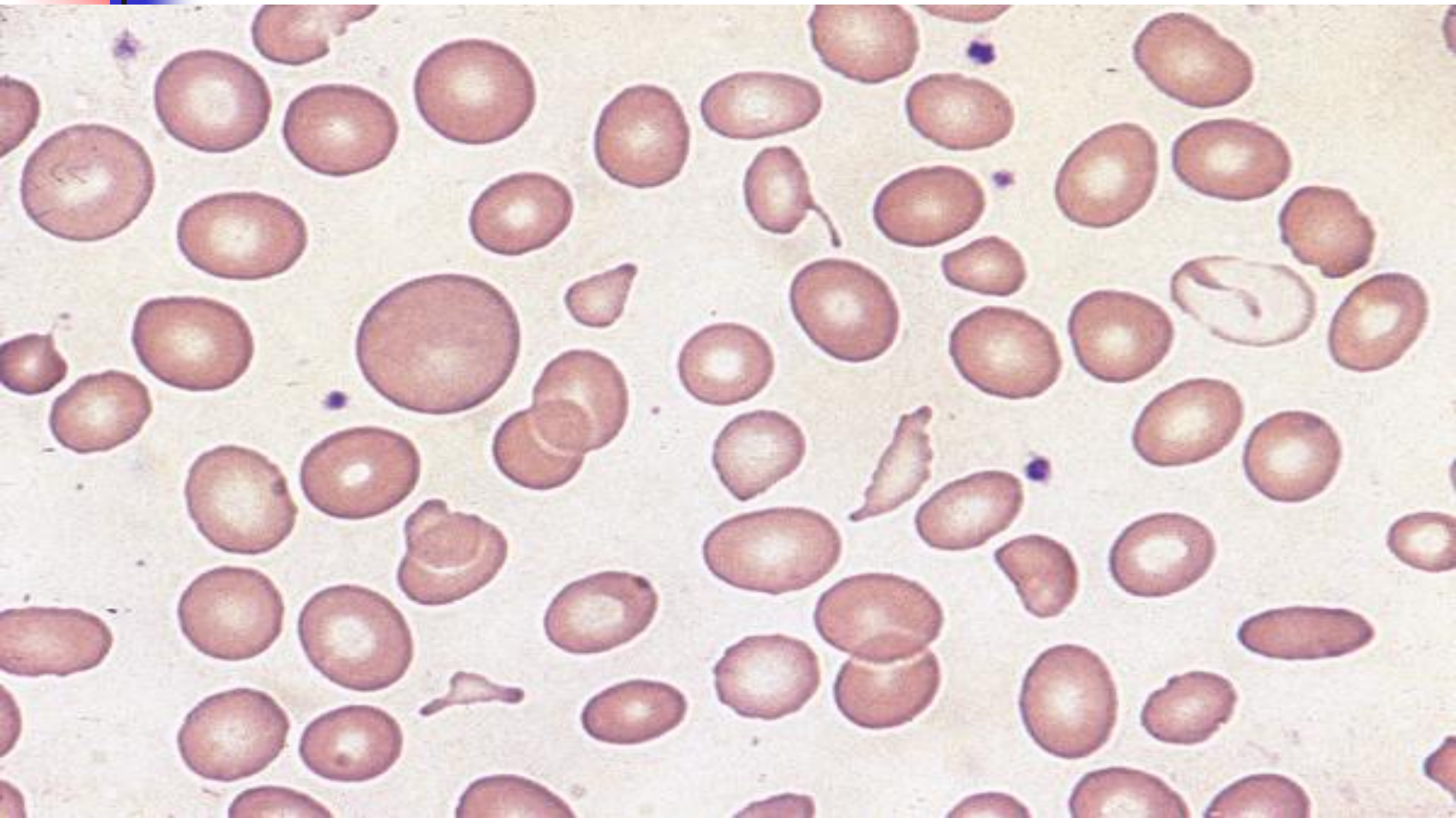


Pernicious anaemia. Shows marked anisocytosis, moderate poikilocytosis (including oval macrocytes and teardrop .cells), and a megaloblast

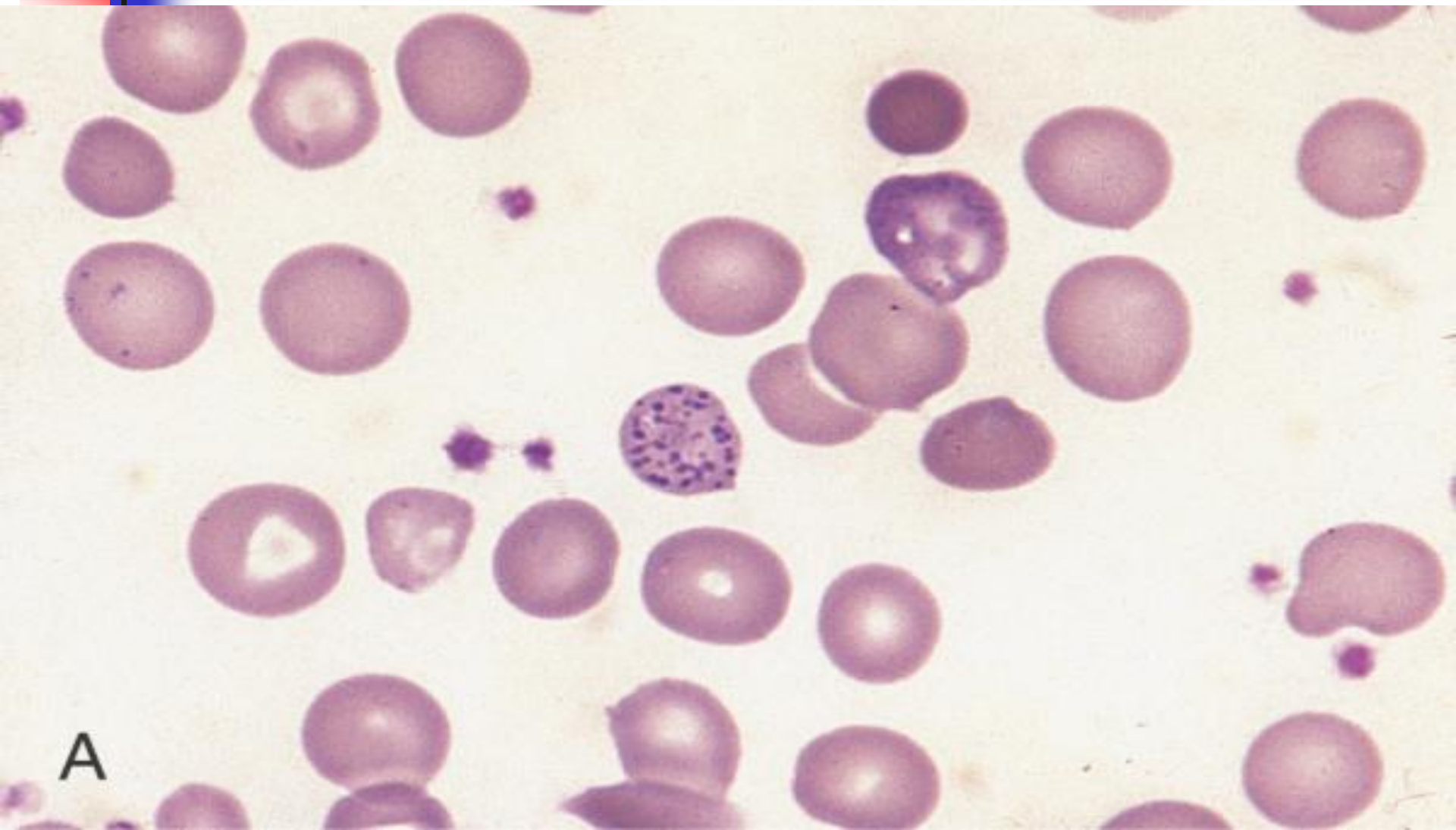


Idiopathic myelofibrosis.
Many of the erythrocytes are elliptical or oval

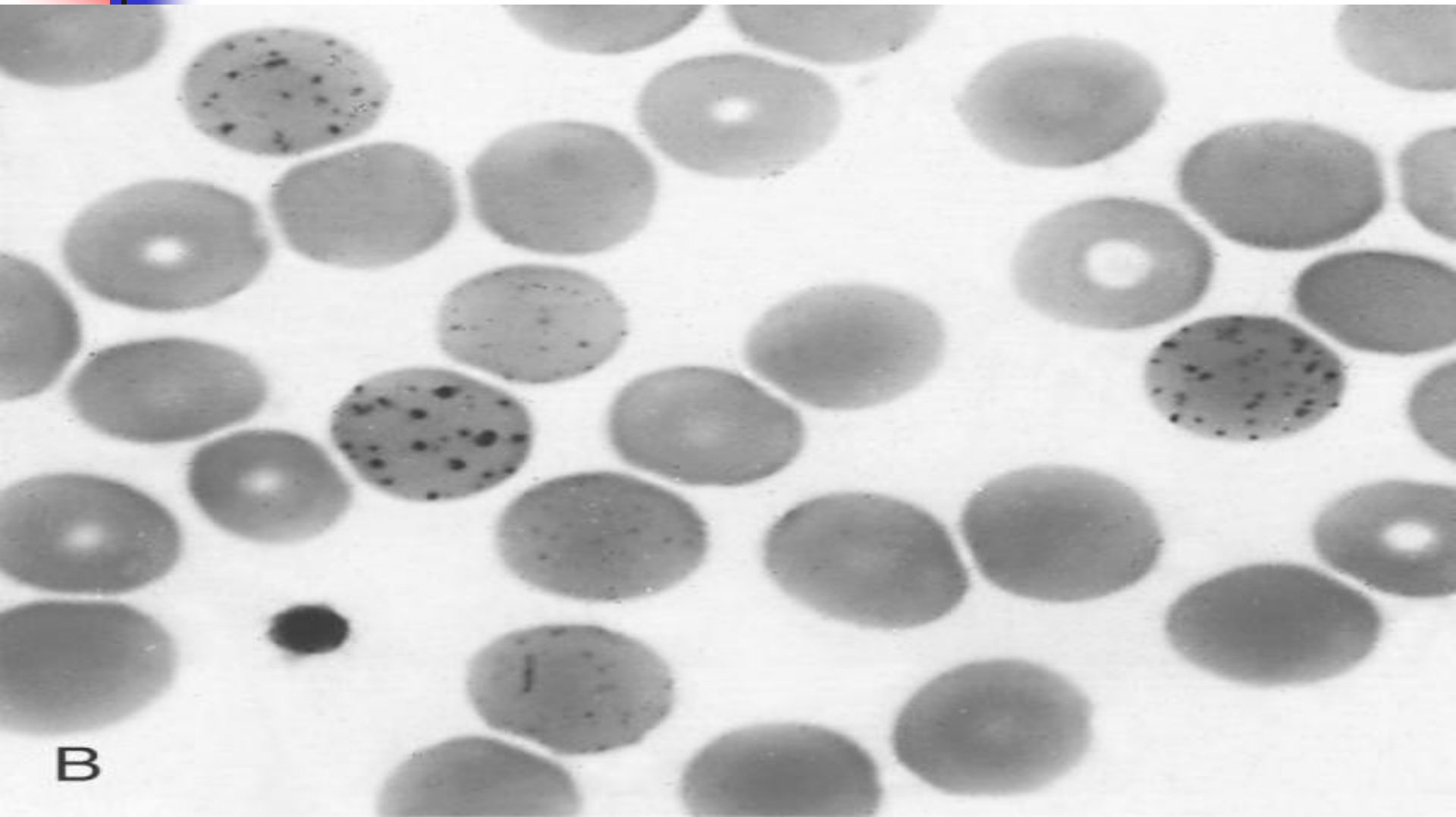
Congenital dyserythropoietic anaemia type II.
Shows marked anisocytosis, marked poikilocytosis, one unusually .large macrocyte, and one severely hypochromic cell



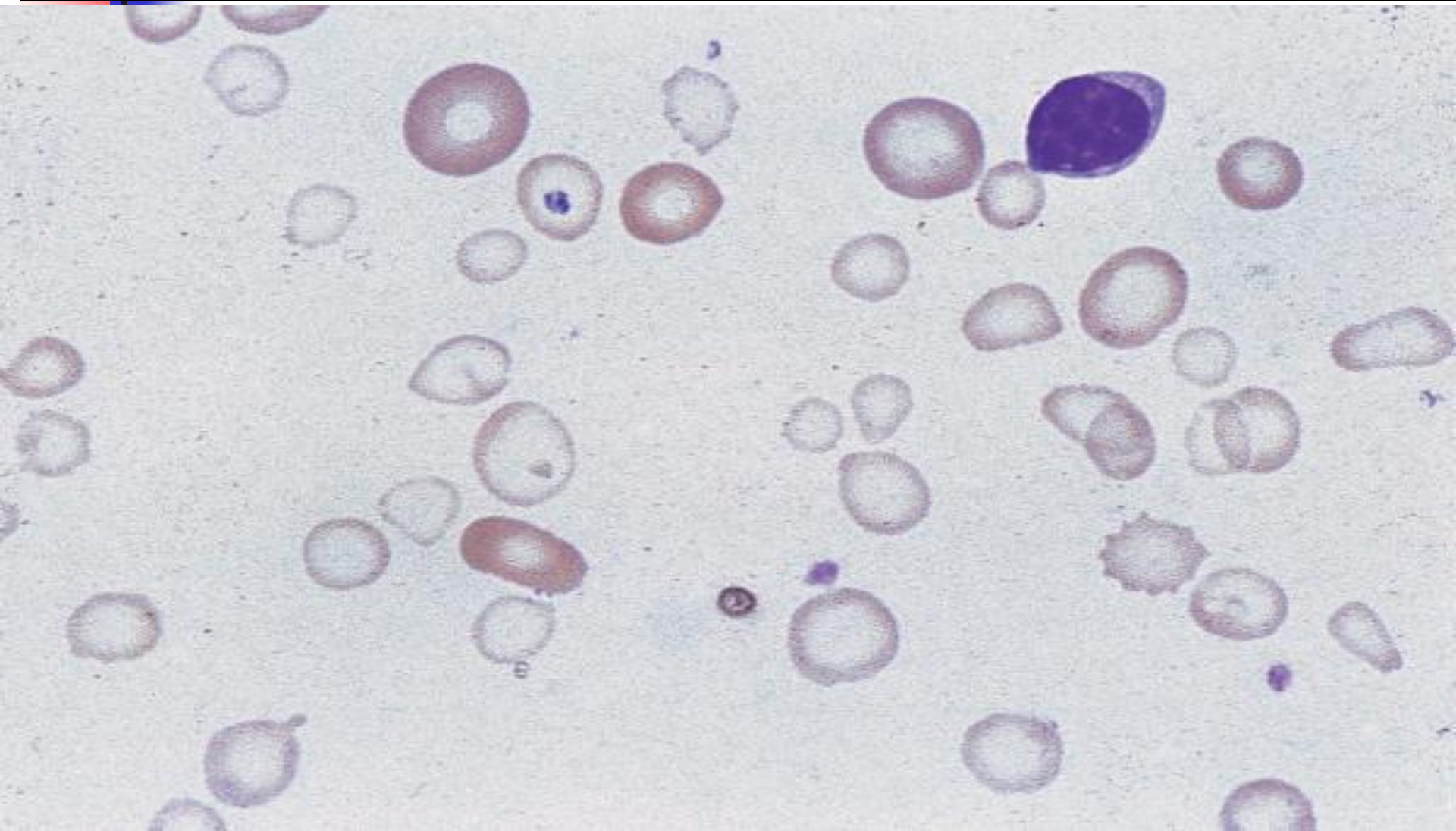
β Thalassaemia trait shows hypochromia, microcytosis, and basophilic stippling. B: Erythropoietic porphyria. Shows prominent .basophilic stippling



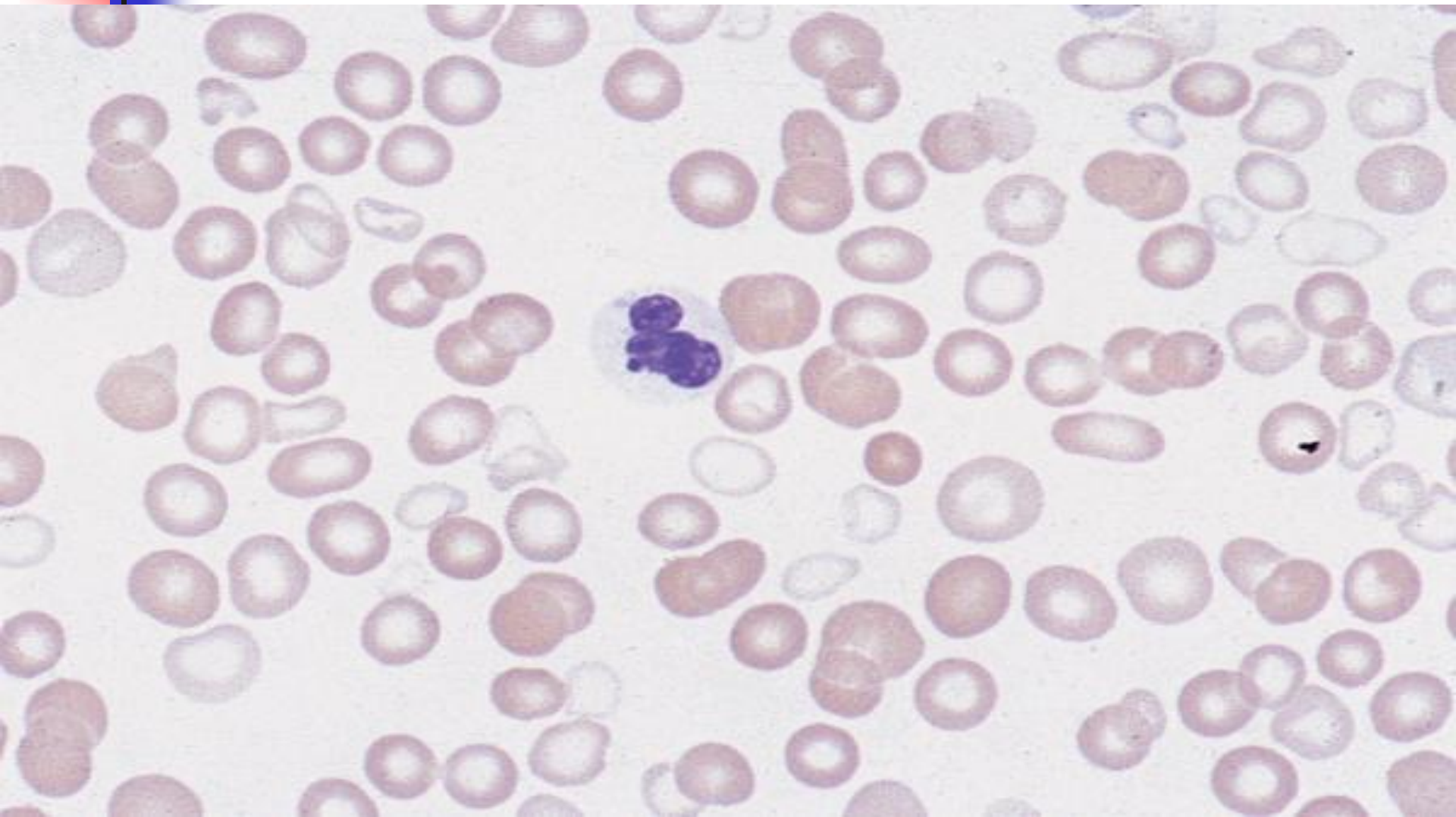
Shows prominent basophilic stippling



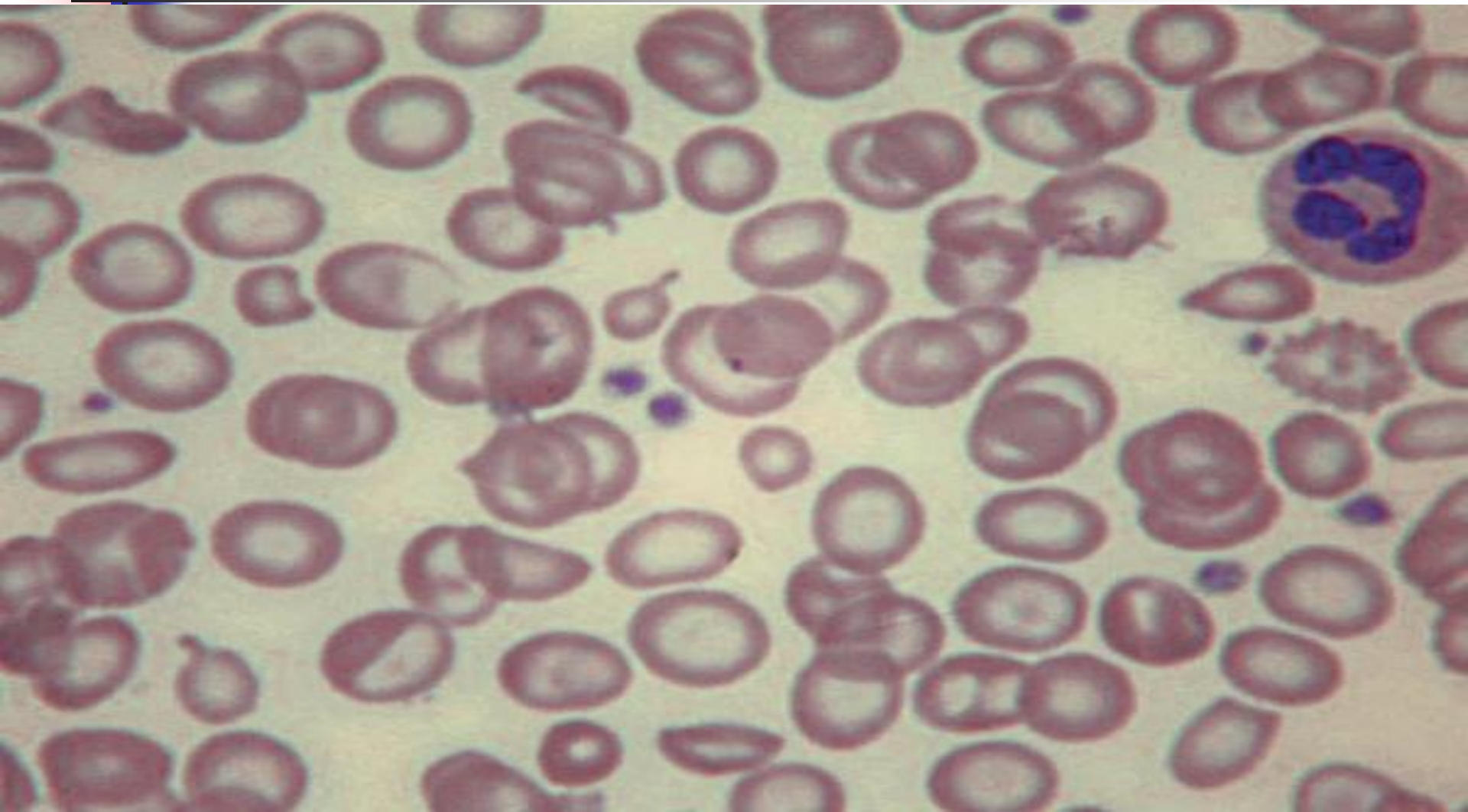
Iron deficiency anaemia. Shows a marked degree of hypochromia, microcytosis, marked anisocytosis, and mild poikilocytosis; there are some .normally haemoglobinized cells



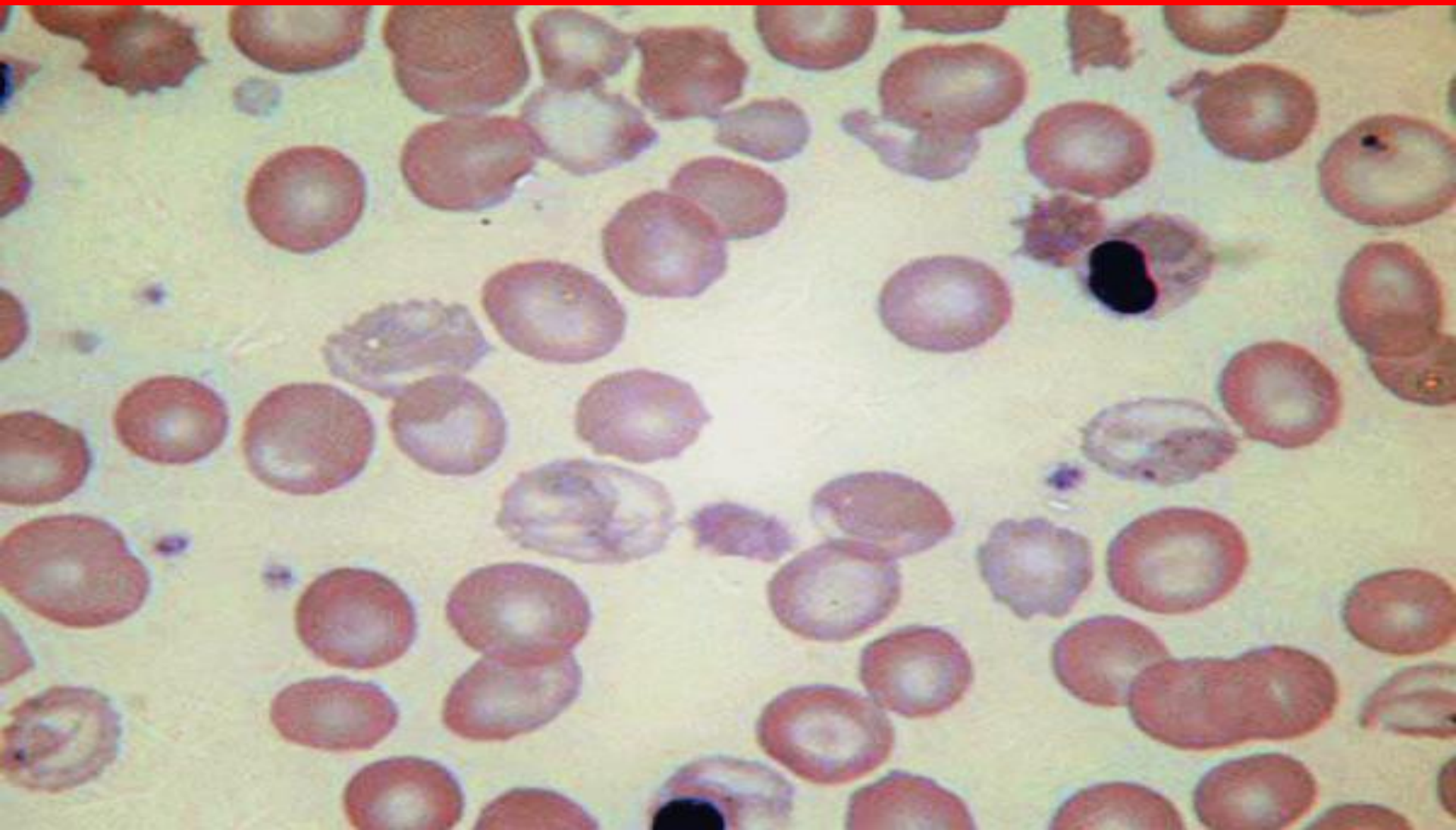
Acquired sideroblastic anaemia (refractory anaemia with ring sideroblasts). Shows a dimorphic blood film with a mixture of normochromic normocytic cells and hypochromic microcytes; there are also several polychromatic macrocytes



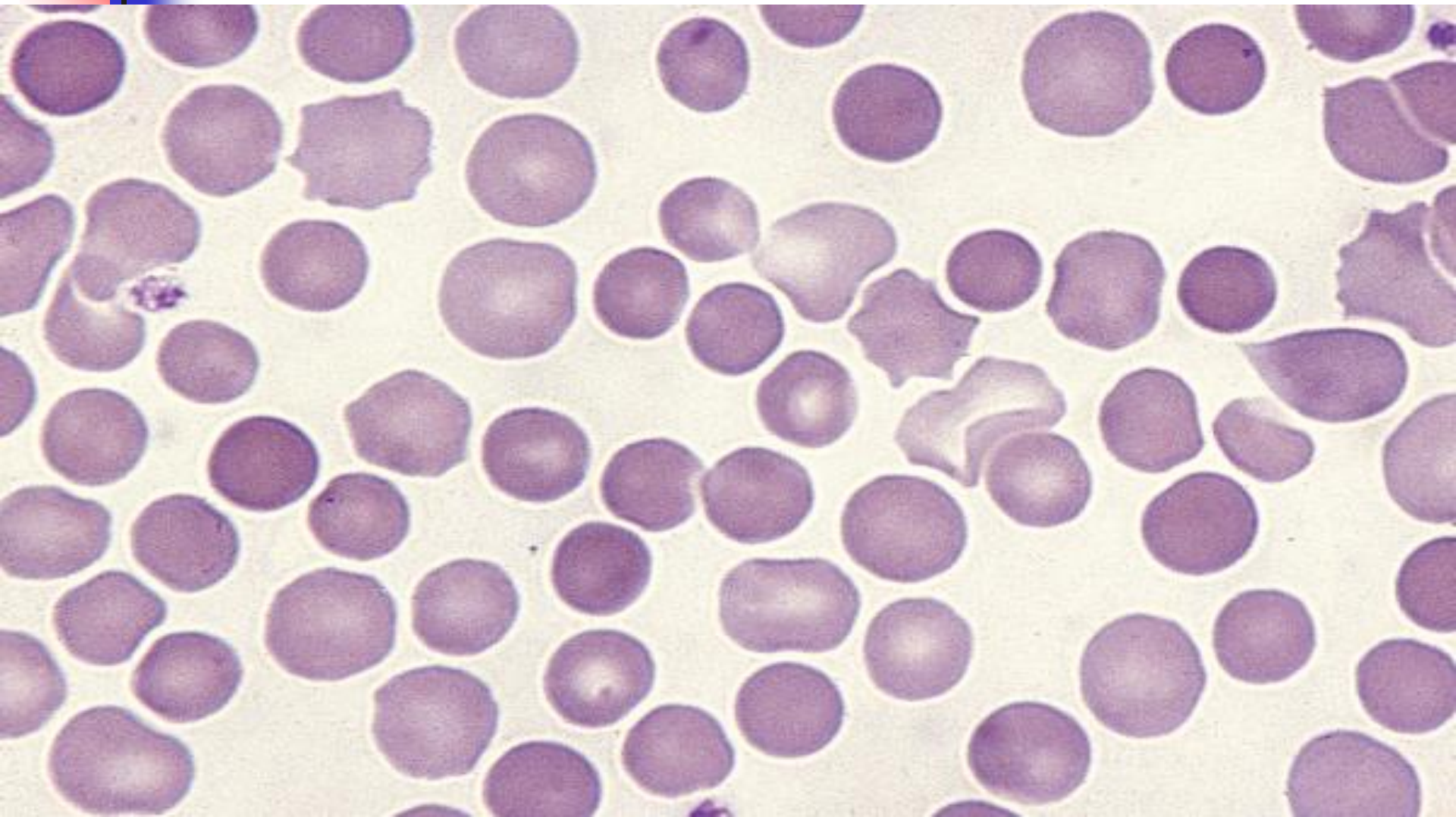
Haemoglobin H disease. Shows microcytosis, moderate hypochromia, moderate anisocytosis, and some poikilocytes (including teardrop poikilocytes and red cell fragments).



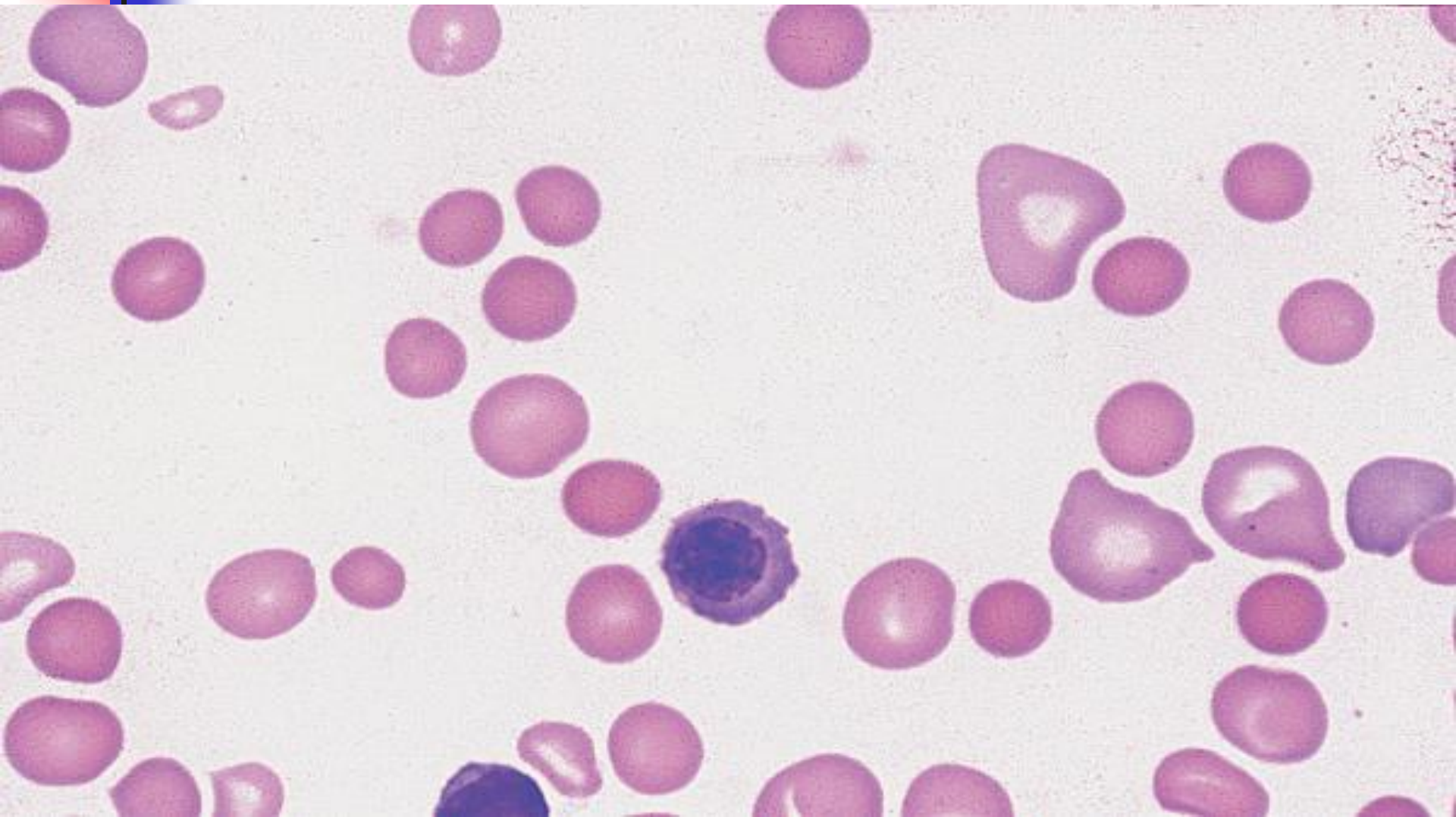
β Thalassaemia major. Shows a dimorphic blood film. The normal cells are transfused cells. The patient's own cells show severe .hypochromia. There are three nucleated red blood cells



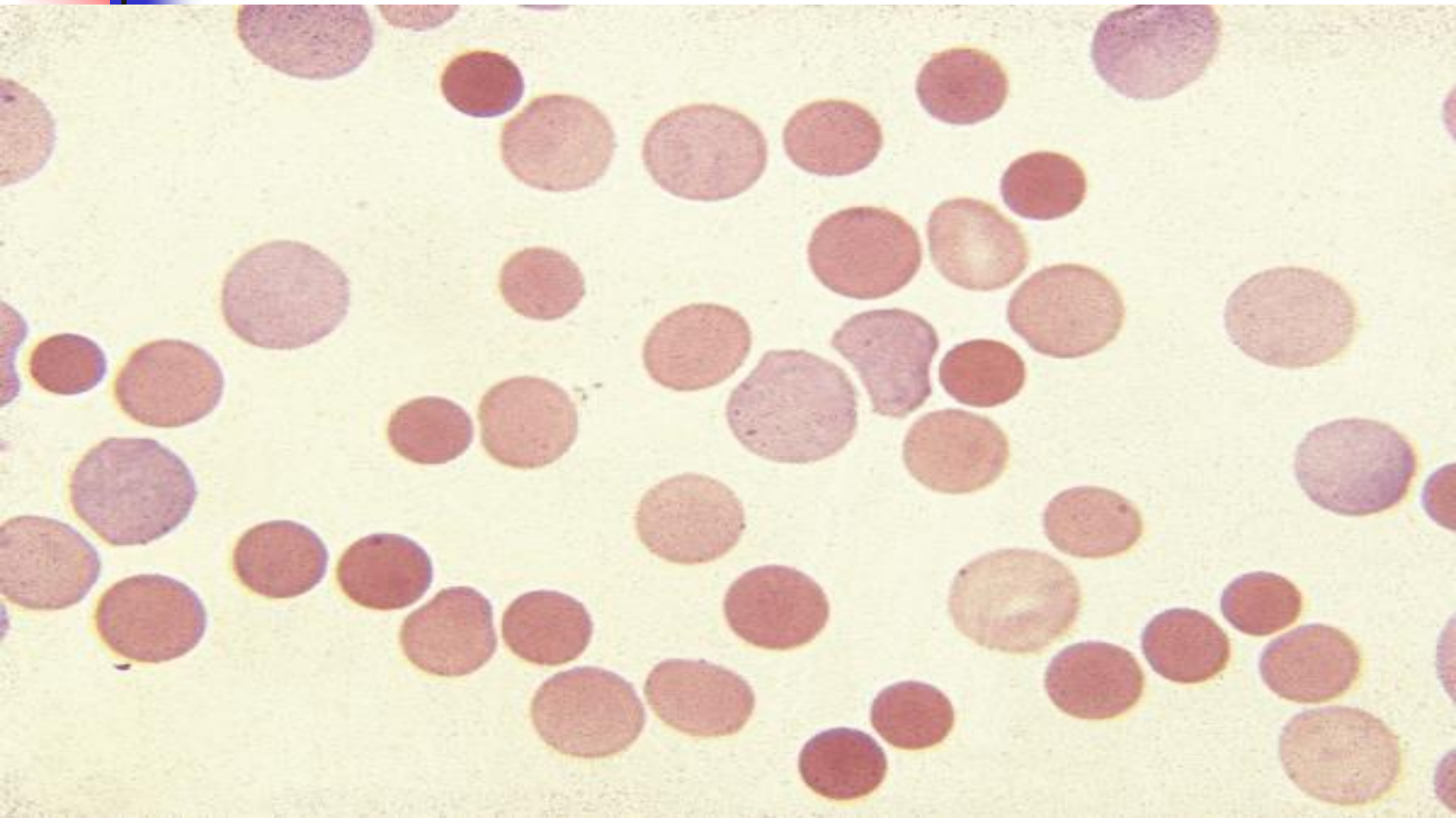
Hereditary spherocytosis. Shows a moderate degree of spherocytosis .and anisocytosis. Note the round contour of the spherocytes

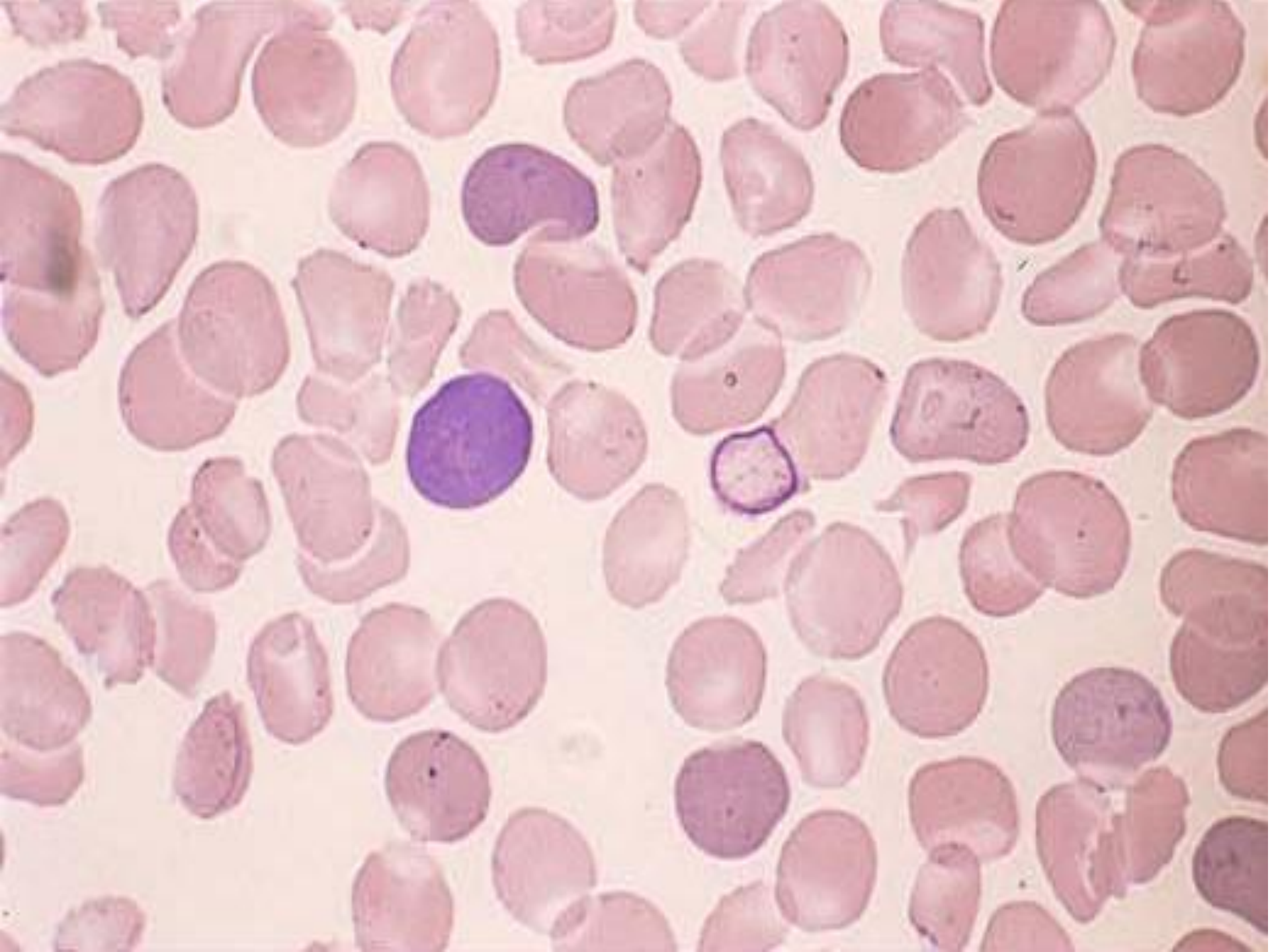


ABO haemolytic disease of the newborn. Spherocytosis is intense, and .there are several polychromatic macrocytes



Autoimmune haemolytic anaemia. Shows marked spherocytosis and anisocytosis. There are numerous polychromatic macrocytes





Polychromatic erythrocytes Cabot rings

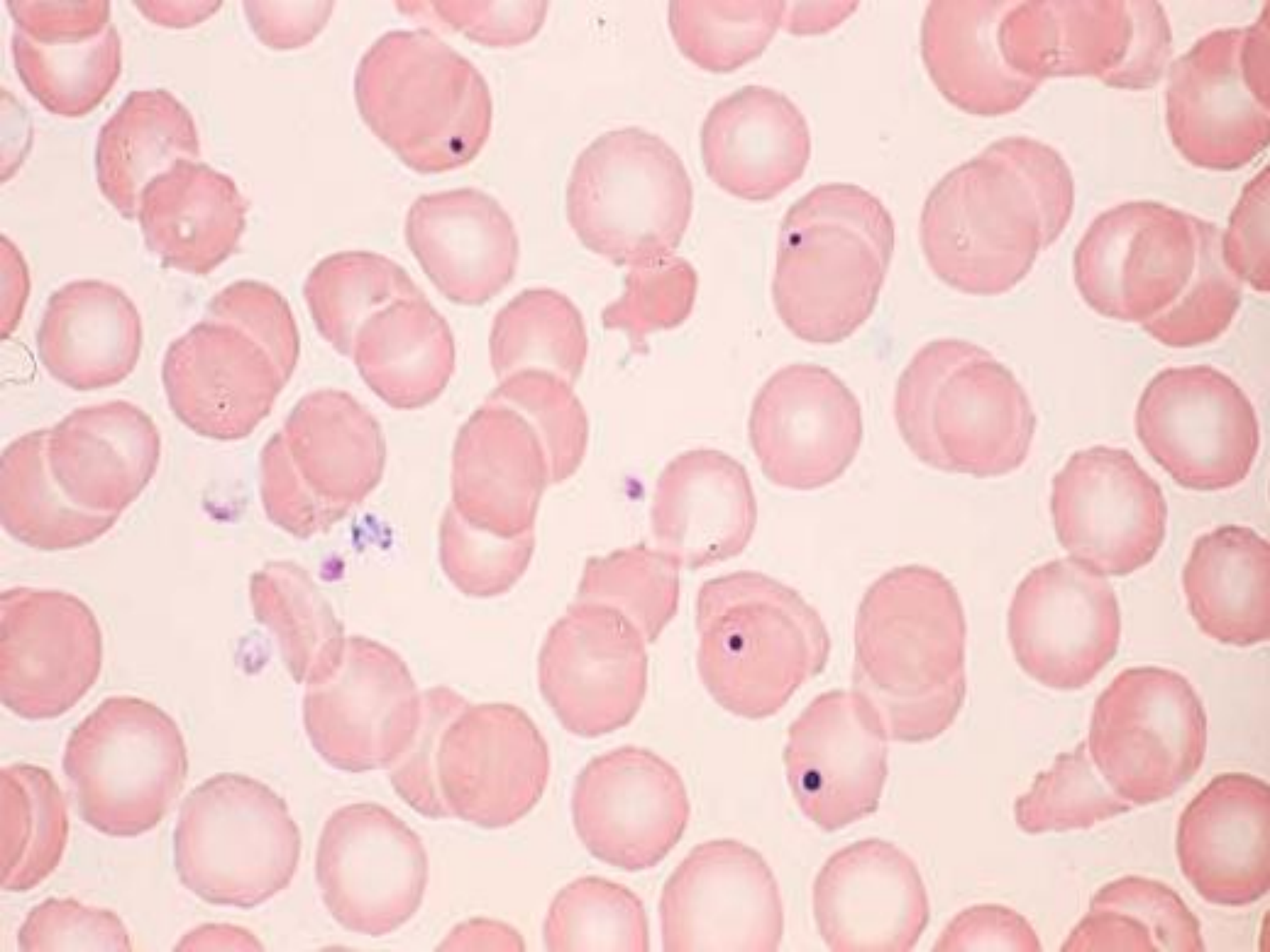
Polychromatic erythrocytes Cabot rings. Polychromasia occurs when

mature erythrocytes show increased staining with basic dyes (violet stain) in addition to hemoglobin staining. It is usually associated with reticulocytosis.

Polychromasia occurs in red cells that still have a relatively high RNA content and in which hemoglobin synthesis is not yet Complete

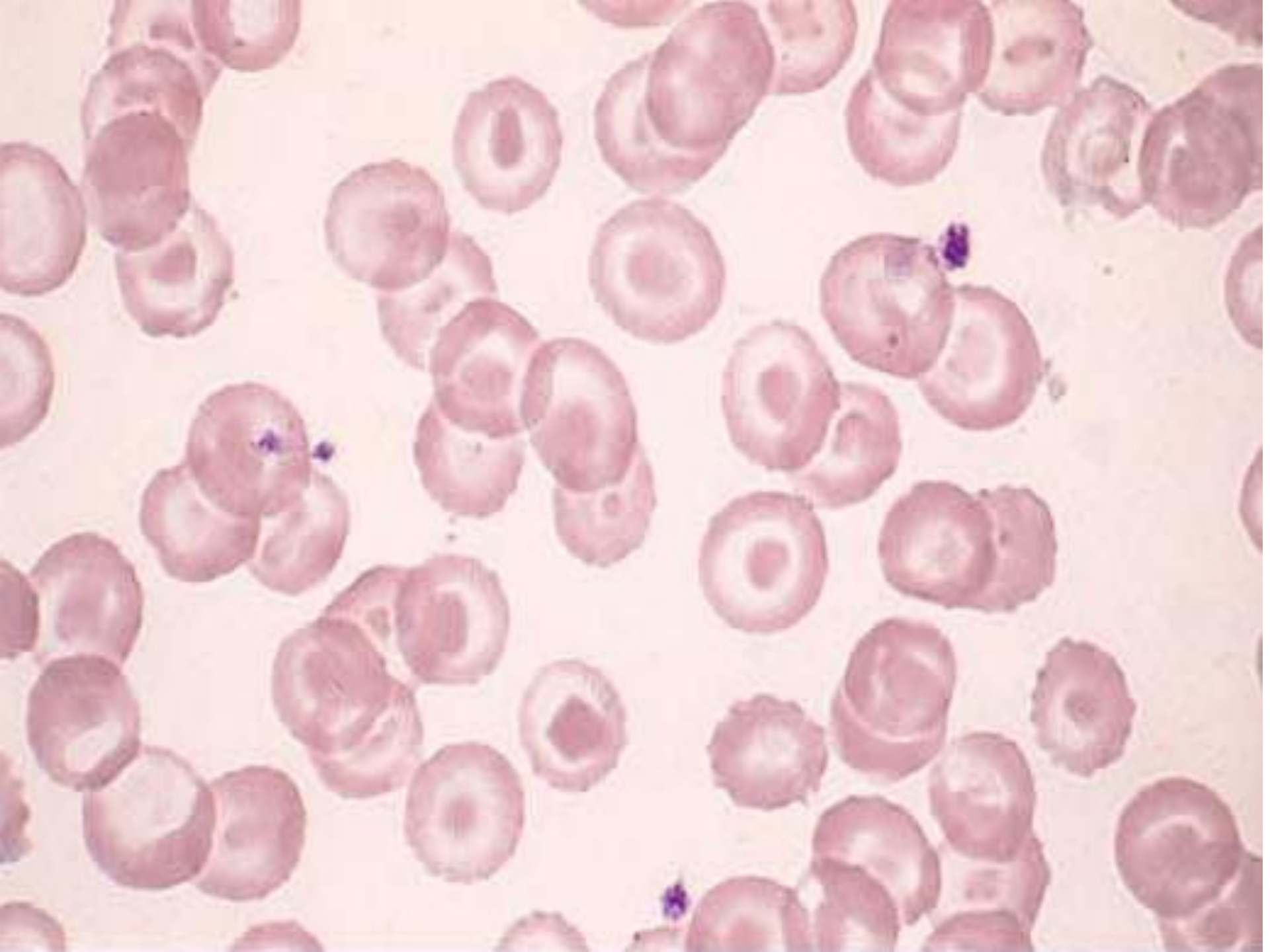
It is especially common in chronic hemolytic anemias. The variable staining of the erythrocytes is also termed anisochromia.

Cabot rings are remnants of spindle fibers and are a product of abnormal regeneration



Howell-Jolly bodies

nuclear remnants in the form of Howell-Jolly bodies, which are observed after splenectomy and in cases of splenic atrophy. Chromatin dust, like the Howell-Jolly bodies, consist of nuclear remnants



Target cells (Mexican hat cells)

- Target cells (Mexican hat cells) are distinguished from anulocytes by the deeper staining of their central zone and peripheral rim.
- They are particularly common in hemoglobin abnormalities,occurring also in other hemolytic anemias,severe iron deficiency, and after splenectomy

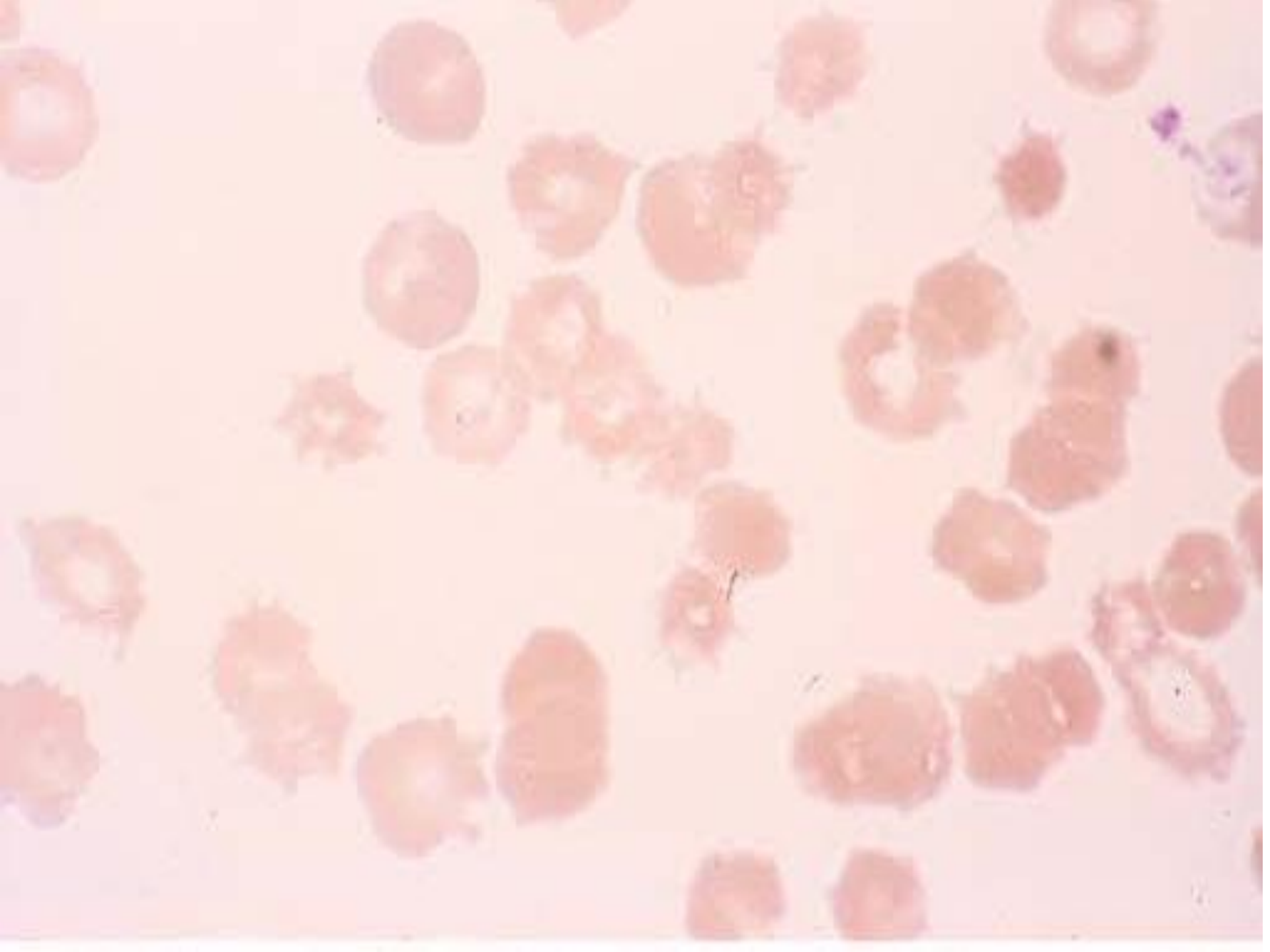
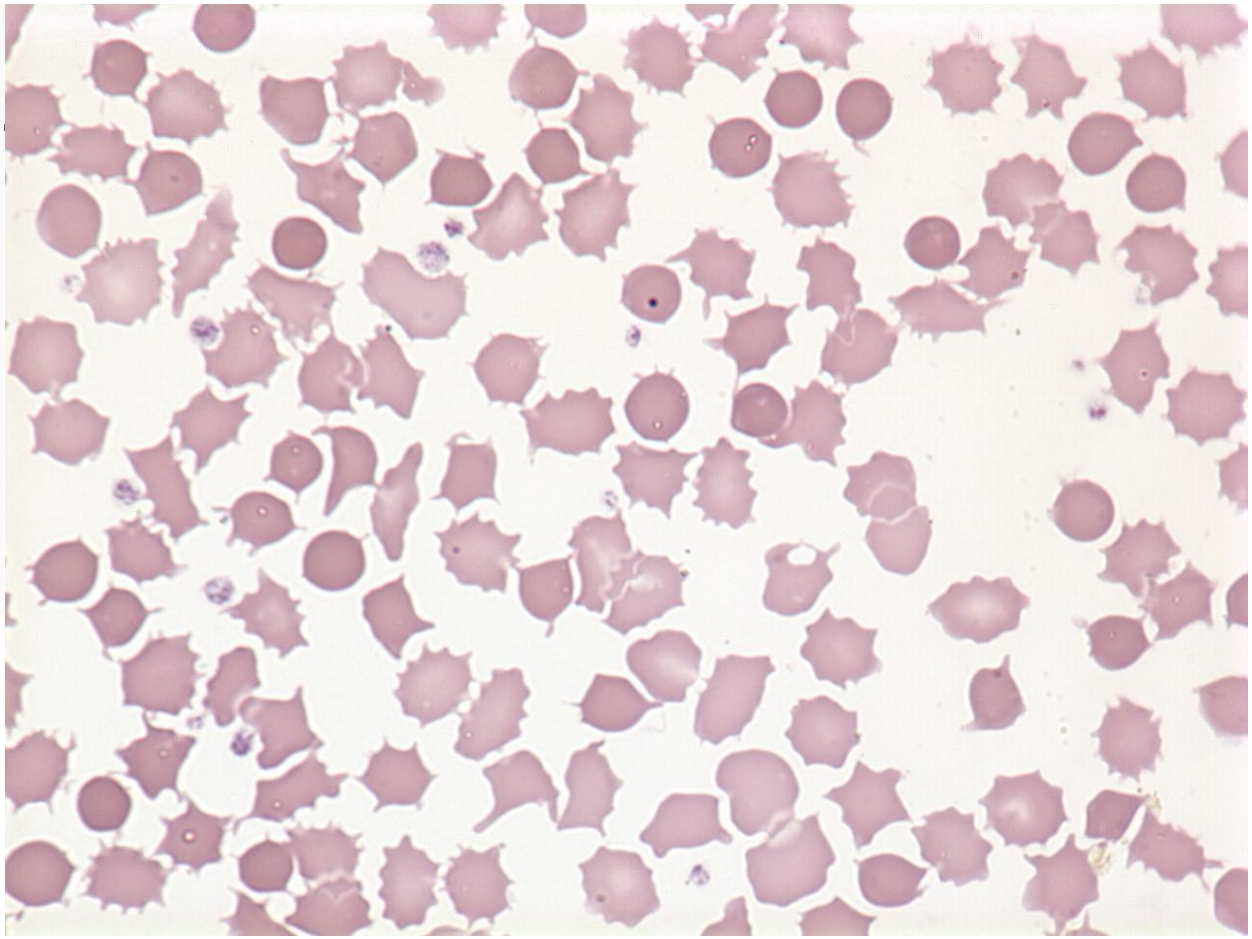


Figure 2. Acanthocytosis may be seen in severe malnutrition or lipid depreviation

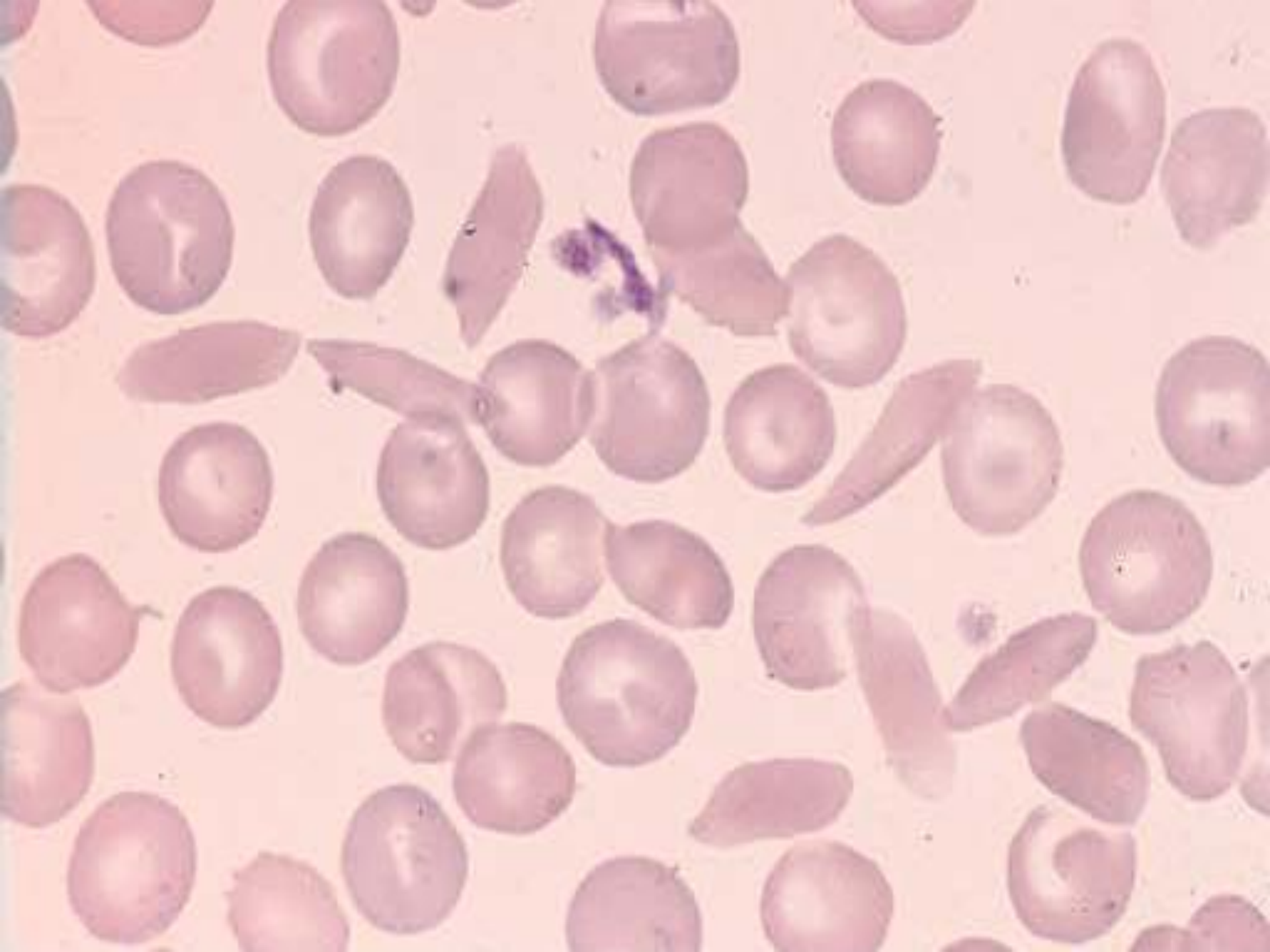


Maslak, P. ASH Image Bank 2005;2005:101405

Copyright ©2005 American Society of Hematology. Copyright restrictions may apply.

Acanthocytes or “burr cells

- by their jagged surface, which usually is deeply clefted. Acanthocytes are seen in a rare hereditary anomaly, A-b-lipoproteinemia. They are also a feature of uremia and hepatic coma,where large numbers of these cells are considered a poor prognostic sign. Acanthocyte formation has also been linked to the use of alcohol and certain drugs



Sickle cells(drepanocytes)

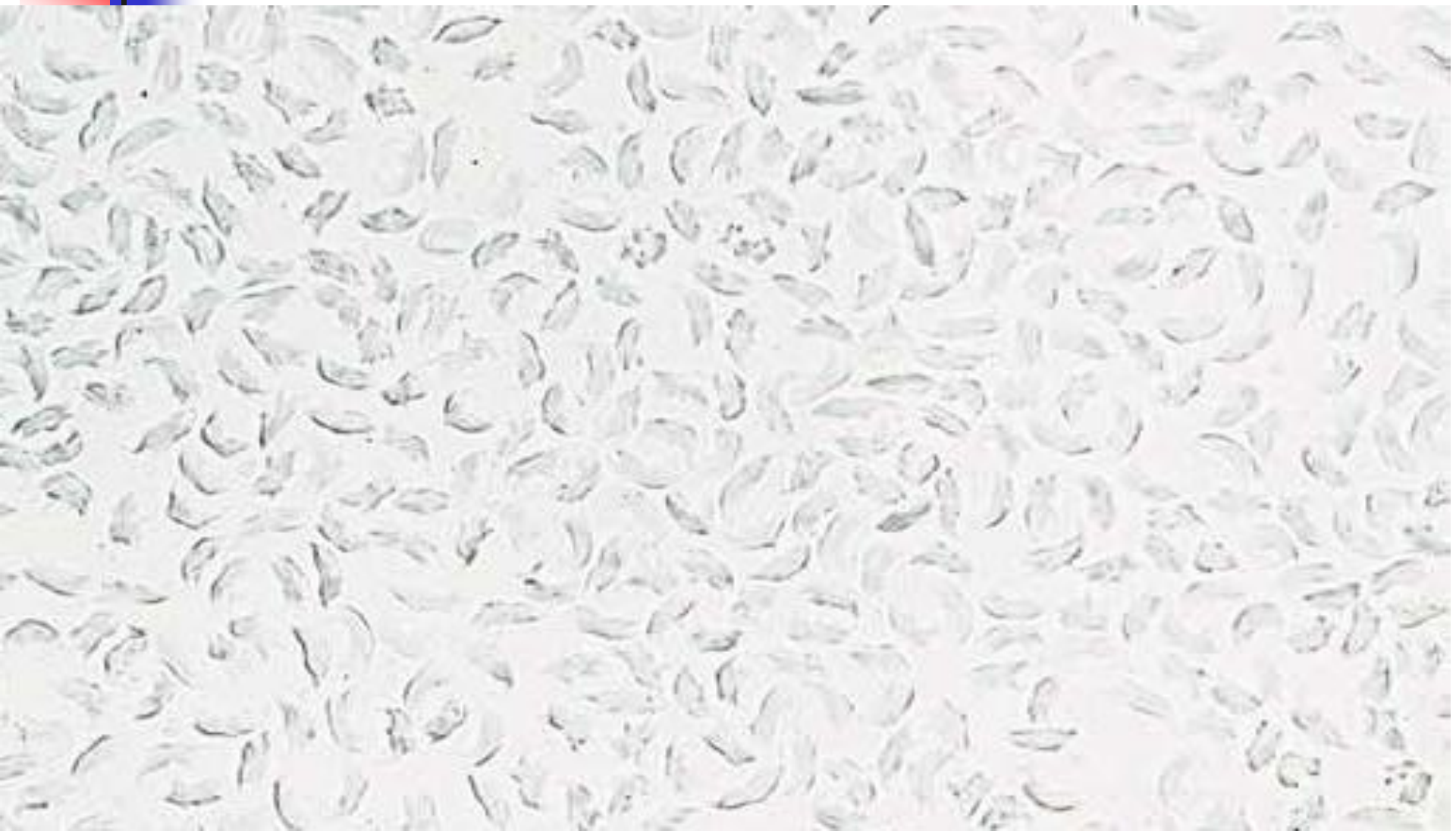
Sickleshaped erythrocytes occasionally form spontaneously,but sickling is consistently induced by oxygen withdrawal in the sickle cell test .

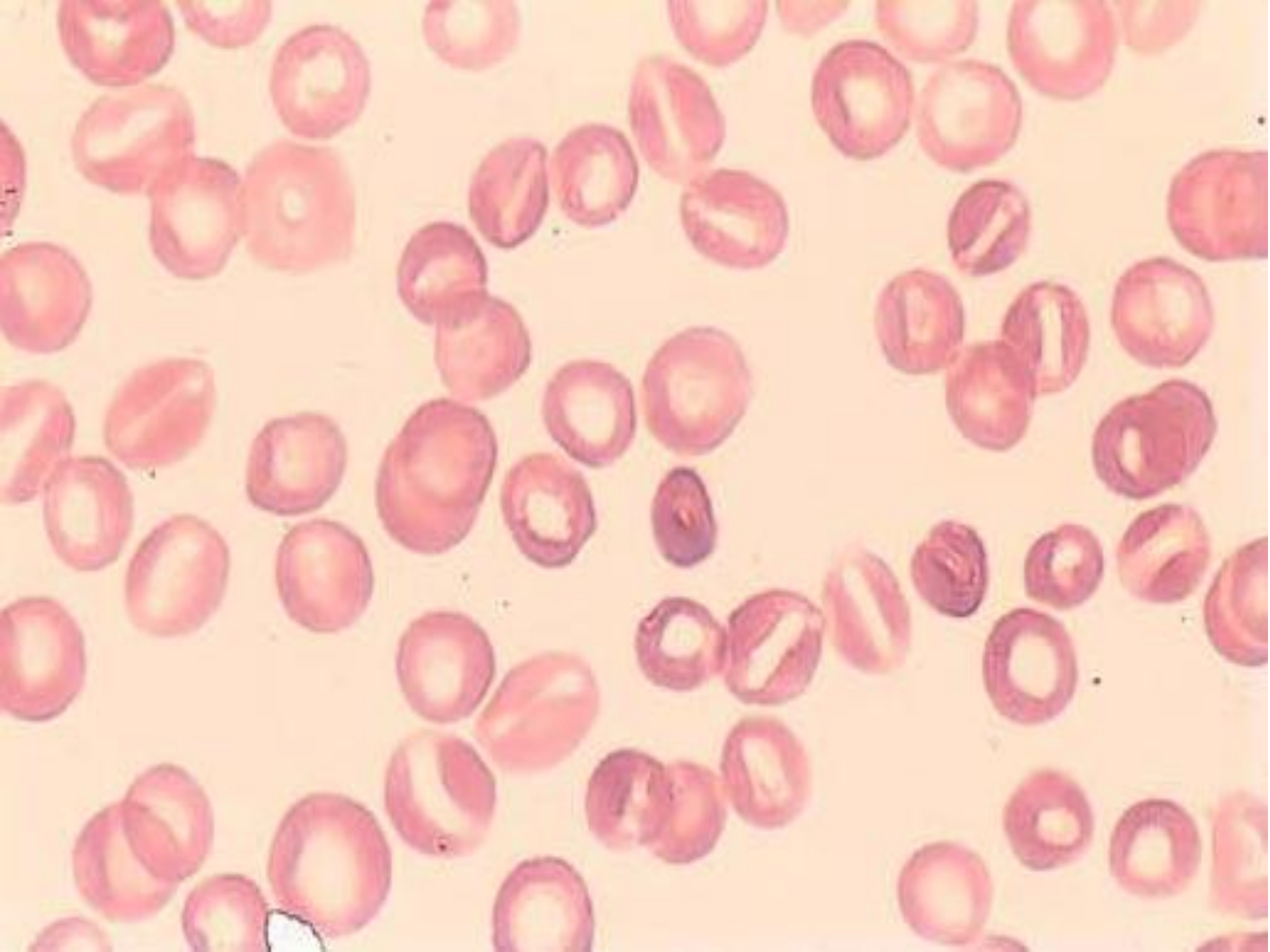
It signifies a common hemoglobinopathy,

HbS disease (sickle cell anemia), which affects blacks almost exclusively.

Red cell sickling also occurs in the less common HbC disease

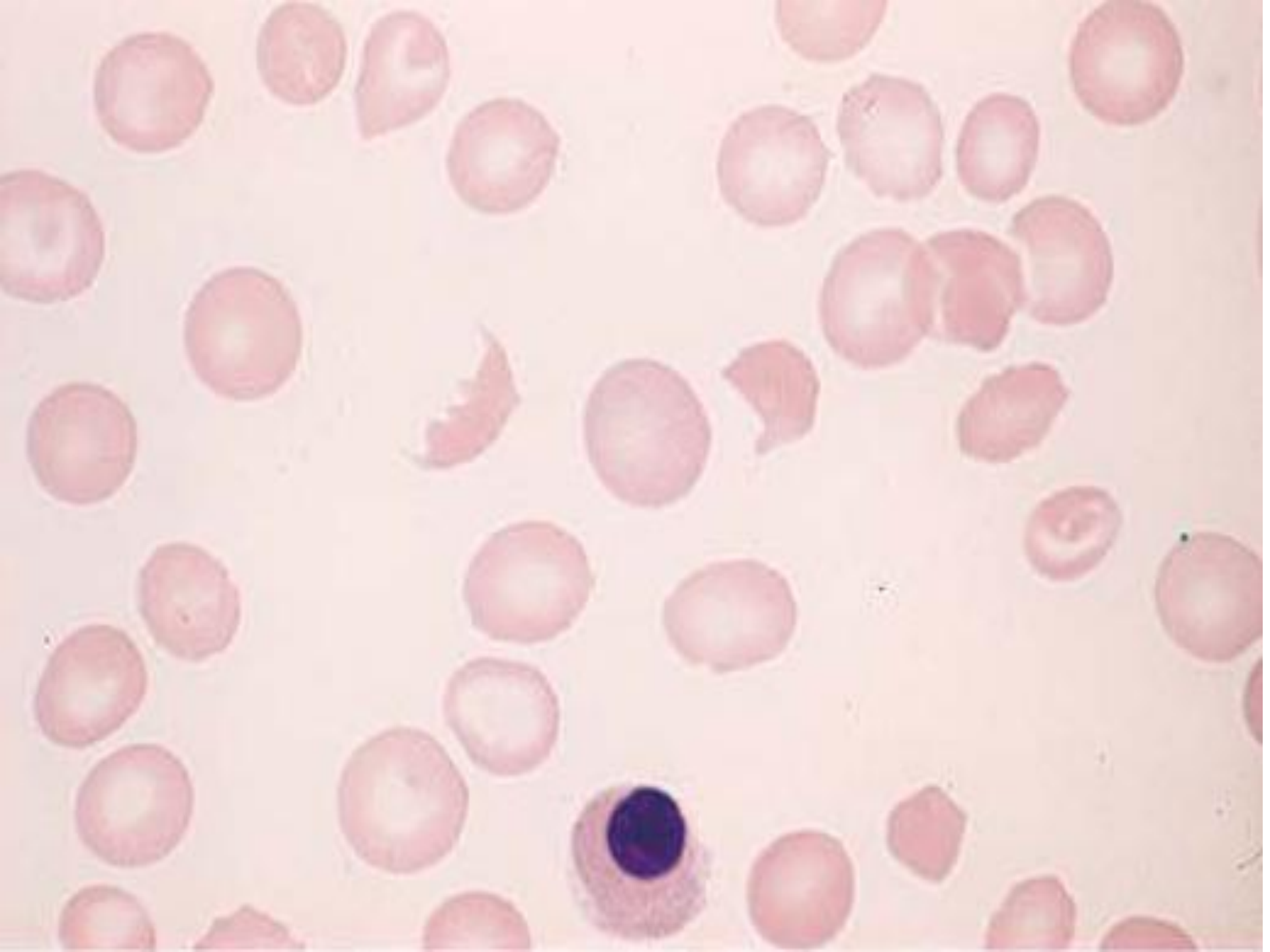
Sickling test with sodium metabisulfite in Hb S disease





Stomatocytes

- Stomatocytes have a slitlike central lucency.
- They are found in the very rare hereditary stomatocytosis and in other anemias



Schistocytes

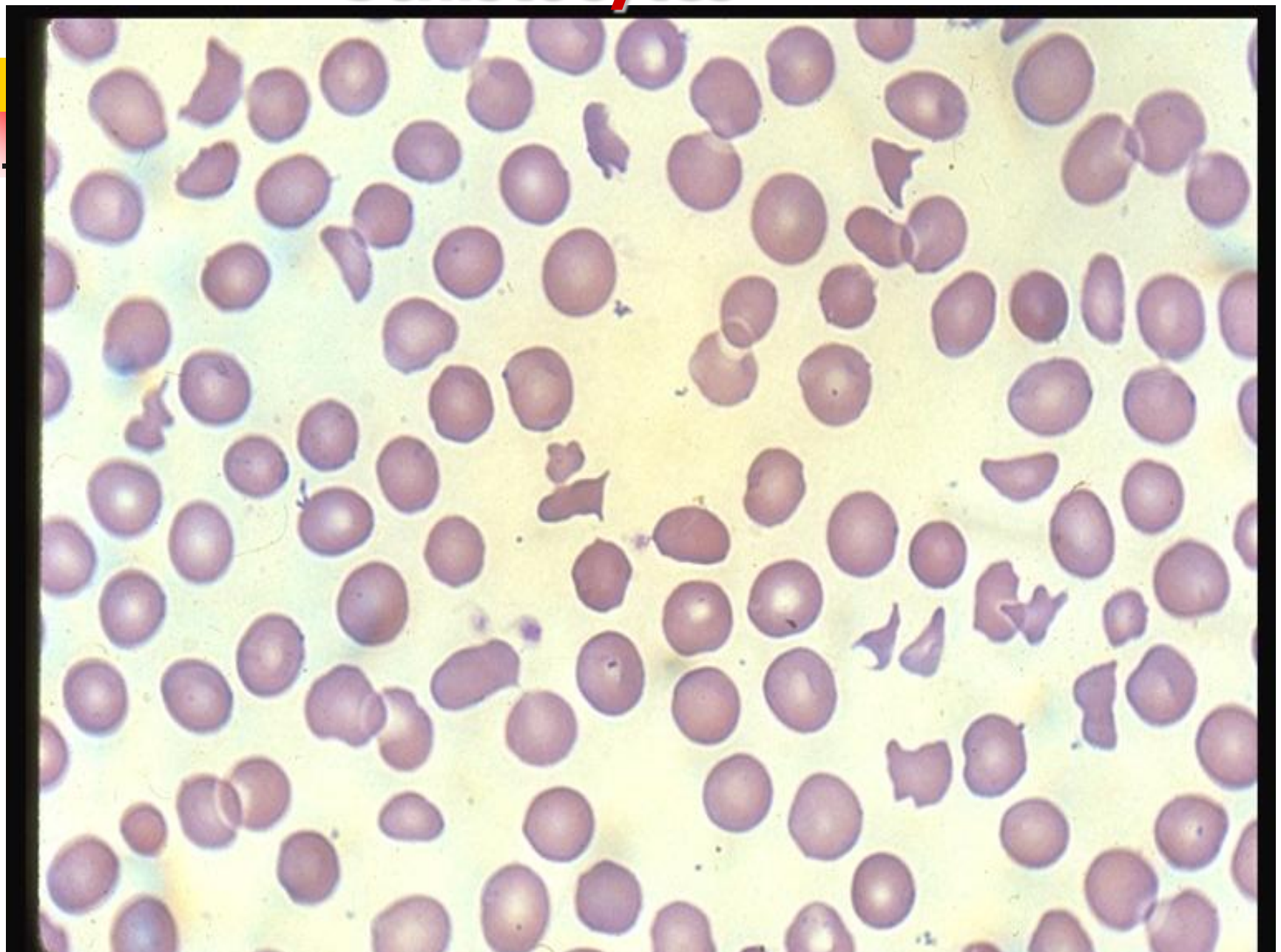
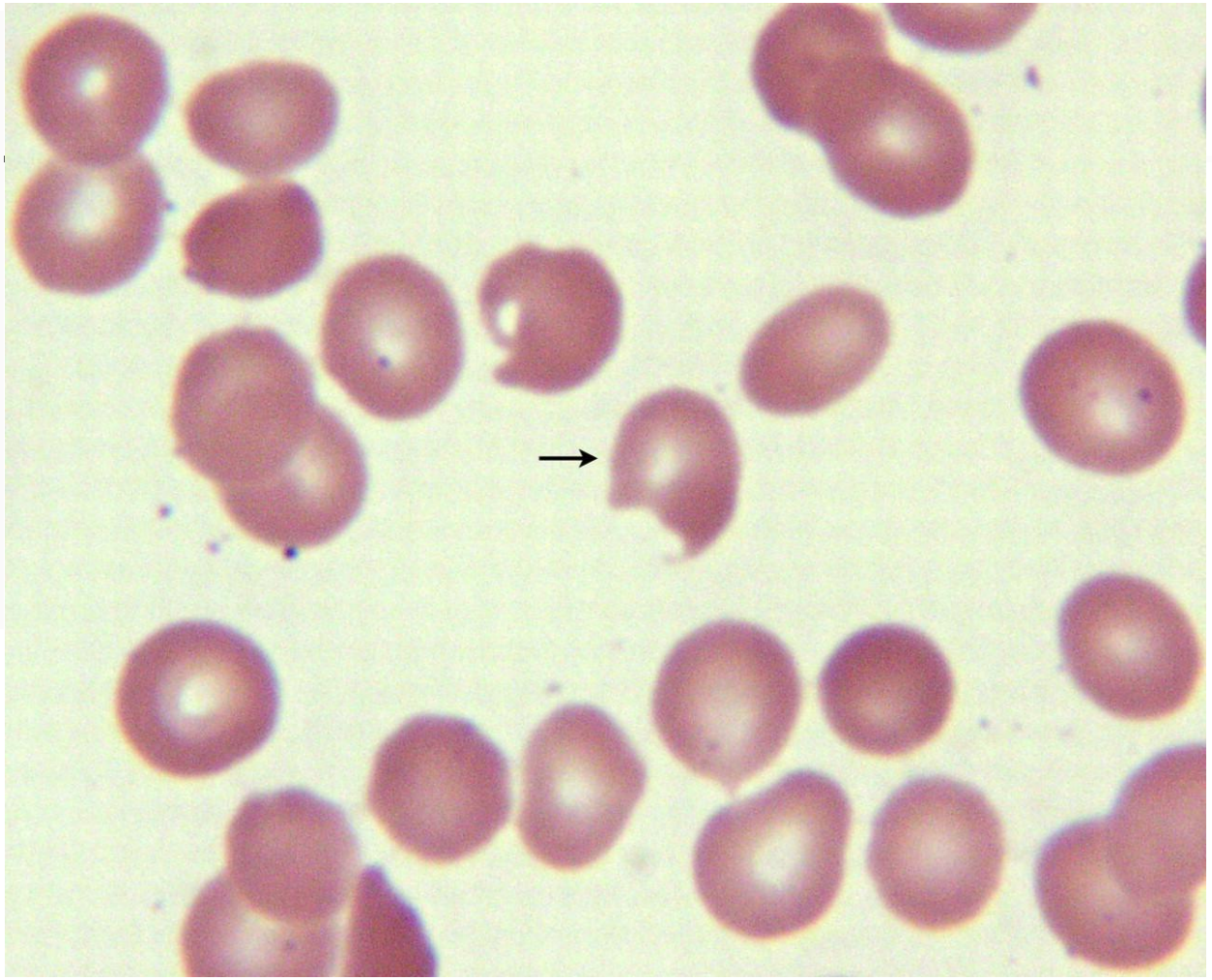


Figure 1. The RBC deformity (arrow) shown in this image is referred to as a "bite" cell

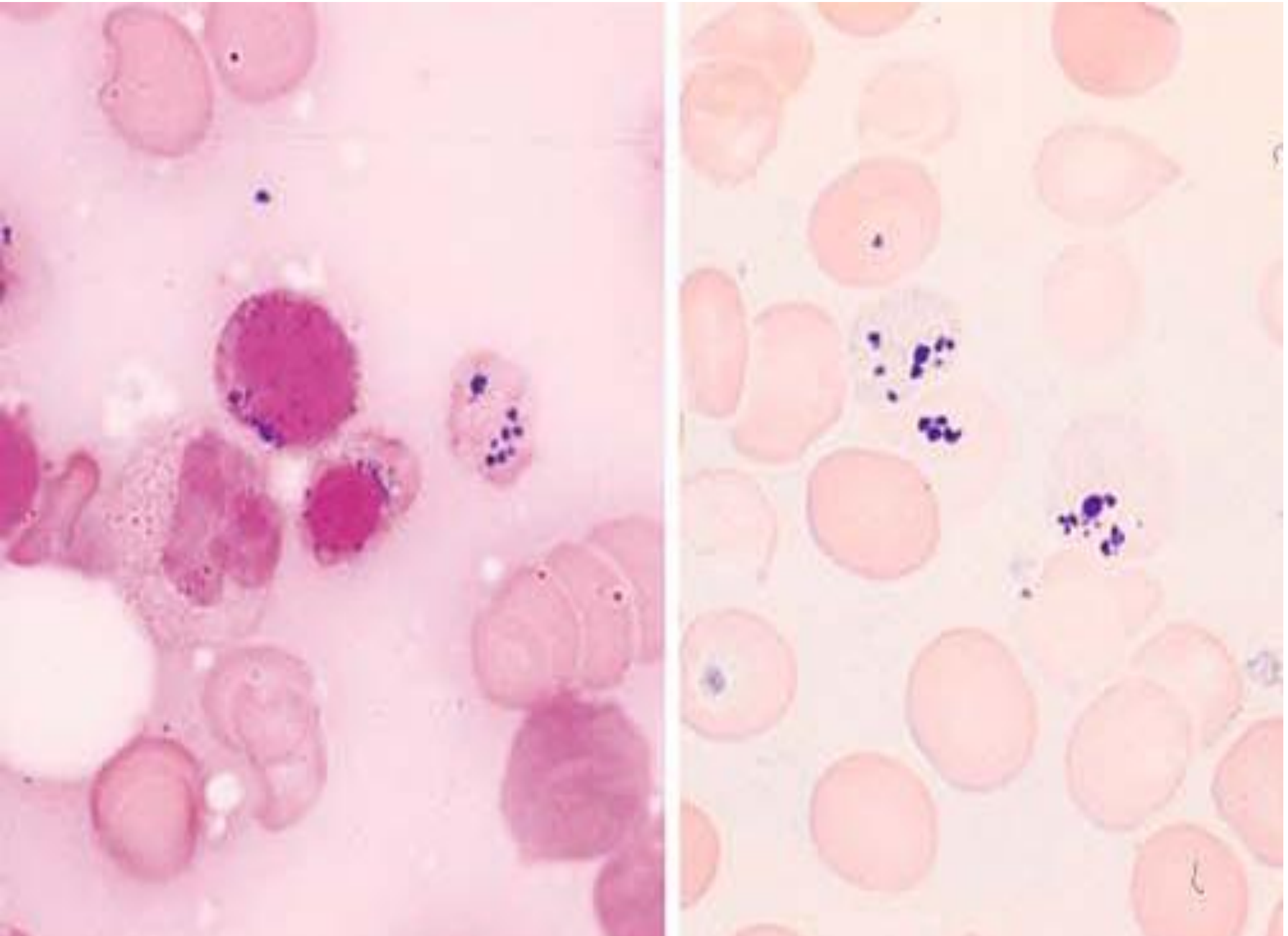


Lazarchick, J. ASH Image Bank 2008;2008:8-00151

Copyright ©2008 American Society of Hematology. Copyright restrictions may apply.

Schizocytes (fragmentocytes)

- Schizocytes (fragmentocytes) result from the fragmentation of erythrocytes, consisting either of a fragmented red cell or a fragment detached from such a cell.
- They resemble bits of broken egg shell. They may be caused by increased mechanical hemolysis (turbulence from artificial heart valves) or by increased intravascular coagulation (e.g., in hemolytic uremic syndrome) as fast-flowing red cells are sliced apart by fibrin filaments



Siderocytes

Siderocytes are erythrocytes that contain iron granules detectable with iron staining.

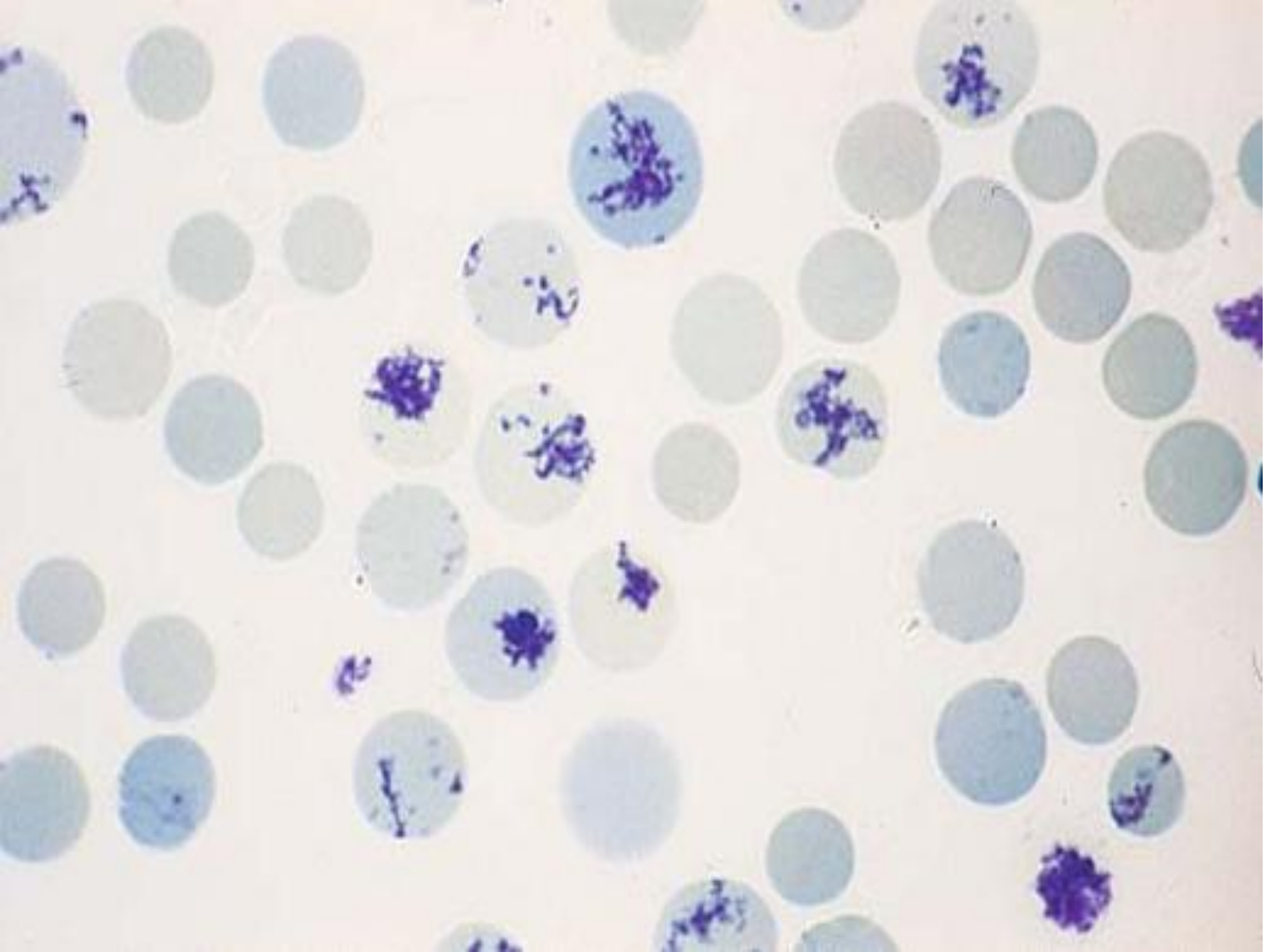
They are a common feature of severe hemolytic anemias, lead poisoning, and pernicious anemia.

Siderocytes containing coarse iron granules,which may encircle the nucleus are pathognomonic for sideroachrestic anemias.

Normal blood contains 0.5– l siderocyte per 1000 red cells.

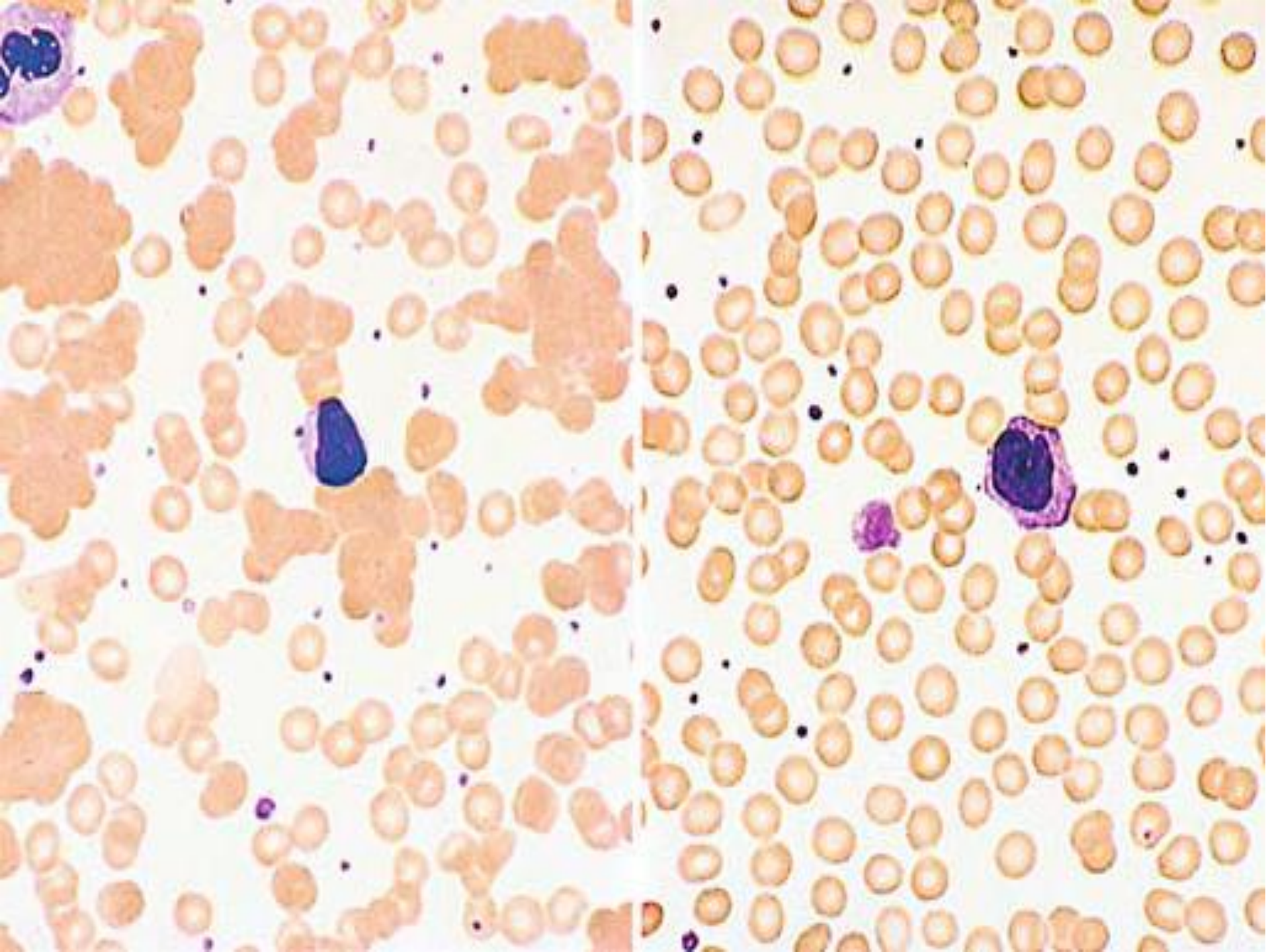
Left: At the center is a siderocyte containing several large iron granules and two sideroblasts also containing coarse iron granules, which normally are very small and difficult to see.

Right: At the center are three erythrocytes with numerous gray-violet granules that contain iron (Pappenheimer bodies). This is a clear-cut pathologic finding that is rarely observed



Reticulocytes

- Reticulocytes in various stages of maturity.
- The more filamentous reticula are characteristic of younger cells (brilliant cresyl blue stain,



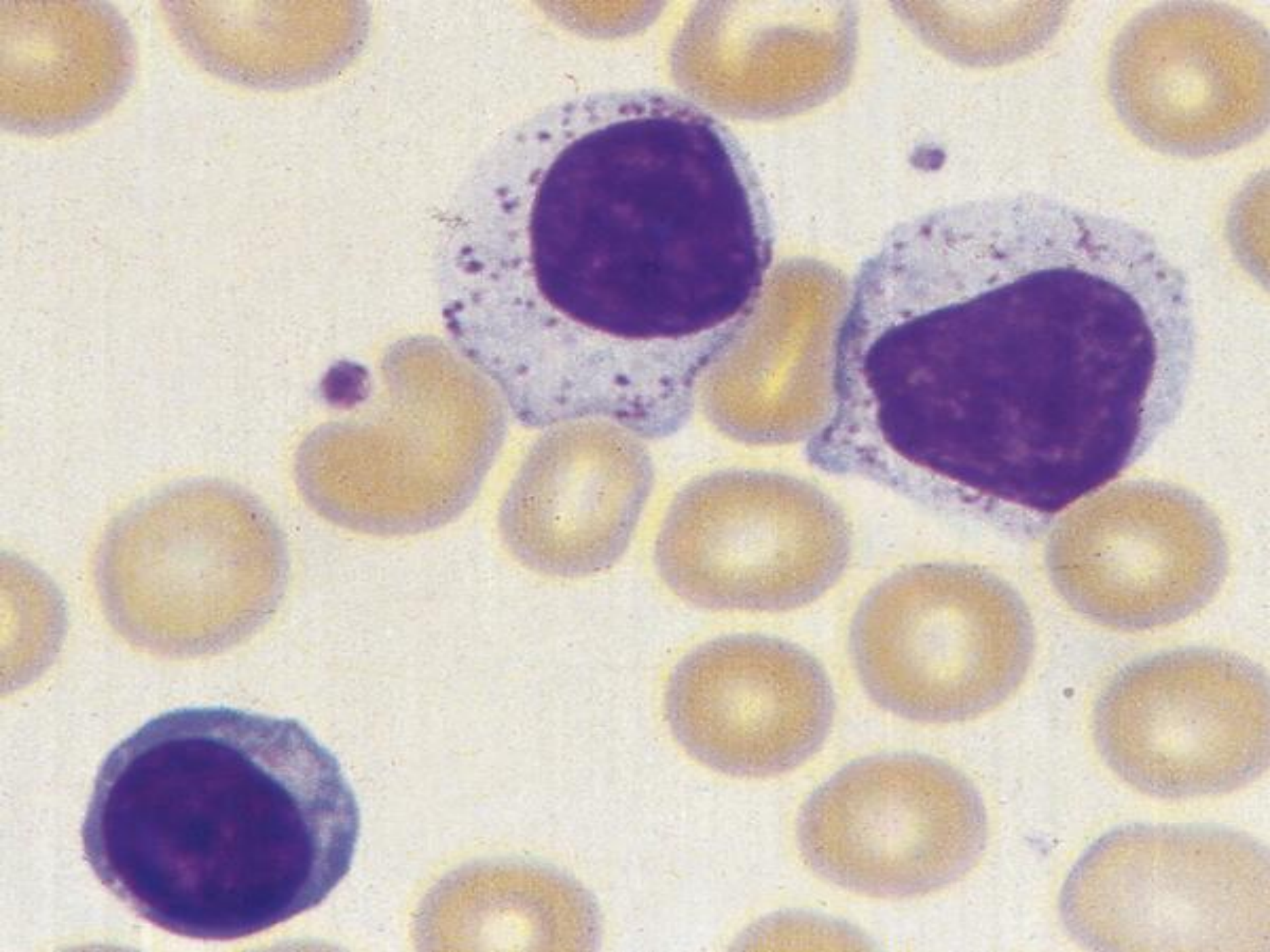
Cold agglutinin disease,

peripheral blood.

Left: smear on a coldslide;

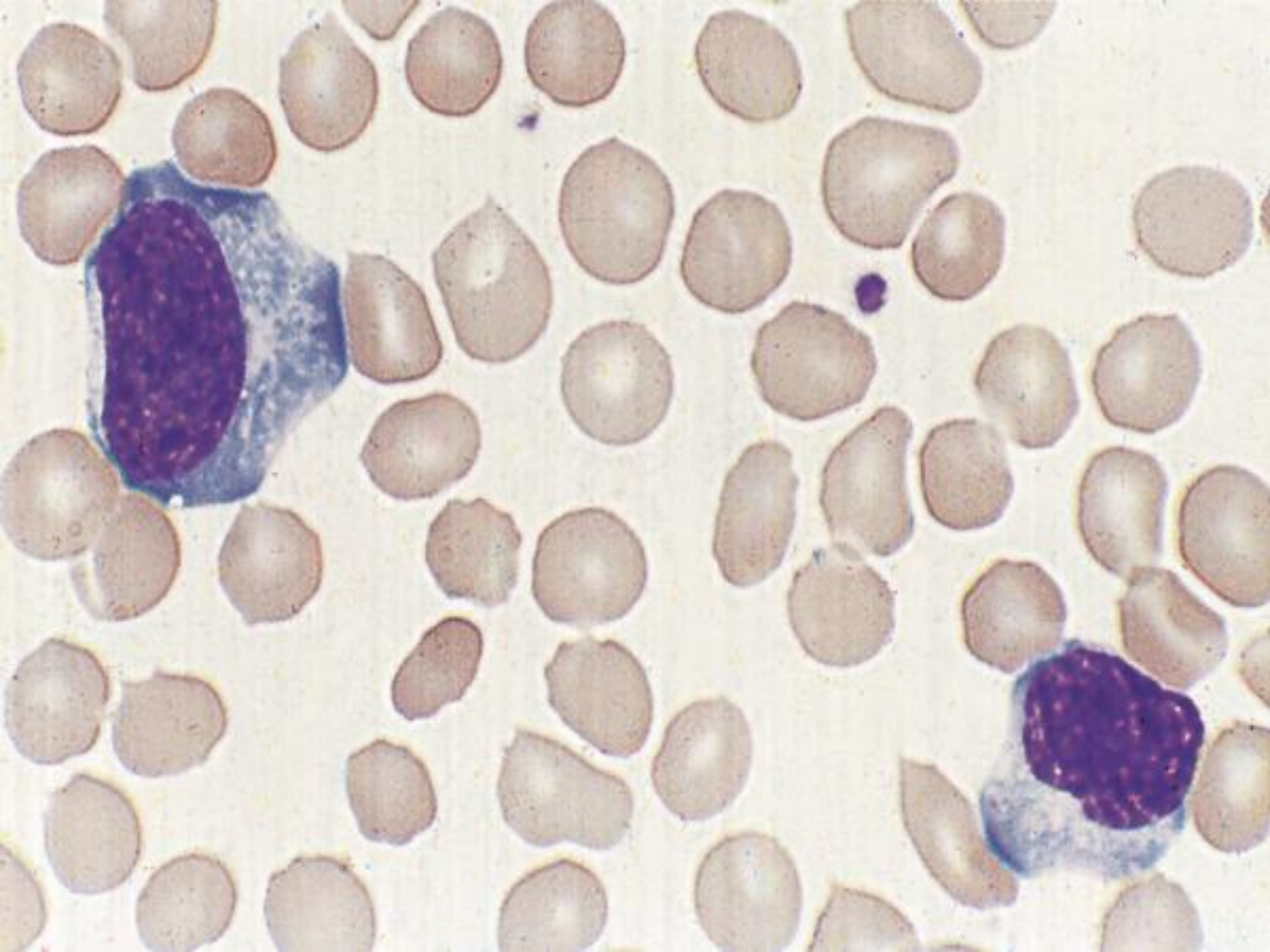
right: smear on a warm slide

- مرفولوژی گلبول های سفید



a small lymphocyte and two large granular lymphocytes with azurophilic granules.

- لنفوسیت های بزرگ گرانولرLGL (سایز بزرگتر از نوتروفیل با گرانول های آزور درشت و سیتوپلاسم کم رنگ و حاشیه دندانه دار اطراف سلول که تحت اثر فشار سلول های مجاور حاصل می گردد (وجه افتراق لنفوسیت بزرگ از منوسیت)
- تعداد نرمال LGL: کمتر از ۶% کل دیف (کل سلول ها) / کمتر از ۱۰% لنفوسیت ها . این سلول ها به طور نرمال در کودکان بیشتر از بزرگسالان دیده می شود و کمتر از ۶% ارزش گزارش ندارند .این لنفوسیت ها بیشتر در عفونت های ویرال مشاهده می شوند .
- لنفوسیت های واریانت نام جدید لنفوسیت های اتیپیکال یا داونی یا راکتیو می باشد .



activated lymphocytes /atypical mononuclear cells
reactive or downy cell
variant lymphocyte

لنفوسیت های واریانت فرم مانند لنفوسیت های بزرگ گرانولر به طور نرمال تا ۶% در خون محیطی مشاهده می گردد که عمدتا سیتوپلاسم کف آلود و واکوئیلیزه دارند و گاها سیتوپلاسم بازوفیلیک دارند

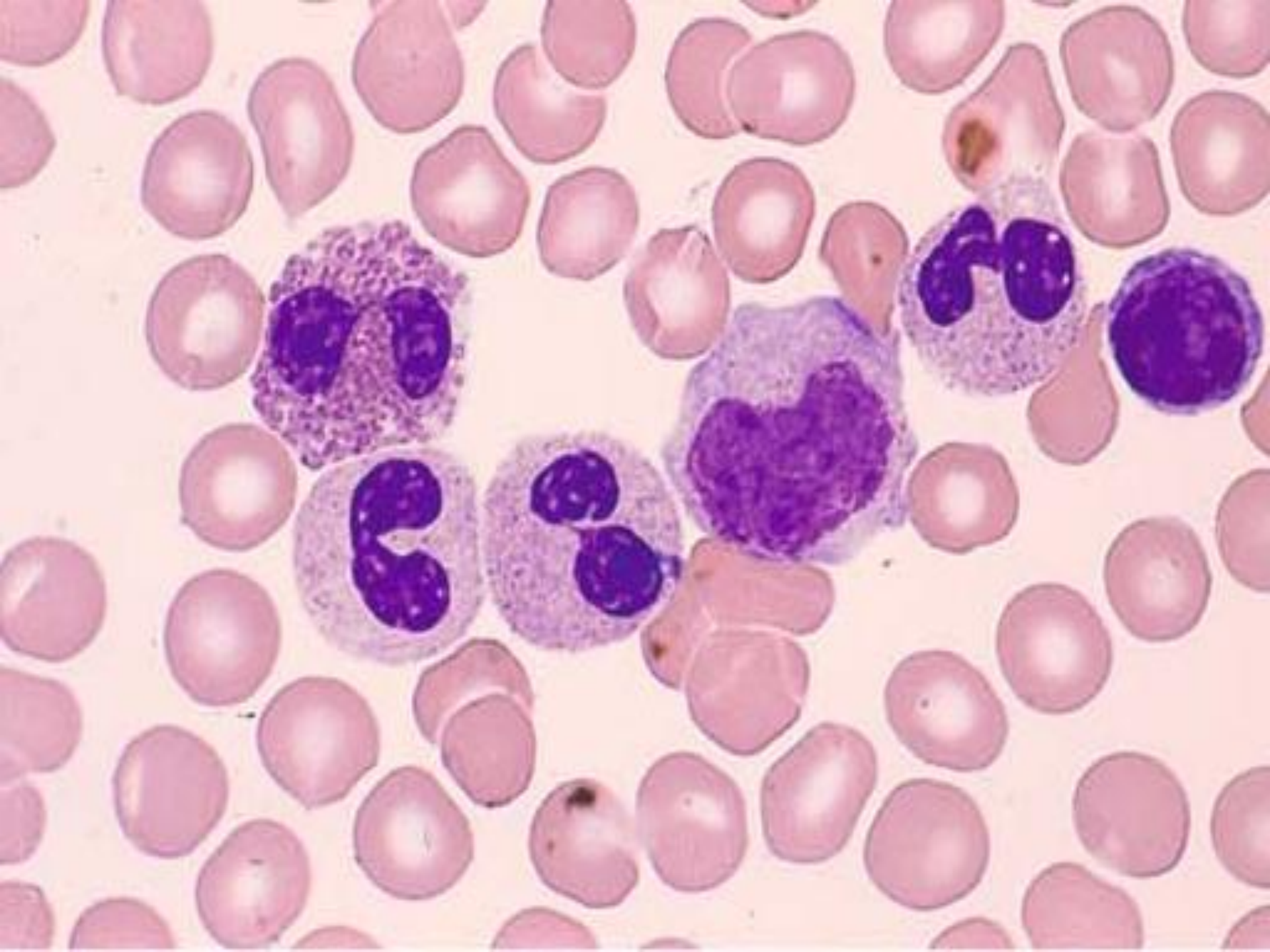
لنفوسیت های واریانت حتی اگر به میزان کمتر از ۶% موجود باشد بایستی گزارش شود چون ممکن است اوایل بیماری ویرال باشد

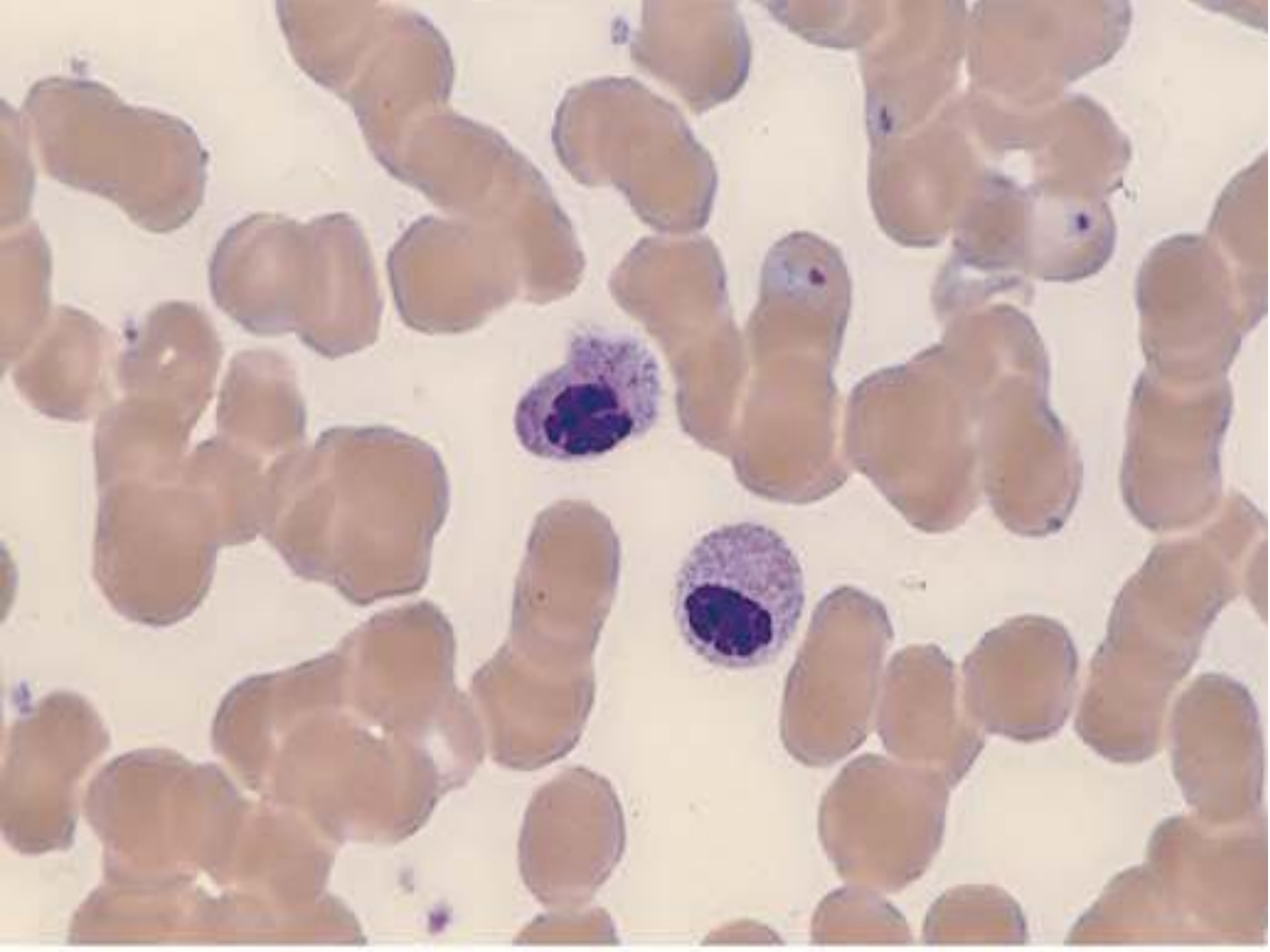
(Variant lymph / less than 6%)

Megaloblastic anaemia. Shows macrocytes, .oval macrocytes, and a hypersegmented neutrophil

محاسبه اندکس سگمنت نوتروفیل

- تعداد سگمنت ۵۰۰ الی ۱۰۰۰ نوتروفیل را شمارش نموده سپس با تناسب میانگین سگمنت در یک سلول را در آورده که اگر از عدد ۴,۵ بالاتر باشد تایید کننده هیپر سگمانتاسیون است .
- اگر یک نوتروفیل با ۶ لوب یا بیشتر نیز مشاهده گردد ارزش گزارش هیپر سگمانتاسیون و بررسی های بعدی جهت آنمی مگالوبلاستیک وجود دارد . (حتی با MCV نرمال)





Pelger-Huet Anomaly

This is an inherited anomaly involving the nuclei of granulocytes. The heterozygous form predominates in man while the homozygous form, characterized by small round or oval nuclei is extremely rare.

The nucleus of neutrophils is indented and resembles the band form, giving rise to a "pseudoregenerative" white blood picture.

When nuclear segmentation (lobulation) occurs,the neutrophils acquire two nuclear lobes and rarely three. These lobes are exceptionally short, thick, and chromatin-rich.

Pelger myelocytes and band forms also have very coarse,clumped nuclei rich in chromatin.

The patient is classified as a full carrier if all neutrophils are affected by the anomaly and a partial carrier if normal band and segmented forms are also present.

The Pelger-Huet anomaly is harmless in its effect on leukocyte function. Severe infections and particularly myelodysplasias, acute myeloid leukemia, and advanced chronic myeloid leukemia can produce transient, qualitatively similar changes in white cell nuclei, creating what is known as "pseudo Pelger-Huet forms."

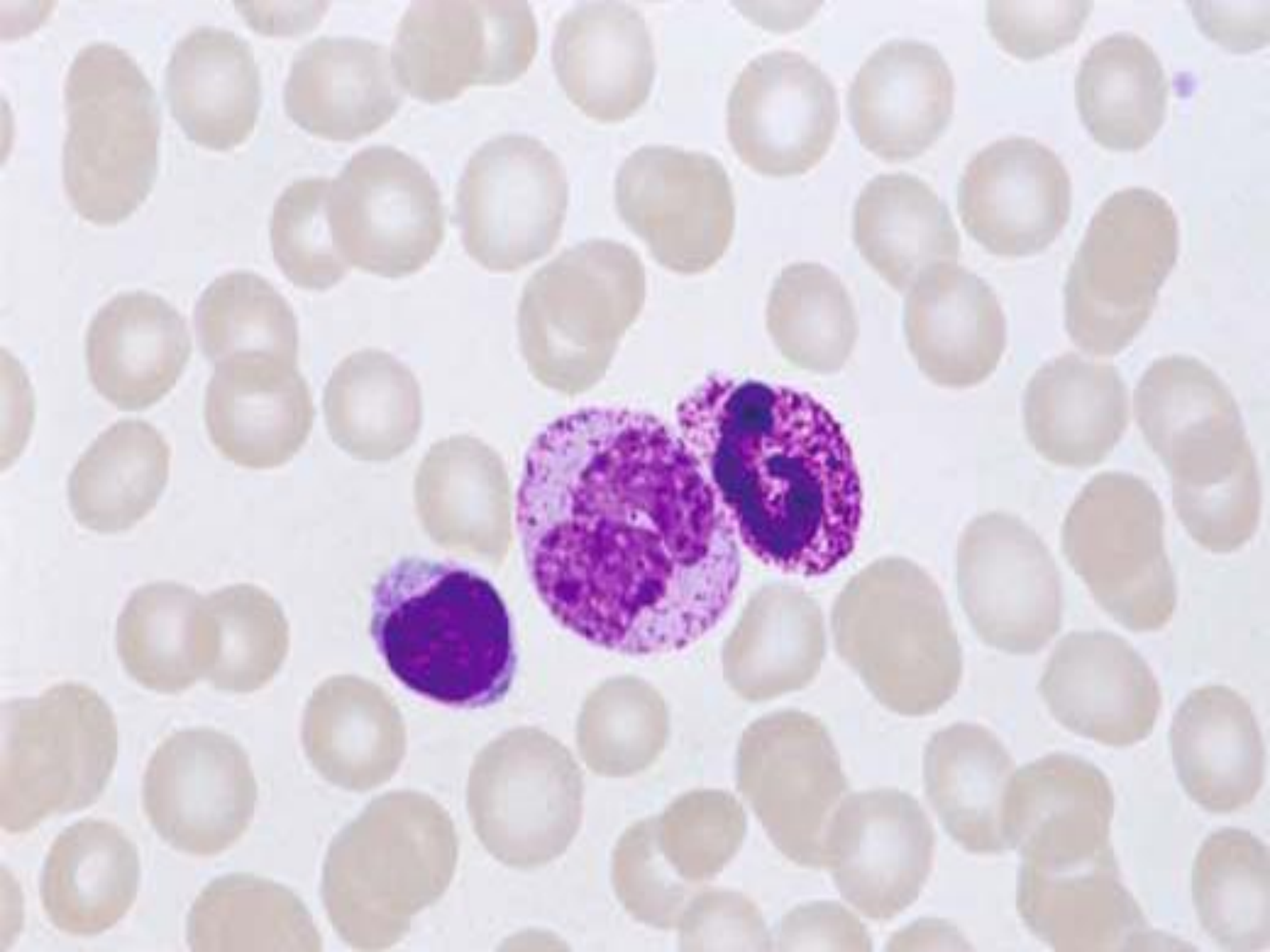
Pelger-Huet Anomaly report

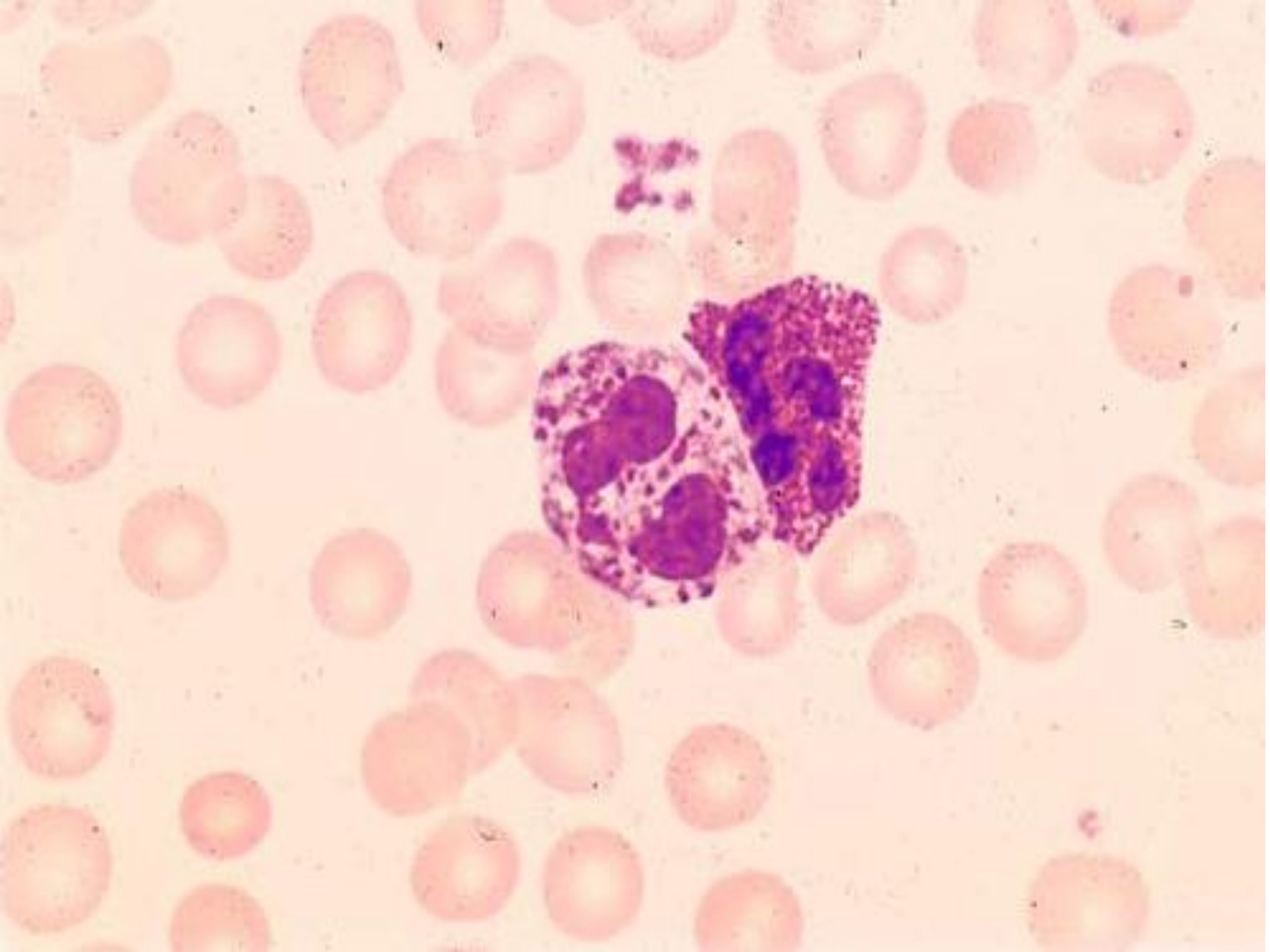
The majority of neutrophils are bilobed.

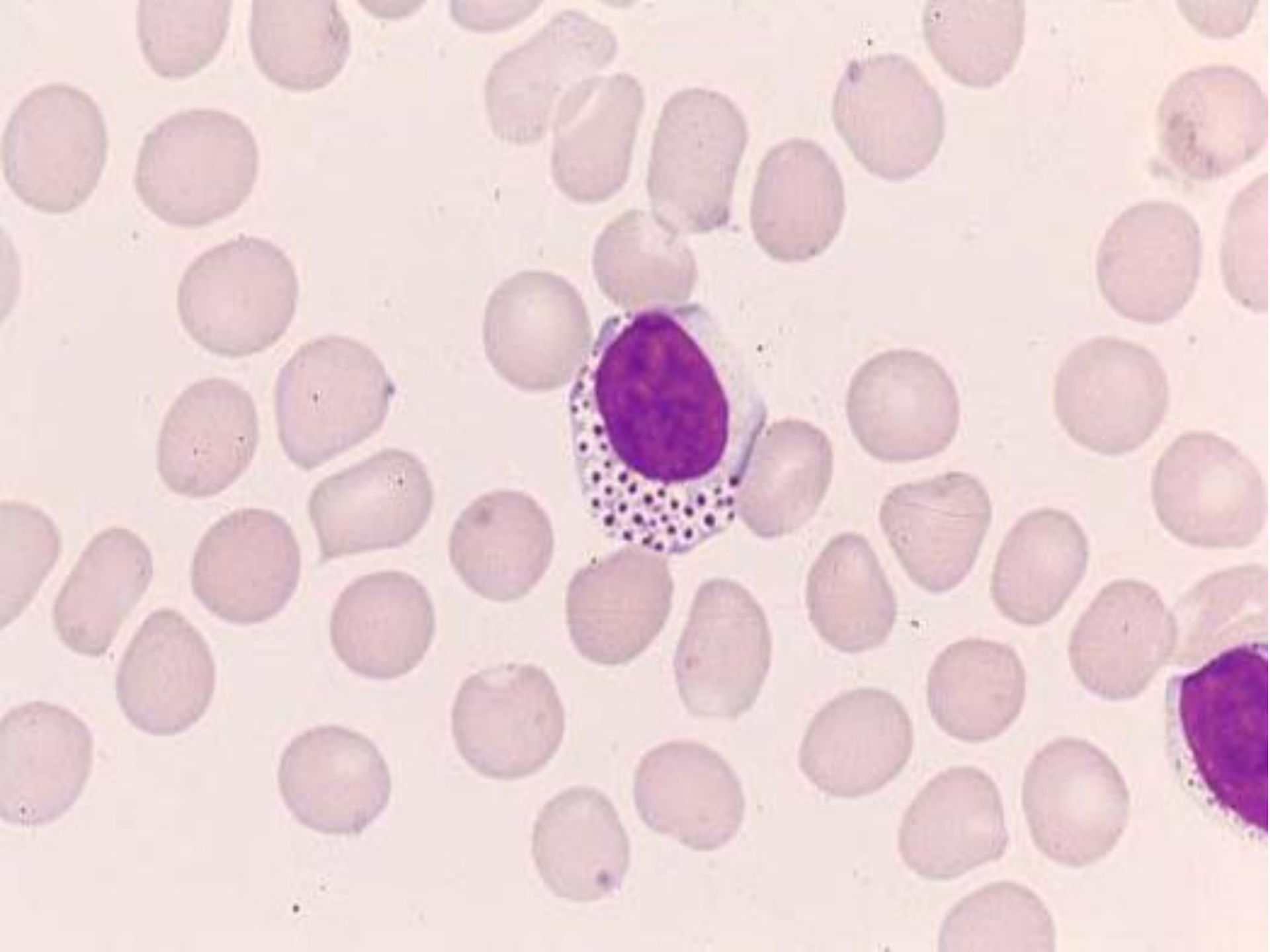
Neutrophilic Hyposegmentation seen

در پلگر هیوت ارثی عملکرد نوتروفیل ها نرمال بوده و همه رده های سلولی درگیر می باشند در حالی که در سودو پلگر هیوت اکتسابی که ناشی از عفونت است با رفع عفونت حالت هیپو سگمانتاسیون برطرف شده و صرفا نوتروفیل ها درگیر می باشند .

سودو پلگر هیوت بیشتر در عفونت های شدید و لوسمی میلوئید مزمن و لوسمی های حاد و متاپلازی میلوئید و میلودیسپلاستیک سندرم انمی فانکونی و منو نوکلئوز عفونی دیده می شود .







Alder-Reilly Anomaly

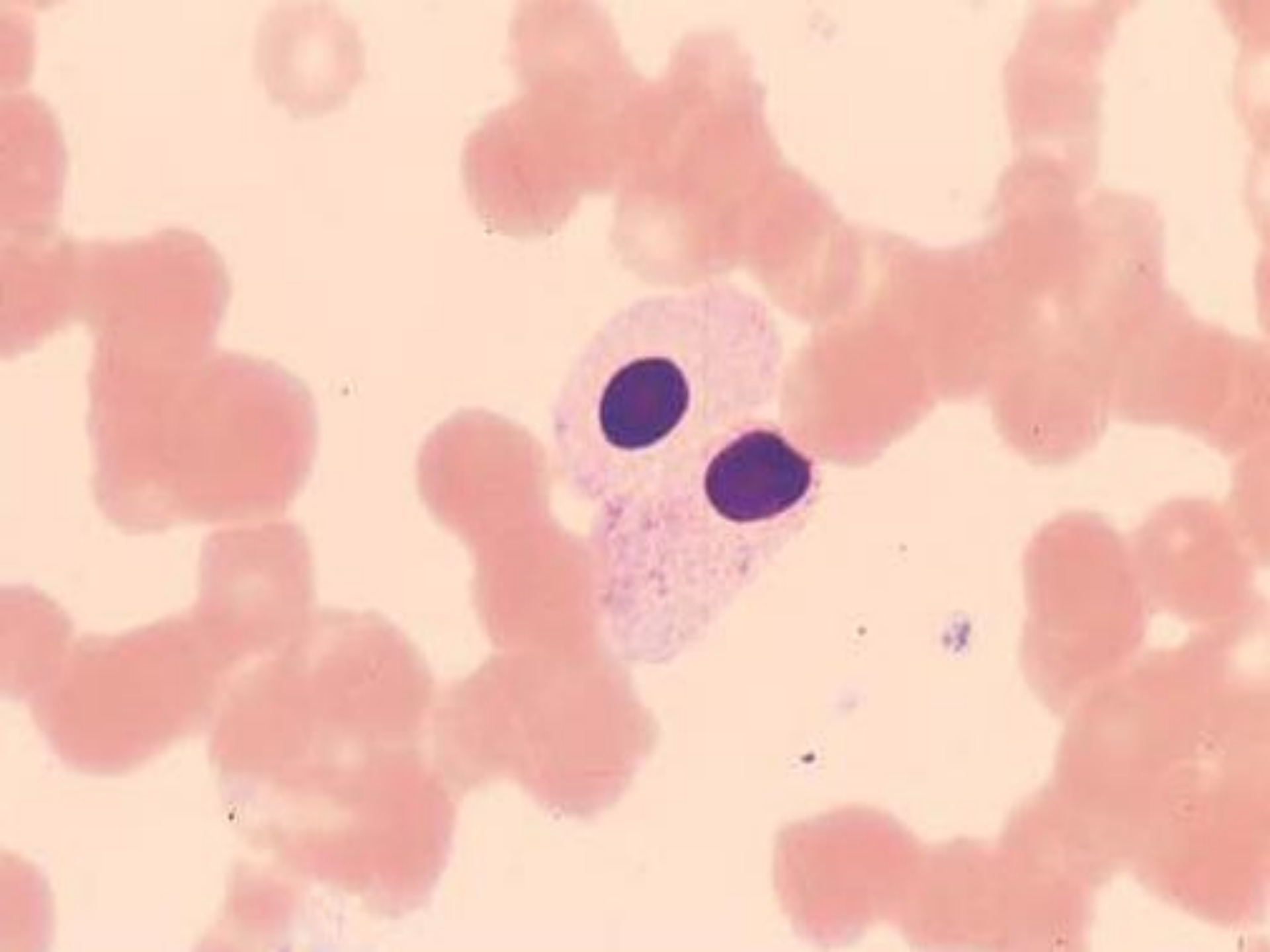
Here the granulocytes contain large, bluish granules that often resemble those of promyelocytes;monocytes have large granules, too.

The abnormal granulation is especially marked in eosinophils,which appear basophilic rather than eosinophilic

The lymphocytes also contain particularly large azurophilic granules .

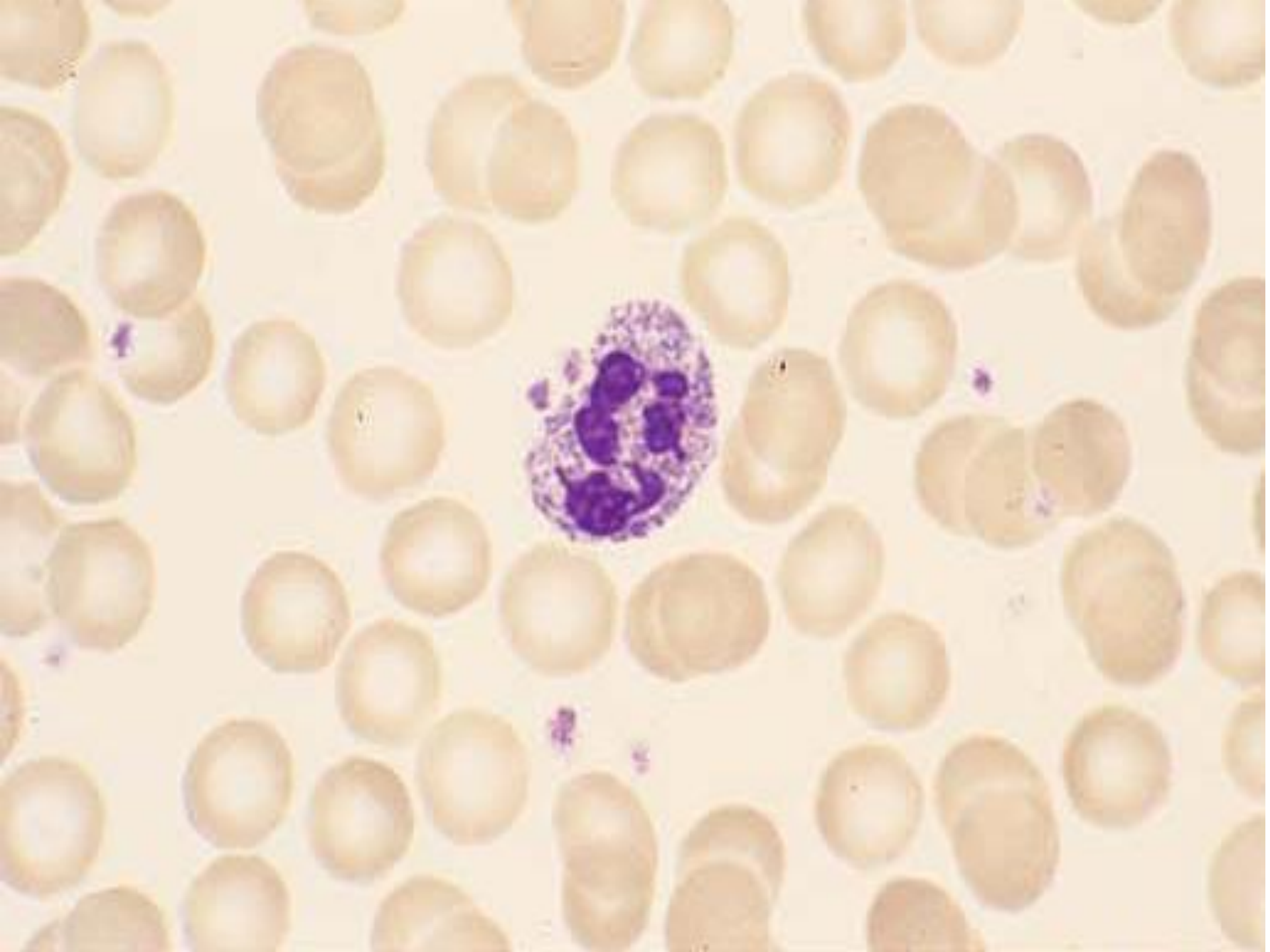
Carriers of this anomaly frequently have associated bone and joint deformities (gargoylism).

The anomaly is known to occur in mucopolysaccharidosis VI and VII.



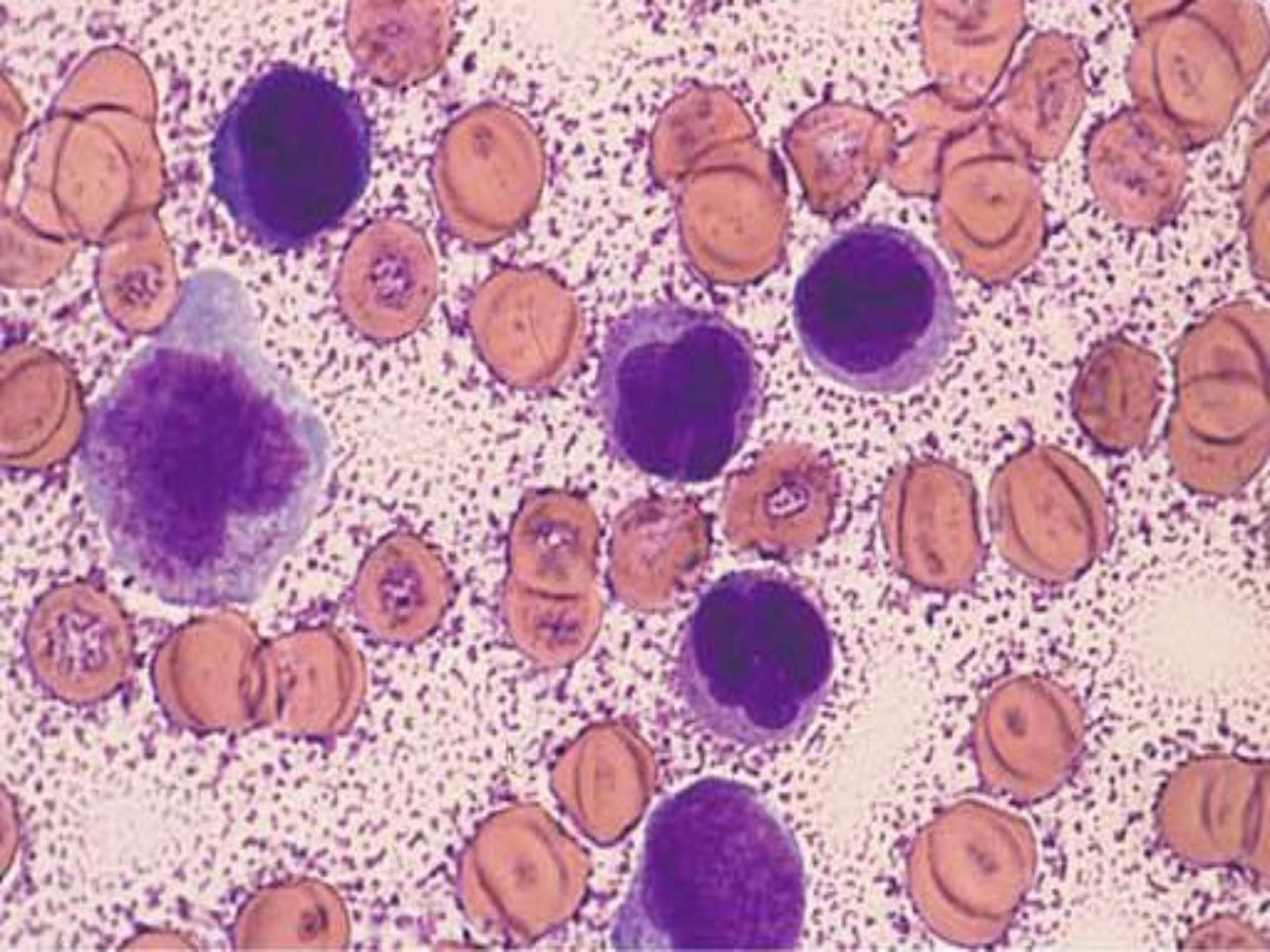
degenerate leukocyte forms

- degenerate leukocyte forms may be found in the peripheral blood of patients exposed to certain irritants. They are more commonly seen in smears prepared from long-stored blood previously treated with EDTA or citrate solution.
- Most of these cells have the same diameter as segmented forms, but many are considerably smaller (4– 8 m). Usually their cytoplasm is slightly more basophilic than in segmented forms,
- and their granules are coarser and often smudged.
- Pronounced nuclear pyknosis is typical, and 3–5 solid, featureless nuclear remnants may be found scattered like droplets in the cytoplasm.
- There are few if any filaments interconnecting
- the nuclear remnants



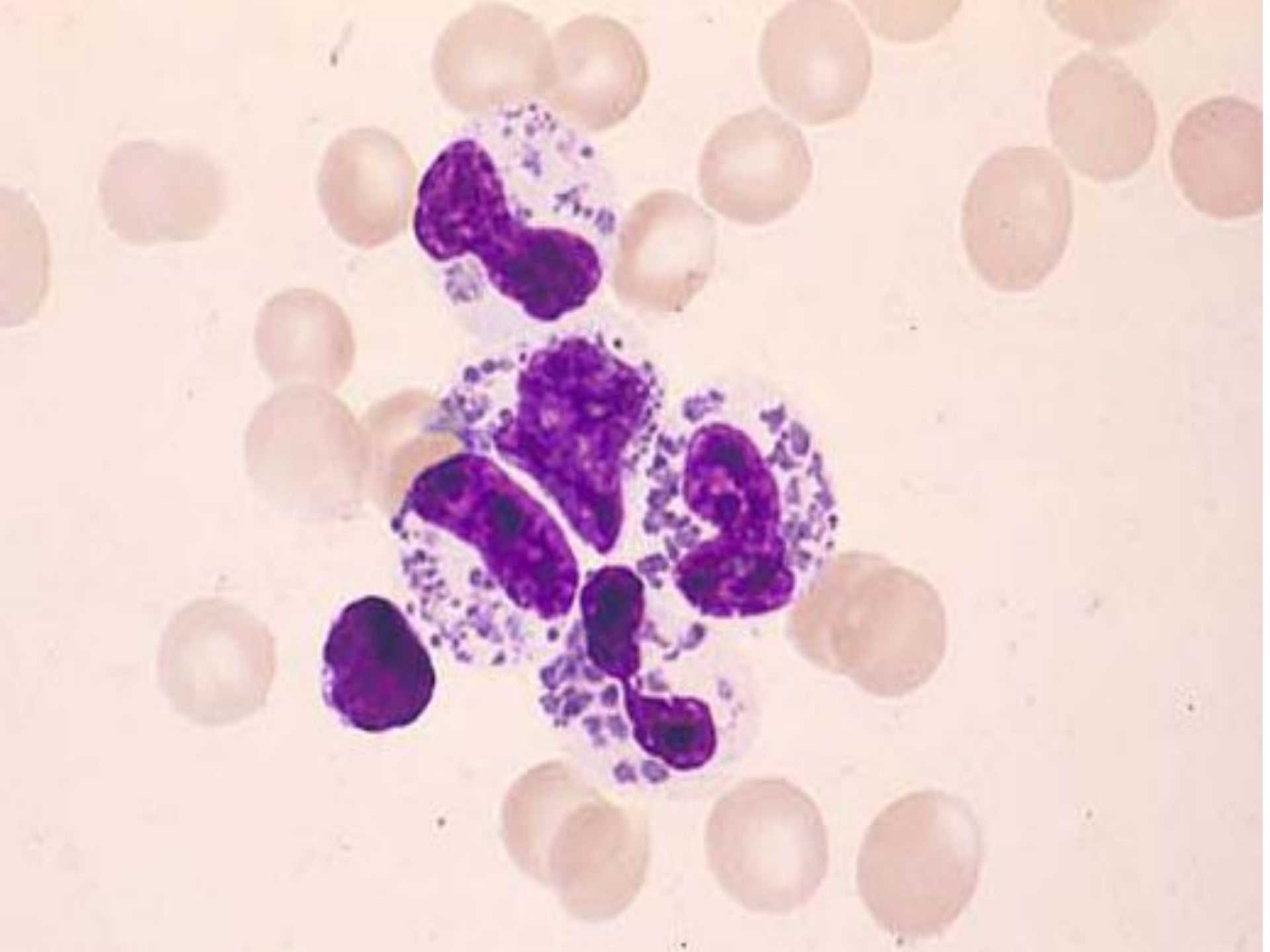
toxic granulation

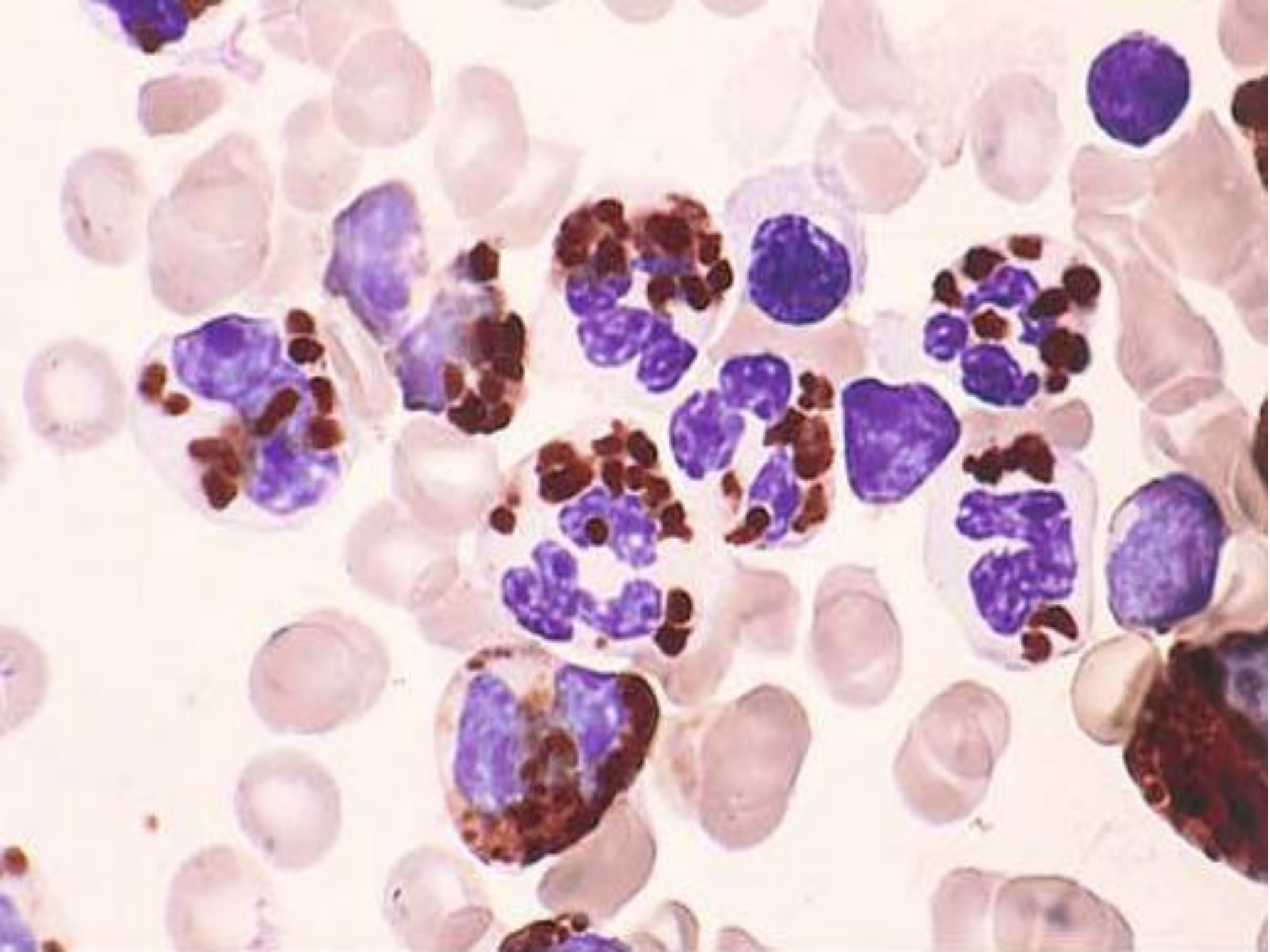
- In cases of severe infection or bone marrow injury, it is common to find large purple granules in the myelocytes and in more mature stages up to the segmented forms.
- Often they are similar to the granules seen in promyelocytes, and many authors consider them to be identical.
- This “toxic granulation” is variable in its intensity.
- In very pronounced cases the neutrophils may come to resemble basophilic granulocytes

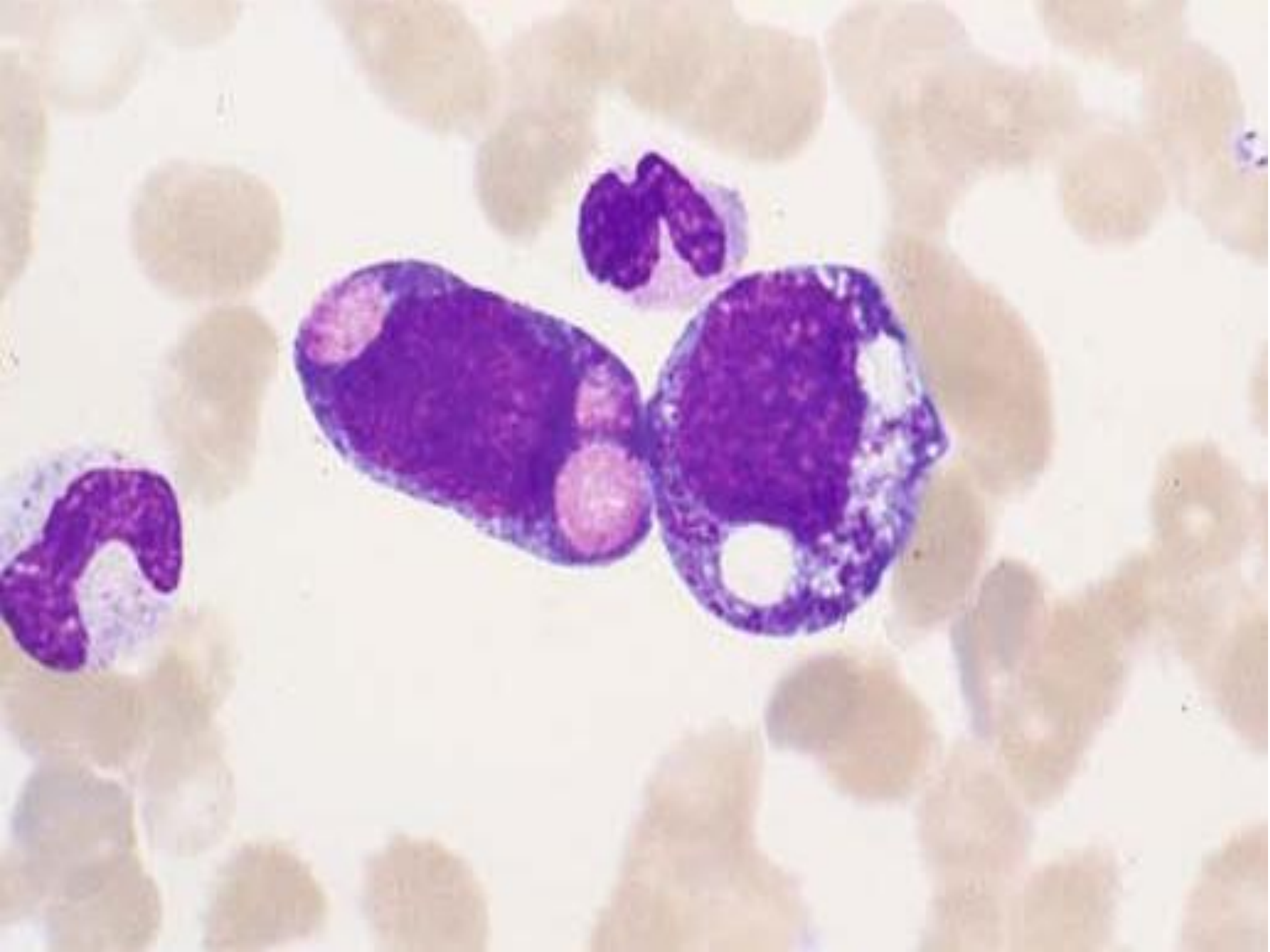


Heparin artifact

Heparin artifact. Adding heparin to peripheral blood or especially bone marrow before preparing smears leads to artifacts when a panoptic stain is used (Giemsa or Pappenheim): the cells show scant or atypical staining, and a purple, crumbly precipitate forms on the background, making it difficult or impossible to identify the cells

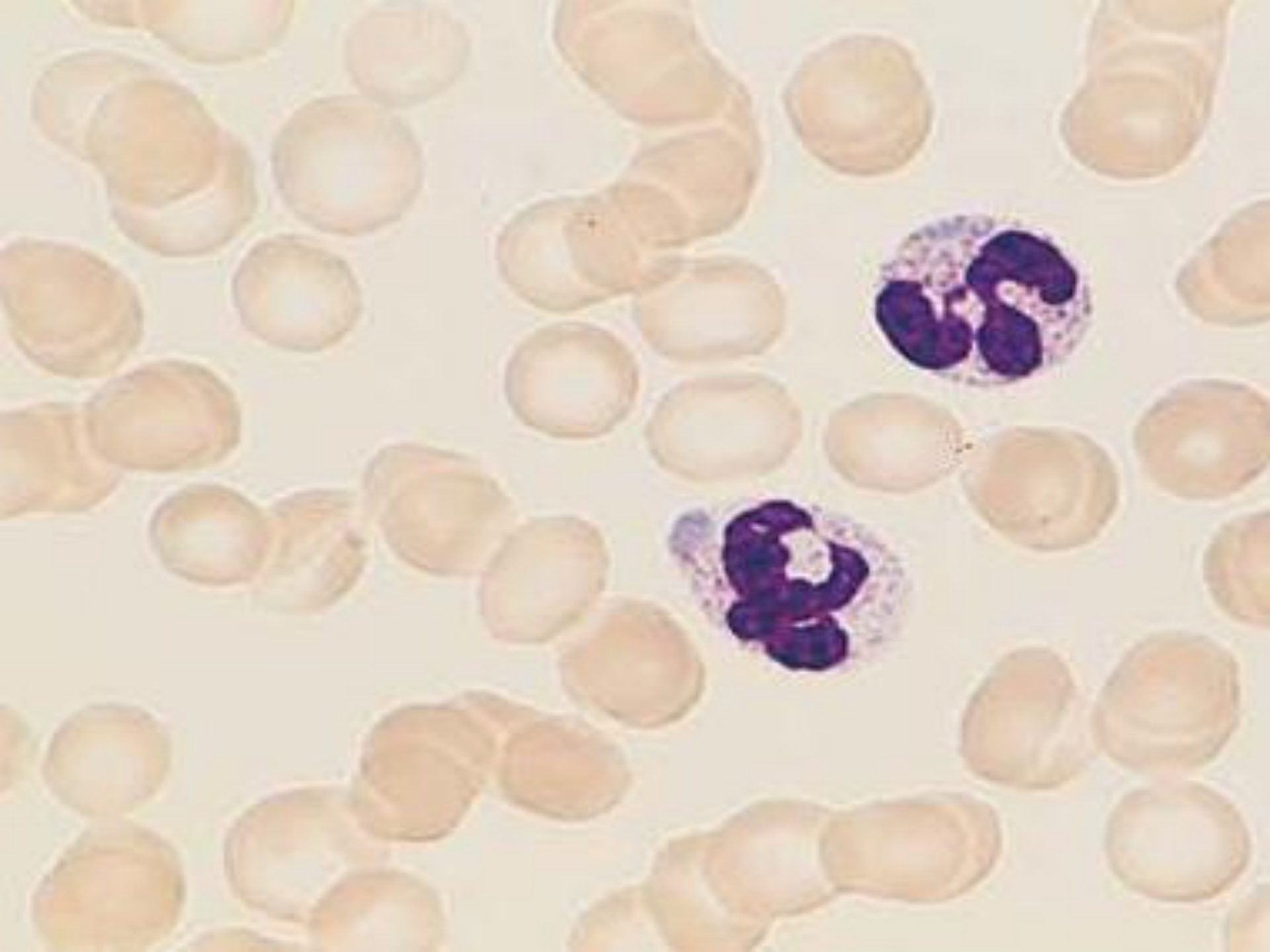


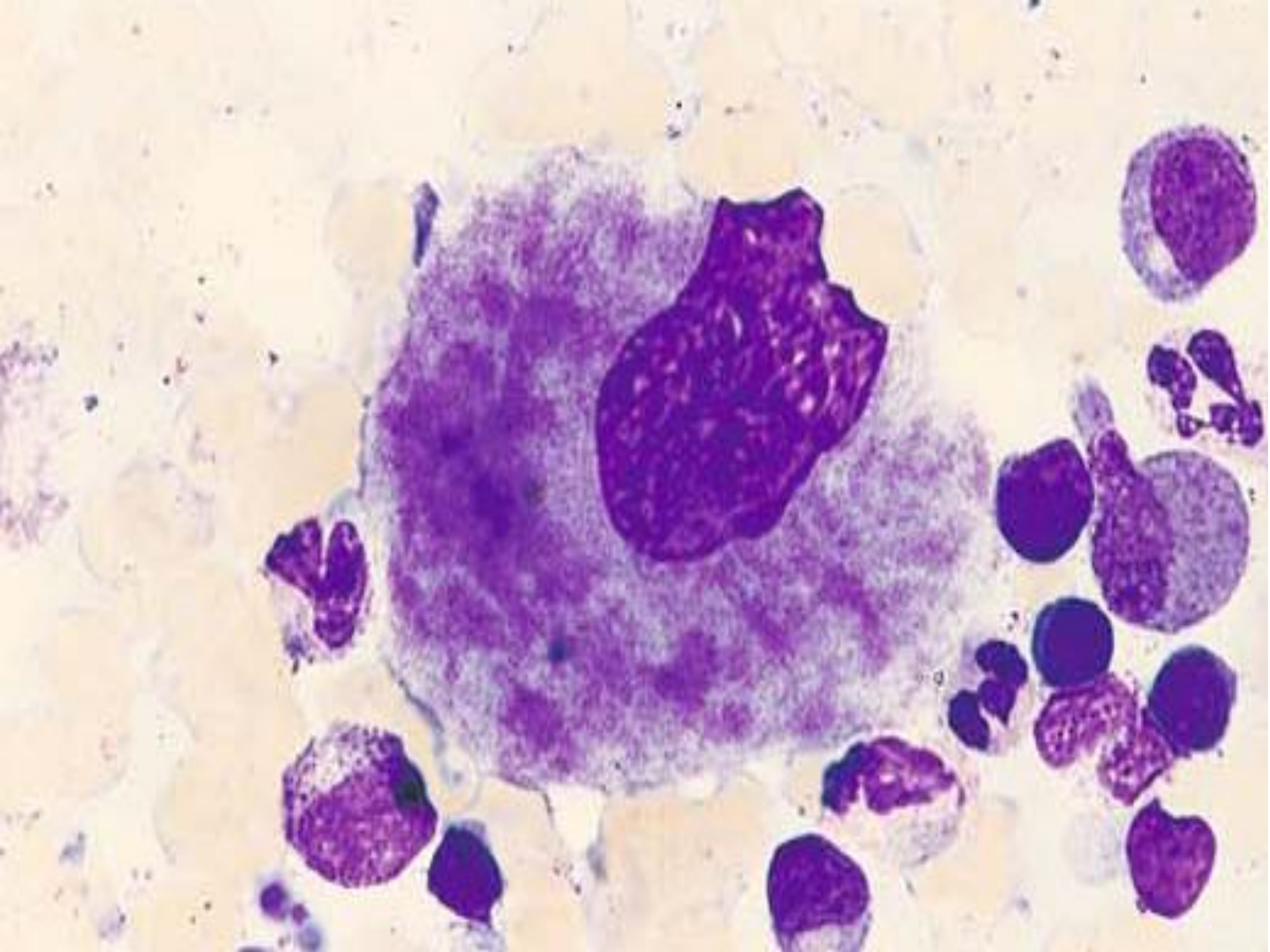




Chediak-Higashi Anomaly (Granular Gigantism of Leukocytes)

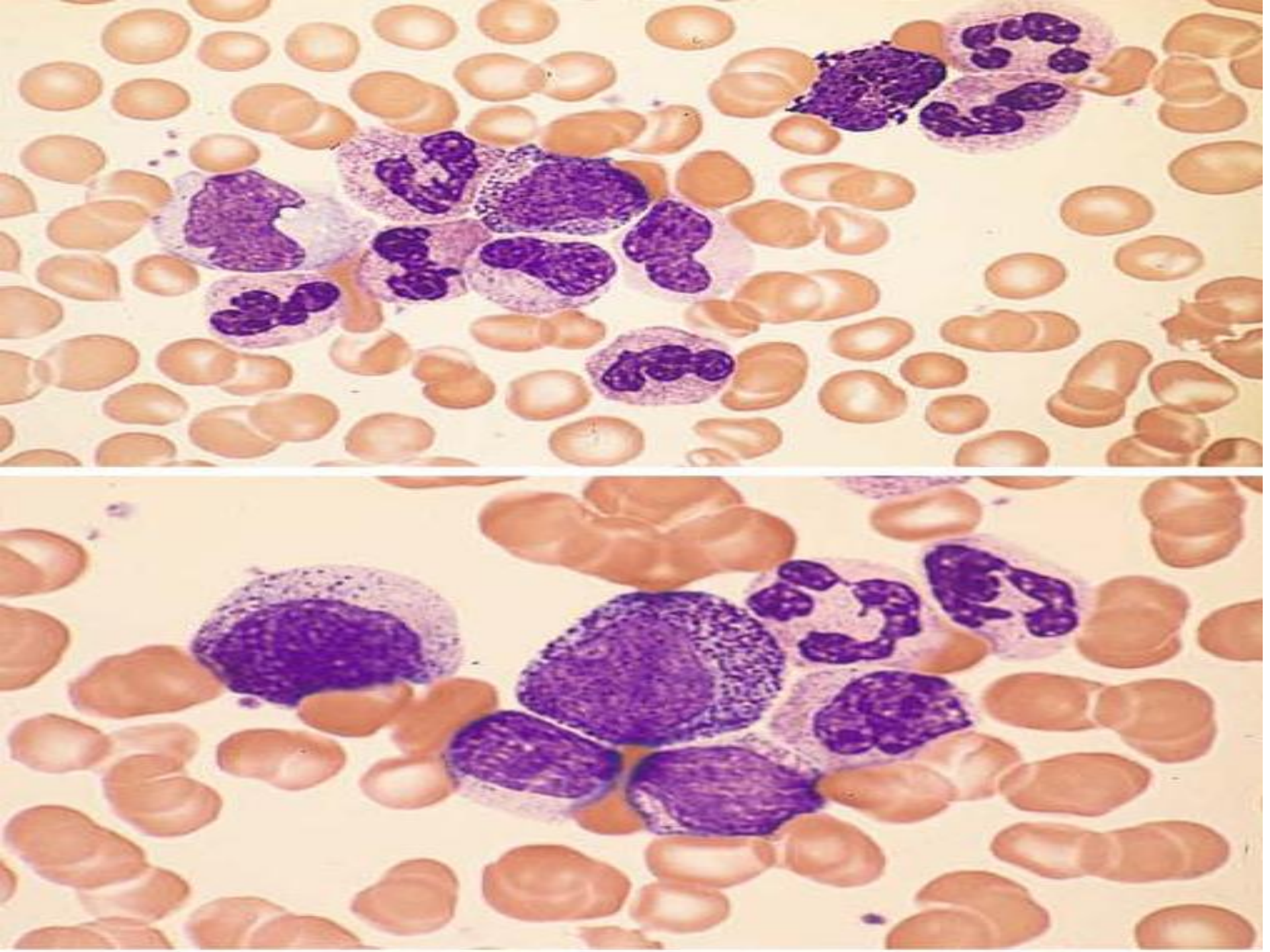
- Chediak-Higashi Anomaly (Granular Gigantism of Leukocytes) This condition affects virtually all leukocytes. The neutrophils contain irregular, grayish-blue cytoplasmic inclusions 1– 3 m in diameter. These bodies are sharply demarcated and contain peroxidase and also CE in some cases, identifying them as primary granules.The granules of eosinophilic leukocytes are also enlarged to 2 – 3 times the size of normal eosinophilic granules.
- They are round to oval in shape and variable in size. Most lymphocytes and monocytes also contain intensely red-staining granules 1–2 m in diameter. The inclusions in the monocytes are 5 lm in diameter and stain pink.





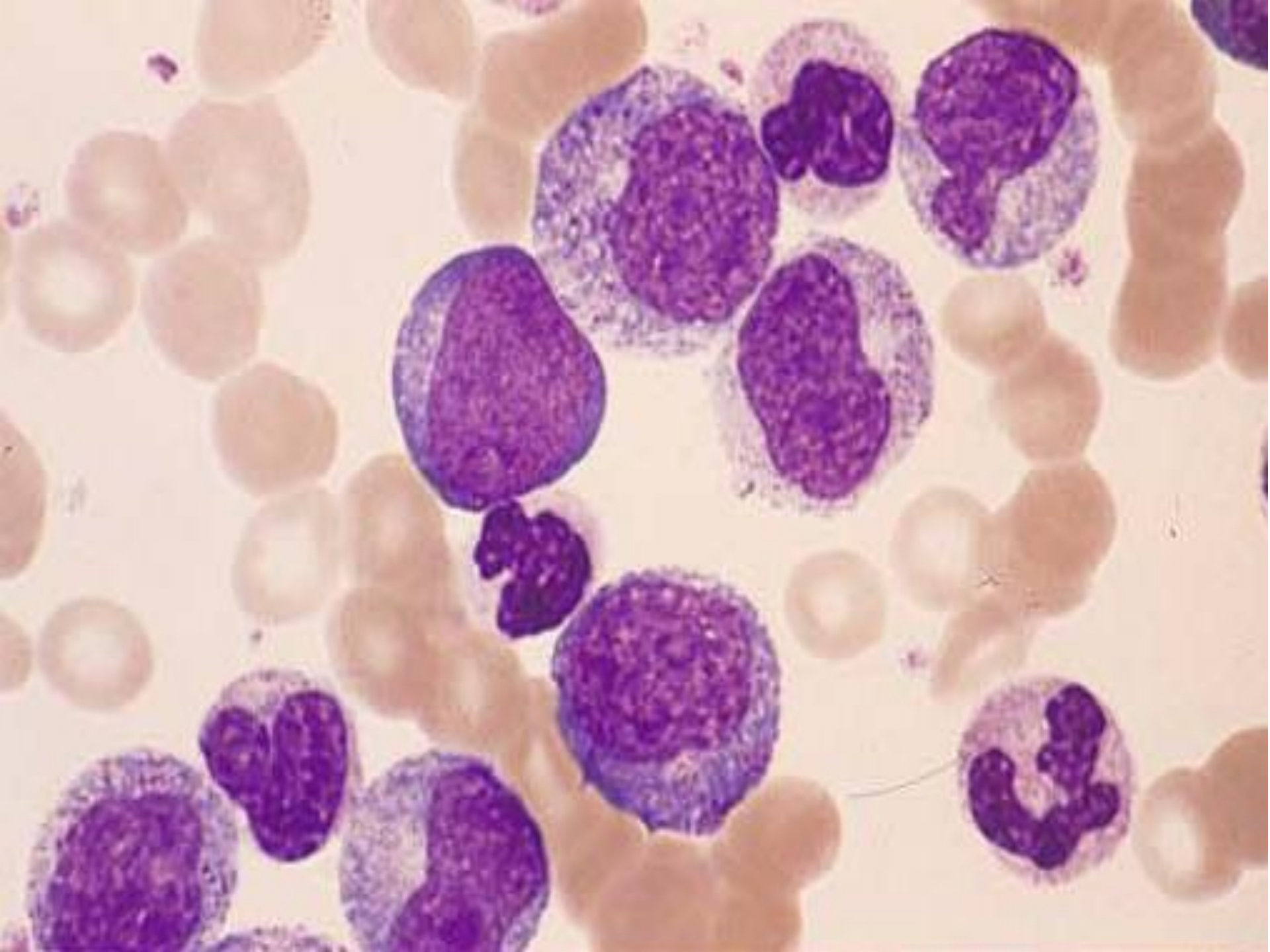
May-Hegglin Anomaly

May-Hegglin Anomaly This disorder has an autosomal dominant mode of inheritance and is associated with mild leukopenia and thrombocytopenia. The neutrophilic granulocytes contain predominantly rod-shaped inclusions of a pale- to dirty-blue color, approximately 2– 5 m in diameter, which are found on electron microscopy to consist of dense RNA fibrils and are distinguishable from the Dohle bodies that occur in severe infections



Chronic myeloid leukemia (CML)

- Chronic myeloid leukemia(CML)
- Blood smear shows a preponderance of mature neutrophilic granulocytes.
- Myelocyte at center, basophil at upper right
- Promyelocyte (center) in a blood smear



Blood smear showing a greater left shift.
At center is a myeloblast

.Shows left shift of the neutrophils, with toxic granulation

بخش هفتم :
منابع خطا در تست های انعقادی

تهیه و تنظیم از : دکتر مهرداد ونکی

Reference:

1-Henry 21st Ed 2007

2- PRACT1CAL HAEMATOLOGY Dacie and Lewis TENTH ED1T10N 2006

3-preanalytical variability(lippi G /Guidi)

منابع خطا شایع قبل از آنالیز در تست های انعقادی
preanalytic errors in Coagulation tests(PT & PTT)

۱- خطا در شناسائی و تعیین هویت بیمار
۲- خطا در شناسائی محل آناتومیک مناسب جهت نمونه گیری تست انعقادی
۳- خطا در نحوه کاربرد گارو و توزیع خون
۴- خطا در جمع آوری حجم استاندارد خون / خطا در حجم وغلظت ضدانعقاد سیترات مورد استفاده
۵- خطا در میکسینگ نمونه انعقادی
۶- خطا ی ناشی از همولیز نمونه انعقادی
۷- خطا نگاه داری نمونه انعقادی
۸- خطا مراحل جداسازی نمونه انعقادی
۹- خطا ناشی از انتخاب سوزن نامناسب و لوله آزمایش نامناسب
۱۰- خطا ناشی ازعدم تنظیم میزان ضدانعقاد در هماتوکریت های بالای ۵۵%

منابع خطا شایع قبل از آنالیز در تست های انعقادی
preanalytic errors in Coagulation tests (PT & PTT)

- **۱- خطا در شناسائی و تعیین هویت بیمار:**
- اقدام اصلاحی و وپیشگیرانه **الف)** درخواست بیان نام بیمار از زبان بیمار قبل از شروع نمونه برداری و تطبیق آن با قبض مربوطه **ب)** استفاده از سیستم بارکد در لیبلینگ مکانیزه آزمایشگاه **ج)** دابل چک هویت بیمار توسط دو فرد
- **۲- خطا در شناسائی محل آناتومیک مناسب جهت نمونه گیری تست انعقادی :**
- برداشت نمونه انعقادی از اندام تحتانی و ورید های ناحیه قوزک پا ترجیحا نبایستی صورت گیرد مگر در شرایط اجبار و خاص / خون ورید های اندام تحتانی به علت سکون نسبی گردش خون تمایل بیشتری به انعقادپذیری دارند
- نمونه گیری از شریان ها نیز جهت تست های انعقادی توصیه نمی گردد که دلیل آن تماس سوزن با پلاک های اترواسکلروتیک می باشد
- نمونه گیری از فیستول ها و کاتتر های شریانی و ورید دستی که تحت عمل ماستکتومی قرار گرفته است کنتراندیکه وممنوع است . در صورت اجبار به نمونه گیری از کانولا یا کاتتر حداقل بایستی ۱۰ سی سی ابتدای نمونه گرفته شده را که آغشته به هپارین غشائ کاتتر است را اوت نمود و نمونه بعدی که فاقد هپارین می باشد جمع آوری گردد

منابع خطا شایع قبل از آنالیز در تست های انعقادی
preanalytic errors in Coagulation tests (PT & PTT)

۳- خطا در نحوه کاربرد گارو و توزیع خون

- استاز وریدی ناشی از بستن گارو(بیش از یک دقیقه) منجر به فعال سازی فاکتور هشت و فاکتور فون ویلبراند و مجموعا فعال شدن ابشار داخلی انعقاد می گردد و با مصرف فاکتور های انعقادی منجر به افزایش کاذب تست های انعقادی می گردد .
- در صورتی که ورید ها مناسب و در دسترس باشند استفده از گارو در تست های انعقادی روتین ضرورتی ندارد
- بلافاصله پس از ورود سوزن به داخل رگ بایستی گارو باز شود
- در صورت استفاده از لوله وکیوم بهتر است از لوله های اخر جهت تست انعقادی و هماتولوژی استفاده نمود
- در صورت استفاده از سرنگ معمول بهتر است اولین لوله که داخل آن خون توزیع می گردد لوله هماتولوژی و تست های انعقادی باشد(به این دلیل که اولین خون توزیع شده حاوی آخرین خون برداشت شده از رگ می باشد)

منابع خطا شایع قبل از آنالیز در تست های انعقادی
preanalytic errors in Coagulation tests (PT & PTT)

- **۴- خطا در جمع آوری حجم استاندارد خون / خطا در حجم و غلظت ضدانعقاد سیترات مورد استفاده**

- **نسبت استاندارد حجم ماده ضد انعقاد به خون در تست های یک انعقادی روتین (PT&PTT)یک به نه می باشد**
- **اگر حجم خون نسبت به ضد انعقاد کم باشد منجر به افزایش کاذب تست های انعقادی روتین می گردد (بیش از ۱۰% کمبود نمونه خون مطلقا نباستی پذیرش گردد و جز معیار های رد نمونه در آزمایشگاه بایستی قرار گیرد) / زیاد بودن حجم خون نسبت به سیترات منجر به بروز لخته های ریز و درشت و رد نمونه انعقادی جهت انجام آزمایش می گردد که منجر به افزایش کاذب تست ها می گردد.**

منابع خطا شایع قبل از آنالیز در تست های انعقادی
preanalytic errors in Coagulation tests (PT & PTT)

۵- خطا در میکسینگ نمونه انعقادی

- نمونه انعقادی بلافاصله پس از اتمام خونگیری باستی به طور آهسته ۳ الی ۴ بار مخلوط گردد تا اختلاط خون با ضد انعقاد کامل گردد .
- تکان دادن شدید نمونه انعقادی ممنوع بوده و با همولیز نمونه و فعال شدن پلاکت ها منجر به کاهش کاذب تست های انعقادی میگردد PTT PT
-

منابع خطا شایع قبل از آنالیز در تست های انعقادی
preanalytic errors in Coagulation tests(PT & PTT)

- ۶- خطا ی ناشی از همولیز نمونه انعقادی
- منجر به کاهش کاذب تست های انعقادی میگردد
- PTT PT
- استفاده از وسایل نامناسب نظیر کاربرد سوزن با شماره گیژ بالا (سوزن ظریف و باریک) منجر به ورود آهسته و با تاخیر نمونه به داخل سرنگ و همولیز نمونه گردد و سایر عوامل همولیز نمونه خون شامل: حرارت بالا محیط / تکان دادن شدید نمونه / استفاده از الکل خیس در موضع نمونه گیری / دور بالا و زمان طولانی سانتریفوگاسیون / آسپیره کردن سریع خون به داخل سرنگ با سرعت بالا / جابجائی بیش از حد سرنگ داخل رگ / آلودگی لوله به آب مقطر یا دترژآن
- همولیز نمونه انعقادی تا زمان جداسازی مشاهده نمی گردد وپس از جداسازی به رنگ صورتی یا قرمز شفاف و روشن در سطح پلاسما قابل تشخیص است (درصد کمی از همولیز خون پنهان بوده و با چشم قابل ردیابی نمی باشد)

منابع خطا شایع قبل از آنالیز در تست های انعقادی
preanalytic errors in Coagulation tests(PT & PTT)

- ۷- خطا نگاهداری نمونه انعقادی

- PT & PTT(تست های انعقادی روتین)

- نمونه روتین تست های انعقادی حداکثر در ظرف ۴ چهار ساعت بایستی آنالیز گردد (در ارتباط با آزمون های بررسی عملکرد پلاکت این زمان ۳ ساعت می باشد) در صورت عدم امکان انجام در مدت زمان چهار ساعت نمونه پلاسما جداشده بایستی (ترجیحا فاقد پلاکت) بایستی در ۷۰- درجه فریز گردد
- نگاه داری طولانی نمونه انعقادی بیش از ۴ ساعت منجر به افزایش کاذب تست های انعقادی روتین می گردد
- نگاهداری نمونه در یخچال ۴ درجه(یا بر روی یخ) منجر به فعال سازی فاکتور هفت و کاهش کاذب نتایج تست های روتین انعقادی می گردد

شرايط نگاه داري نمونه هاي انعقادي
PT & PTT

- نمونه انعقادي پس از نمونه برداري بهتر است در حرارت اطاق نگاه داري شده و حداكثر يك ساعت پس از نمونه برداري آناليز گردد.
- نمونه انعقادي در صورت نياز به نگاه داري در يخچال بايستي به صورت پلاسما جدا شده و در لوله درپيچ دار (محكم) نگاه داري گردد. فقدان درپوش درلوله نگاه داري تست انعقادي منجر به خروج co2 و اسيدي شدن نمونه و تخريب فاكتور هاي پروتئيني انعقاد ي و افزايش كاذب تست ها مي گردد.
- نگاه داري نمونه انعقادي در يخچال منجر به كاهش كاذب PT مي گردد.
- نگاه داري بيش از ۴ ساعت نمونه انعقادي در حرارت اطاق(بدون جداسازی پلاسما) با افزايش كاذب PTT (حدود ۲۰-۱۰%) همراه است.
- بهترين شرايط نگاه داري نمونه پلاسما جداشده جهت تست هاي انعقادي فريز در ۲۰- درجه(يك ماه قابل نگاه داري) يا ۷۰- درجه (۶ ماه قابل نگاه داري مي باشد.
- لوله شيشه اي آغشته به دترژا نت در نتايج تست هاي انعقادي و كنترل پلاسما تغييرات فاحش حاصل مي كند.

منابع خطا شایع قبل از آنالیز در تست های انعقادی
preanalytic errors in Coagulation tests(PT & PTT)

۸- خطا مراحل جداسازی نمونه انعقادی

- زمان ناکافی سانتریفوژ و عدم تشکیل پلاسما عاری از پلاکت یا فقیر از پلاکت از منابع خطا شایع در فاز جداسازی نمونه های انعقادی می باشد
- زمان و دور استاندارد سانتریفوژ ۱۵ دقیقه و دور ۱۵۰۰ جی می باشد .در این شرایط شمارش پلاکت نمونه پلاسما کمتر از ده هزار می شود که مناسب تست های انعقادی می باشد .
- نمونه پلاسما غنی از پلاکت منجر به کاهش کاذب و مختل شدن PTTمی گردد
- این کاهش کاذب به دلیل آزاد سازی فسفولیپید و فاکتور ۴ پلاکتی پلاکت ها می باشد که به ترتیب فسفولیپید منجر به مهار لوپوس انتی کواگولانت می گردد و فاکتور ۴ پلاکتی منجر به غیر فعال شدن هپارین می گردد.
- درپوش دار بودن نمونه انعقادی در حین زمان سانتریفوژ جهت جلوگیری از تبخیر نمونه ها الزامی است.

منابع خطا شایع قبل از آنالیز در تست های انعقادی
preanalytic errors in Coagulation tests(PT & PTT)

- ۹- خطا ناشی از انتخاب سوزن نامناسب و لوله آزمایش نامناسب
- نمونه گیری یا گیژ بالا یا اسکاپ وین در نوزادان و افراد بد رگ منجر به بروز خطا در تست های انعقادی می گردد (به دلیل بروز همولیز یا لخته یا حجم ناکافی نمونه)
- بهترین وسیله نمونه برداری انعقادی سیستم وکیوم می باشد
- تفاوت معنی داری بین لوله شیشه ای و پلاستیکی وجود ندارد و کاربرد هر دو نوع لوله مجاز است
- لوله آغشته به هپارین یا دترژانت یا آب مقطر

منابع خطا شایع حین آنالیز در تست های انعقادی
Analytical errors in Coagulation tests (PT & PTT)

- ۱- دستورالعمل کاری نامناسب تست انعقادی : استفاده از بروشور یک مارک تجاری به جای یک مارک تجاری دیگر ب) عدم رعایت دقیق زمان های انکوباسیون ثبت شده در بروشور کیت
- ۲- اپراتور فنی کم تجربه یا بی تجربه: چند مثال شامل الف) تکرار های غیر ضروری به دلیل عدم اعتماد به نفس اپراتور و نداشتن شرح حال از بیمار(مصرف یا عدم مصرف داروی ضد انعقاد وارفارین یا هپارین) ب) به حجم رساندن غلط معرف ها به دلیل سمپلینگ نامناسب با تکرار پذیری نامناسب یا استفاده از رقیق کننده نامناسب ج) عدم تسلط به کار با کرونومتر جهت شروع و پایان تست د) دید و روشنائی ناکافی جهت تایید نقطه تشکیل لخته در تست
- ۳- معرف فاسد و تاریخ گذشته : الف) قسمت انتهائی هر معرف تست انعقادی ممکن است به دلیل خروج مکرر از یخچال و نوسان حرارتی دچار تخریب شده باشد ب) حمل نامناسب و نگاه داری نامناسب معرف ها ج) ثبت شماره سریال معرف مورد استفاده در لیست کار مفید بوده و قابلیت پیگیری در آینده حاصل می نماید د) معرف فاسد کلسیم
- ۴- حرارت وزمان نامناسب انکوباسیون : الف) حرارت ایده ال تست های انعقادی ۳۷ درجه با حداقل نوسان قابل قبول +/- ۱ درجه می باشد ب) زمان انکوباسیون بیش از ۱۰ دقیقه جهت پلاسما قبل از شروع تست منجر به تخریب فاکتور های انعقادی می گردد

منابع خطا شایع حین آنالیز در تست های انعقادی
Analytical errors in Coagulation tests (PT & PTT)

۵- ابزار حجمی نامناسب و غیر کالیبر(سمپلر ۱۰۰ یا ۲۰۰)

۶- عدم استفاده از کنترل نرمال تست های انعقادی یا کنترل نرمال مراجعین

۷- کرونومتر غیر کالیبر و نامناسب

۸- ضریب تغییرات مجاز روزانه برای تست های انعقادی روتین ۵% CV می باشد
(نوسان بین دونتیجه در تست های دوپلیکیت یا مضاعف تا ۱۰% مجاز است)

۹- برخی کیت های PTT به لوپوس آنتی کوآگولان حساس بوده و در حضور این آنتی بادی مختل میشود

انتی بادی لوپوس انتی کوگولانت یک آنتی بادی خاص بیماران لوپوسی است که در تست تداخل می دهد

منابع خطا شایع پس از آنالیز در تست های انعقادی
Postanalytical errors in Coagulation tests (PT & PTT)

- ۱- خطاهای ناشی از رونویسی نادرست : ثبت جابجا نتایج تست های انعقادی / ثبت نتیجه کنترل به جای تست / عدم ثبت اکتیویتی / ثبت بدون INR نتیجه / عدم ثبت کنترل نرمال
- ۲- تحویل جواب های ابنرمال بدون داشتن شرح حال داروئی
- ۳- تحویل جواب بیماران سابقه دار بدون دلتا چک نتایج

منابع خطا شایع قبل و حین آنالیز در تست زمان سیلان
Pre & Analytical errors in Bleeding Time (BT)

مقدمه : تست زمان سیلان بهترین تست روتین و کاربردی جهت بررسی عملکرد و تعداد پلاکت ها می باشد

تست سیلان طولانی با بیماری های اکتسابی و ارثی مرتبط با پلاکت می تواند همراه باشد از جمله : فون ویلبراند / ترومباستنی گلانزمن / برنارد سولیر / اختلال عملکرد پلاکت ناشی از آسپیرین

نکته : در بیماری هموفیلی زمان سیلان نرمال است چون عیب در فاکتور هشت است نه پلاکت ها

۱- انجام تست شمارش پلاکت دربیمار قبل از انجام تست توصیه می گردد / در بیماران با پلاکت کمتر از ۵۰۰۰۰ خونروی سطحی طولانی مدت در محل برش سطحی پوست حاصل می گردد

۲- ضربه غیر استاندارد لانست و نهایتا شکاف با عمق کم یا زیاد (عمق شکاف استاندارد در زمان سیلان ۲,۵ میلیمتر می باشد)

۳- عدم استفاده از کاغذ صافی بدون پرز جهت جذب خون

۴- عدم استریل کامل موضع شکاف

۵- خشک نشدن کامل الکل قبل از زدن لانست (افزایش کاذب زمان سیلان)

۶- کرونومتر غیر کالیبر و نامناسب

منابع خطا شایع قبل و حین آنالیز در تست زمان انعقاد
Pre & Analytical errors in Cloting Time (CT)
Lee White Method

■ خلاصه روش :

■ محاسبه زمان لخته شدن خون کامل بدون ضد انعقاد در سه لوله شیشه ای همولیز / هر ۳۰ ثانیه پس از اضافه نمودن همزمان خون به سه لوله تشکیل لخته را بررسی می نماییم و در واقع زمان تشکیل لخته در لوله سوم زمان انعقاد را نشان می دهد (لوله ها بایست در ۳۵ تا ۳۷ درجه باشد) (فعال کننده پروسه انعقاد در این تست تماس فاکتور ۱۲ با جدار شیشه ای لوله می باشد که مسیر داخلی انعقاد را فعال می نماید

■ مقادیر مرجع زمان انعقاد :

■ میزان نرمال زمان انعقاد با روش وایت ۸ تا ۱۸ دقیقه / میزان نرمال زمان انعقاد با روش لوله مویینه ۲ الی ۶ دقیقه

■ کاربرد روش زمان انعقاد :

■ استفاده از تست زمان انعقاد جهت بررسی و غربال وضعیت انعقادی فرد مناسب نیست و صرفا جهت پیگیری درمان با هپارین مناسب است/ میزان هپارین بایستی طوری تنظیم گردد که زمان انعقاد خون کامل ۱,۵ تا ۲ برابر مقدار پایه پیش از آغاز درمان با هپارین شود

منابع خطا شایع قبل و حین آنالیز در تست زمان انعقاد
Pre & Analytical errors in Cloting Time (CT)
Lee White Method

۱- حرارت کمتر از ۳۵ یا بیشتر از ۴۵ درجه ■

۲- استفاده از لوله نامناسب پلاستیکی(افزایش کاذب زمان انعقاد)■

۳- استفاده از لوله غیر همولیز با قطر زیاد (افزایش کاذب زمان انعقاد به علت سطح تماس کمتر خون با جدار شیشه ای فعال کننده مسیر داخلی انعقاد) ■

۴- روش لوله مویینه به دلیل فشار روی محل نمونه برداری و احتمال خروج عصاره بافتی زمان انعقاد به طور کاذب کاهش یافته و دقیق نمیباشد / در روش مویینه احتمال خشک شدن لام زیاد است و منجر به کاهش کاذب نتیجه زمان انعقاد می گردد ■

منابع خطا شایع قبل و حین آنالیز در تست فیبرینوژن
Pre & Analytical errors in Fibrinogen

کاهش فیبرینوژن : انعقاد داخل عروقی منتشر و اختلال شدید کبدی

روش کلاوس روش انتخابی جهت اندازه گیری کمی فیبرینوژن می باشد

۱- حجم نامناسب خون کامل سیتراته جمع آوری شده

۲- جمع آوری نمونه لخته یا نمونه هپارینه به جای نمونه سیتراته

۳- نمونه همولیز یا ایکتریک یا لیپمیک

۴- عدم اختلاط کافی نمونه پلاسما سیتراته

۵- آلودگی لوله پلاسما به آب یا دترژان و..

۶- فساد معرف ها یا اشکال در نحوه آماده ساری معرف با بافر مربوطه (خصوصا در روش ترومبین)

۷- زمان و دما نامناسب انکوباسیون

۸- ابزار حجمی نامناسب

۹- عدم اجرای دقیق دستورالعمل کاری تست فیبرینوژن

۱۰- عدم استفاده از پلاسما کنترل غیر طبیعی فیبرینوژن (با غلظت پایین ۸۰ الی ۱۲۰ میلیگرم) یا پلاسما نرمال رقیق شده با بافر باربیتال

کنترل کیفیت بخش بانک خون

تنظیم از : دکتر مهرداد ونکی

Quality Control

- **Quality Control**
  - **Reagents**
    - **Daily**
  - **Centrifuges**
    - **Periodically**
  - **Incubators**
    - **Daily**
  - **Blood Products**
    - **Wet: Daily +**
    - **Frozen: Periodically**

99.9% Performance in the Blood Bank: Good Enough?

- 3000 ABO Groupings
- 3 Incorrect ABO's
- 5000 Cross Matches (all compatible)
- 5 Incorrect Crossmatches

How do we reduce errors?

- ISO 15189 states that clinical laboratories must have a Quality Assurance Plan in place. At the time that was issued most did NOT!
- Does a Quality Assurance Plan guarantee no technical errors or the production of blood components that will not transmit disease, etcetera?
- NO!!
- But, it does provide a mechanism to improve the quality of work performed and components produced.

Quality Systems

- Quality Assurance
  - Looks at the overall process of quality improvement and maintenance in the entire blood bank.
- Quality Control
  - Routine testing of Blood Bank Reagents to insure potency, calibration of serofuges, taking temps on fridges and freezers, testing blood components, etc.
- Current Good Manufacturing Practices (cGMP)
  - Following guidelines found in Standard Operating Procedures (SOP).

Table 15–1. Common Blood Bank Quality Control Activities and Quality Assurance Indicators

Quality Control Activities	Quality Assurance Indicators
Whole Blood Collection Equipment	Number of donor forms with incomplete or incorrect information
Microhematocrit centrifuge	
Hemoglobinometers, cell counters	Number and types of unusable units and blood components
Apheresis equipment	
Blood Components	Number of blood typing discrepancies in donors and patients
Red blood cells hematocrit	
Cryoprecipitated antihemophilic factor	Number and reasons for invalid test runs
Platelet counts in units prepared from whole blood and apheresis	Number of and reasons for component labeling check failures
Granulocyte counts in units prepared by apheresis	Number and source of improper and incomplete requests for blood components
Reagents	Number and location of patients without proper identification at time of specimen collection or transfusion
Copper sulfate	Number, source, and reasons for unacceptable specimens
Reagent red blood cells	Number of times wrong component or ABO was selected for crossmatch or issue
Antisera	
Test kits for donor disease marker testing	
Laboratory Equipment	Number and type of transfusion complications
Rh view boxes	
Heating boxes	Number and reasons for testing turnaround time failures
Waterbaths	
Thawing devices for blood components	
pH meters	
Centrifuges and cell washers	
Blood irradiators	
Refrigerator, freezers and platelet incubators	
Blood warmers	
Shipping containers	

ABO BLOOD GROUP SYSTEM
Genetic ABO

Codominant genes:

3 Alleles	A , B , O
6 Genotype	AA ,AO , BB , BO , AB , OO
4 phenotype	A , B , AB , O

Gene Product :

A Transferase	**N- acetyl galactose amine**
B Transferase	**D- Galactose**
O (amorph)	**NO functional product**
H transferase	**Fucose**

ABO BLOOD GROUP SYSTEM

ABO structure teory

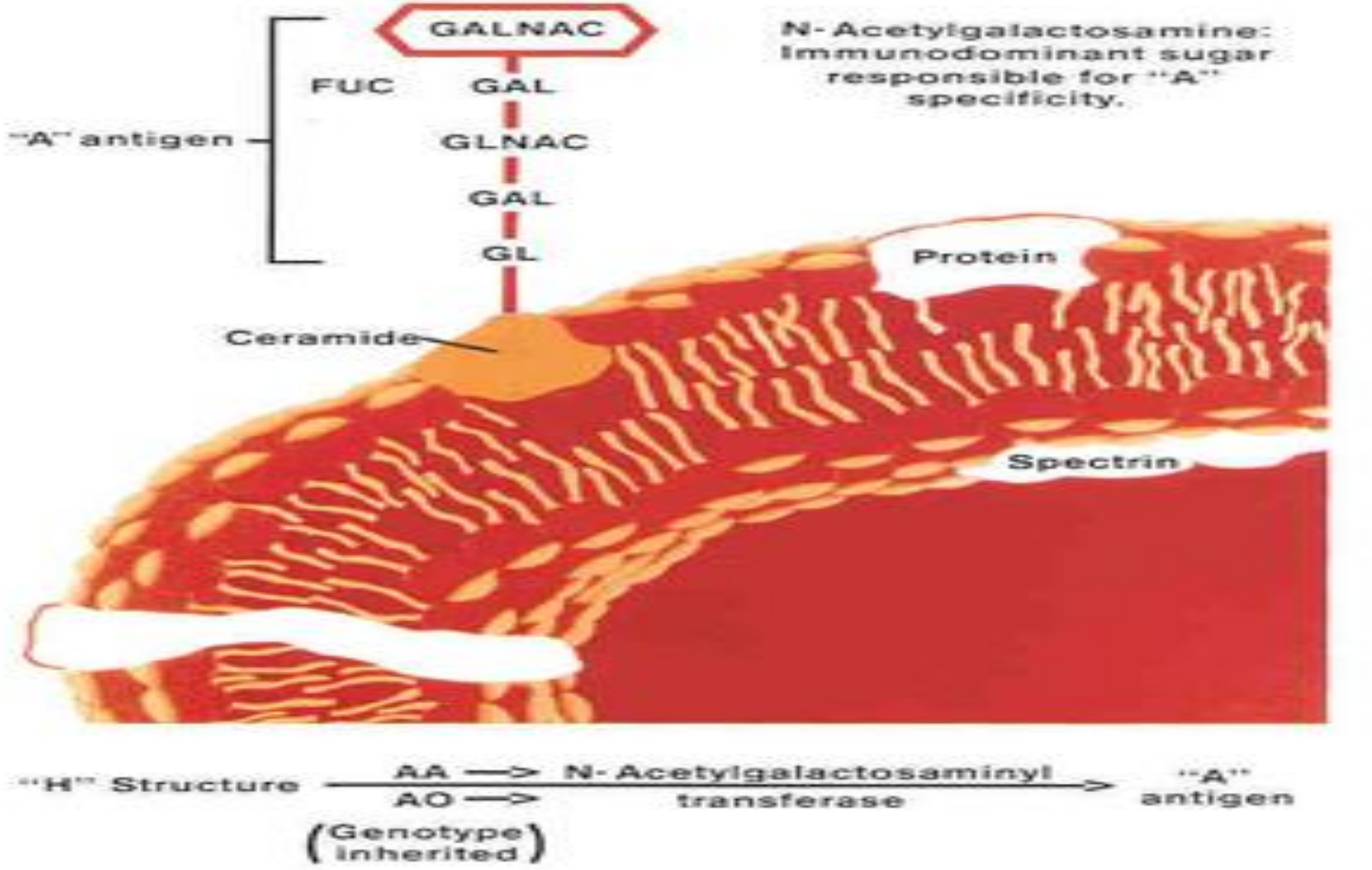
Subterminal ceramide +fucose = H (O)

H + N-acetylgalactoseamine = A

H + D galactose = B

H + N-acetylgalactoseamine + D galactose = AB

ABO Blood Group



ABO Blood Group System

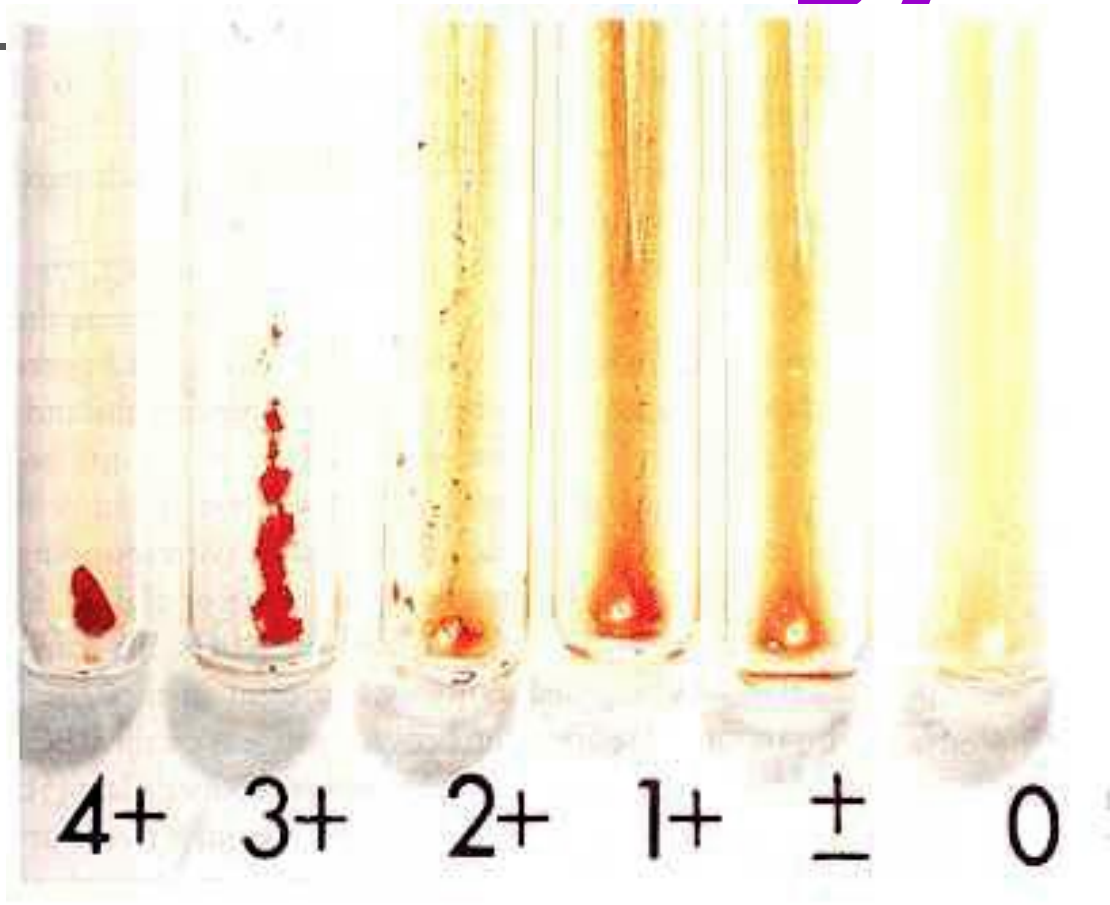
Genotype (Genes)	Phenotype (Blood type)	Antigens in R.B.C.	Antibody In plasma
A_1A_1 A_1A_2, A_2A_2, A_2O	A_1 (23-25%) A_2 (6-10%)	A_1, (H) A_2, (H)	anti-B, anti-H Anti-B, anti-A_1
BB, BO	B(8-17%)	B,(H)	Anti-A/A_1
A_1B A_2B	A_1B(3%) A_2B(1%)	A,A_1,B A,B,H	Anti-H Anti-A_1
O,O(H,H or H,h) h,h	O(43-50%) Oh Bombay	H None	Anti-A,-A_1,-B Anti-A,-A_1,-B,-H

Blood Group Serology

ABO testing:

- Forward Grouping: Test patient red blood cells with known Reagent Antibody - Anti-A and Anti-B
- Reverse (Confirmatory) Testing: Test patient serum (plasma) with know Reagent Red Blood Cells - A_1 Cells and B Cells

Blood Group Serology

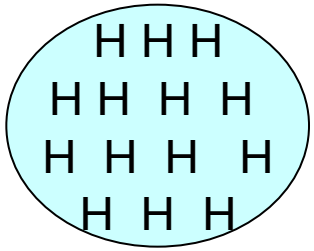


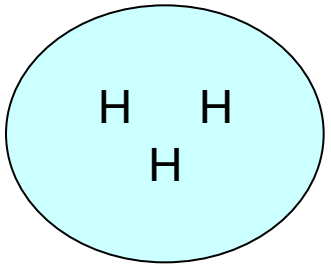
False Positives and False Negatives

- False Positives
  - **Contaminated Glass**
  - **Autoagglutination**
  - **A heterophile antibody**
  - **Added the wrong antibody**
  - **Added the wrong antigen**

- False Negatives
  - **Not washing the test**
  - **Inactive/outdated reagents**
  - **Incorrect incubation temperature**
  - **Incorrect test time**
  - **Prozone or Postzone**
  - **Failure to add reagents**

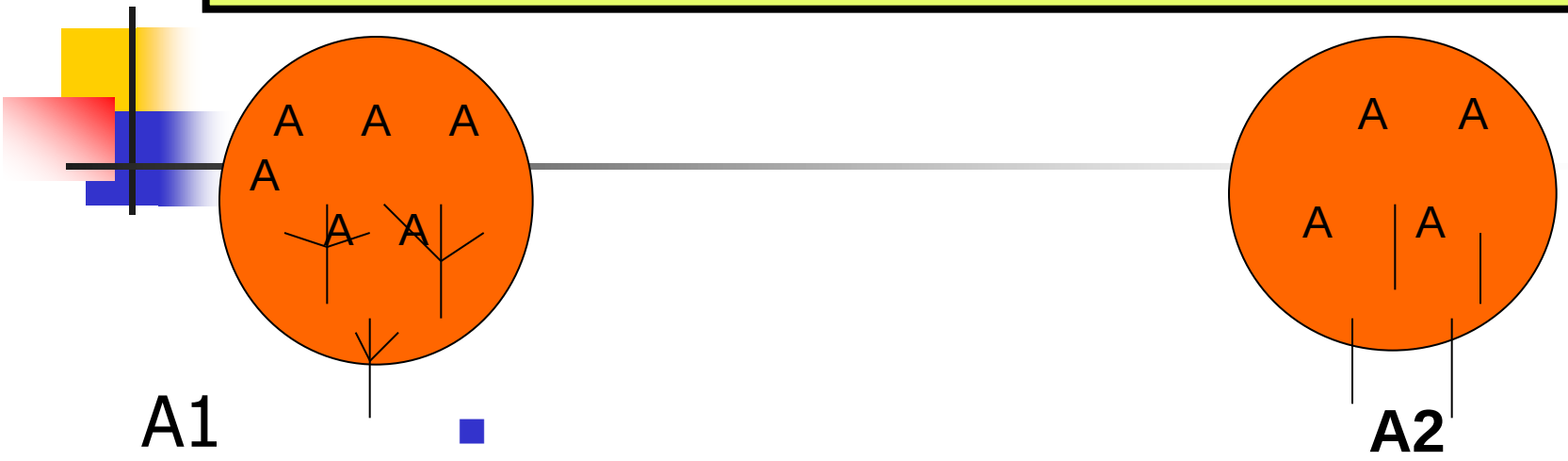
تراكم آنتي ژن پايه اي H
بر روي غشا گلبول هاي قرمز





O> A2 > B > A2B > A1 > A1B

A1 / A2 Differentiation



Branched Ag	Linear Ag
2 million Ag /RBC	0.5 million Ag /RBC
Positive reaction with (Anti-A /Anti A1-lectin)	Positive reaction with Anti - A Neg reaction Anti –A1 lectin

عدم انطباق ABO

تعريف عدم انطباق ABO

به معنا عدم انطباق گروه بندي سلولي (سل تايپ يا روش مستقيم) و گروه بندي سرمي (بك تايپ يا روش معكوس) مي باشد

دلايل عدم انطباق ABO مرتبط با گروه بندي سلولي (سل تايپ)

- ۱- آنتي ژن هاي غير معمول در سطح گلبول قرمز
  Extera Antigen present
- مثل : فنوتيپ Bاكتسابي / فنوتيپ B(A)/ پلي آگلوتيناسيون / رولكس فرميشن
- ۲- تضعيف يا حذف آنتي ژن هاي غشا گلبول قرمز
  missing antigen مثل : زير گروه هاي ABO
- ۳- واكنش مخلوط **mix field reaction**
  مثل : پيوند مغز استخوان و سلول های بنيادی / تزريق خون گروه O به گروه A يا B

مثال شماره ۱
عدم انطباق ABO در سل تایپ (فنوتیپ B اکتسابی)

- گروه واقعی : A
- گروه کاذب ناشی از عدم انطباق در سل تایپ AB
- **فنوتیپ B اکتسابی**
- **عامل بروز فنوتیپ B اکتسابی:**
- **سرطان های کولورکتال /انسداد روده / سپتی سمی گرم منفی ها و و آنزیم های داستیله کننده باکتری**

سل تایپ	سل تایپ	بک تایپ	بک تایپ
anti - A	Anti-B	A1-cell	B-cell
4+	1+	0	4+

مثال شماره ۲

عدم انطباق ABO در سل تایپ فنوتیپ B(A)

سل تایپ	سل تایپ	بک تایپ	بک تایپ
anti - A	Anti-B	A1-cell	B-cell
1+	4+	4+	0

- گروه واقعی : B
- گروه کاذب ناشی از عدم انطباق در سل تایپ AB
- فنوتیپ B(A)
- عامل بروز فنوتیپ B(A) :
- حساسیت بالای معرف منوکلونال آنتی A که حتی قادر است مقادیر بسیار اندک آنتی ژن A را به طور غیر اختصاصی شناسائی نماید
- راه رفع خطا : کاربرد آنتی بادی پلی کلونال به جای منوکلونال / کاربرد آنتی A و آآنتی B با مارک تجاری معتبر دیگر

مثال شماره ۳
عدم انطباق ABO در سل تایپ missing antigen

سل تایپ	سل تایپ	بک تایپ	بک تایپ
anti - A	Anti-B	A1-cell	B-cell
0	0	0	4+

- گروه واقعی : زیر گروه A2 / A3
- گروه کاذب ناشی از عدم انطباق در سل تایپ O
- عامل بروز: ضعف و کمیت پائین آنتی ژن
- راه رفع خطا : تکرار سل تایپ / زمان انکوباسیون طولانی تر سل تایپ با معرف های پلی کلونال

مثال شماره ۴
عدم انطباق ABO در سل تایپ (واکنش مخلوط)

سل تایپ	سل تایپ	بک تایپ	بک تایپ
anti - A	Anti-B	A1-cell	B-cell
0	2+ /mf	4+	0

- گروه واقعی :B
- گروه کاذب ناشی از عدم انطباق در سل تایپ : واکنش مخلوط و ضعیف B
- عامل بروز اکنش مخلوط :
- گروه B که حجم زیادی گروه خون O دریافت نموده است

مثال شماره ۵
عدم انطباق ABO در بک تایپ
(حضور آنتی بادی غیر معمول در گروه بندی سرمی)

سل تایپ	سل تایپ	بک تایپ	بک تایپ
anti - A	Anti-B	A1-cell	B-cell
4+	0	2+	4+

- گروه واقعی : A
- گروه کاذب ناشی از عدم انطباق در بک تایپ O
- عامل بروز :
- حضور آنتی A1 در سرم فرد A2
- راه رفع خطا :
- استفاده از Anti-A1 lectin

مثال شماره ۶
عدم انطباق ABO در بک تایپ
(حضور آنتی بادی غیر معمول در گروه بندی سرمی)

سل تایپ	سل تایپ	بک تایپ	بک تایپ
anti - A	Anti-B	A1-cell	B-cell
4+	4+	0	1+

- گروه واقعی : AB
- گروه کاذب ناشی از عدم انطباق در بک تایپ B ضعیف
- عامل بروز :
- حضور آلوآنتی بادی های سرد و غیر معمول نظیر آنتی p1/M /N
- راه رفع خطا :
- استفاده از سلول غربالگر O

مثال شماره ۷
عدم انطباق ABO در بک تایپ
(ضعیف شدن یا فقدان آنتی بادی سرمی)

سل تایپ	سل تایپ	بک تایپ	بک تایپ
anti -A	Anti-B	A1-cell	B-cell
0	0	0	0

- گروه واقعی : O
- گروه کاذب ناشی از عدم انطباق در بک تایپ AB
- عامل بروز :
- عدم حضور آنتی بادی سرمی

دلایل عدم انطباق ABO مرتبط با گروه بندي سرمی (بک تایپ)

- ۱- انتی بادی های غیر معمول در گروه بندی سرمی از جمله آلوآنتی بادی های سرد و اتوآنتی بادی های سرد
- ۲- ضعیف شدن یا از بین رفتن آنتی بادی های سرمی از جمله نوزادان و افراد مسن و موارد پاتولوژیک نظیر آگاما یا هیپو گلوبولینمی ارثی یا اکتسابی

نحوه برخورد با کراس مچ ناسازگار

مشکل	عامل خطا	نحوه برخورد و رفع خطا
خطای تعیین ABO	خطا شناسائی بیمار خطا برچسب نمونه	تکرار ABO بررسی دوباره بیمار
آنتی بادی های غیر منتظره	آلوآنتی بادی های سرد (M/P/A1) و اتو آنتی بادی های سرد(I /H)	تکرار آزمون با استفاده از سلول های غربالگر وA2

درخواست خون اورژانسی بدون کراس مچ

- ۱- خون ایزوگروپ بایستی ارسال شود و در صورت عدم دسترسی به خون ایزو گروپ کیسه O پک سل قابل پیشنهاد می باشد
- ۲- کراس مچ کامل خون کیسه همزمان با ارسال اورژانس خون بایستی صورت پذیرد و در صورت ناسازگاری سریعا جهت قطع تزریق خون به بخش اطلاع رسانی گردد.
- ۳- امضا پزشک بر روی درخواست اورژانس خون و تگ موجود بر روی کیسه خون نشانه تائید کراس مچ نشدن واحد می باشد
- ۴- کیسه خون نبایستی بر اساس اطلاعات قبلی گروه ارسال گردد و بایستی با نمونه جدید گروه بندی و سریع ارسال گردد
- ۵- در صورت فوت بیمار نبایستی کراس مچ متوقف شود چون ممکن است در اثر ناسازگاری کیسه مرگ بیمار رخ داده باشد
- ۶- در شرایط بسیار اورژانس بانک خون بایستی واحد های اضافی کراس شده و آماده با پیش بینی لازم جهت بیمار آماده نماید (پس از ارسال اولین واحد خون به صورت اورژانس)

مرجوع شدن کیسه خون

- فرآورده خونی که استفاده نشده است بایستی به بانک خون بازگردانده شود
- یخچال بدون مانیتور حرارتی جهت نگاه داری کیسه خون مناسب نمی باشد و در این شرایط خون حداکثر در مدت نیم ساعت بایستی به بانک خون مرجوع گردد
- حرارت مناسب جهت نگاه داری کیسه خون در بخش بالینی ۱۰-۱ درجه سانتی گراد می باشد والزاما بایستی در داخل یخچال حاوی مونیتور حرارتی نگاه داری شود.

عدم ضرورت کراس مچ برای طفل کمتر از ۴ ماه

- به دلیل فقدان آنتی بادی سرمی در کودک زیر ۴ ماه انجام یک گروه بند ساده سل تایپ همراه با آزمون غربالگری سرم مادر (کومبس غیر مستقیم سرم مادر) جهت تزریق خون کفایت می نماید
- در صورت مثبت بودن کومبس مادر کیسه خون تزریقی بایستی با سرم مادر سازگار باشد

MSBOS

ماکزیمم واحد های خون درخواستی برای یک عمل جراحی

max surgical blood order schedule

- ماکزیمم واحد های خون درخواستی برای یک عمل جراحی بایستی منطبق با استاندارد های مصوب باشد به عنوان مثال در یک عمل جایگزینی لگن حداکثر کیسه مجاز قابل درخواست ۵ کیسه می باشد
- درخواست بیش از حد مجاز استاندارد بایستی به دلیل خونریزی یا آنمی شدید بیمار و شرایط خاص بیمار باشد .

طرح کیفیت بخش هماتولوژی

تهیه شده در واحد علمی شرکت آریا سینا

تنظیم از : دکتر مهرداد ونکی

طرح کیفیت بخش هماتولوژی

- در این بخش ایستگاه هاي كنترلي، سه مرحله قبل، حین و بعد از انجام آزمایش را تحت کنترل دارد و اجرايي شدن اين ايستگاه ها تضمين مي نمايد كه خروجي از بخش، كيفيت مناسبي را طبق طراحي از پيش تعيين شده داشته و با Plan كيفي آزمايشگاه انطباق دارد. گزارشات ایستگاه -های کنترلي زير كه در جدول طرح کیفیت نتایج بخش هماتولوژي آورده شده است، به مسئول کنترل کیفی آزمایشگاه تحویل و در زمان های ۳ ماهه به مسئول فنی آزمایشگاه جهت استفاده در جلسات بازنگری مدیریت ارائه می شود.
- لازم به ذکر است پایش، تجزیه و تحلیل داده های کنترل کیفی و تبدیل آن به اطلاعات کلان توسط مسئول کنترل کیفی انجام می شود.

الف- کنترل ورودی های بخش هماتولوژی:

- **الف- کنترل ورودی:**
- **ورودی های فرآیند انجام آزمایش در بخش هماتولوژی شامل موارد زیر است:**
- **۱- نمونه خون تام با ضد انعقاد K3EDTA جهت آزمایش CBC, : Retic, BG, Osmotic Fragility, Fibrinogen, G6PD, WBC, Hct, Hb, Sucrose, Hams**
- **۲- نمونه خون تام با ضد انعقاد سدیم سیترات جهت آزمایش PT, : KcT, PTT, Anti thrombin, D-Dimer, ESR**
- **۳- نمونه HLA , LE**
- **٤- کیت و مواد آزمایشگاهی**
- **٥- دستگاه ها و ابزار شامل سل کانتر، سانتریفیوژ، یخچال، سمپلر و سایر ابزار پایش**
- **٦- نیروی انسانی**
- **۷- روش ها**

ب- کنترل حین فرآیند انجام آزمایش در بخش هماتولوژی :

- ۸- کنترل صحت دستگاه سل کانتر CBC
- ۹- کنترل دقت دستگاه سل کانتر CBC
- ۱۰- صحت رنگ آمیزی
- ۱۱- صحت تهیه اسمیر
- ۱۲- تأیید صحت BG
- ۱۳- تأیید و کنترل تست PT, PTT
- ۱٤- کنترل Background دستگاه
- ۱٥- کنترل کار دستگاه از روی اسلاید
- ۱٦- کنترل Hct و Hbبه روش دستی (سانتریفیوژ هماتوکریت و سیانو مت هموگلوبین)
- ۱۷- کنترل WBC, RBC به روش شمارش دستی
- ۱۸- کنترل شمارش Retic
- ۱۹- کنترل عملکرد بخش هماتولوژی
- ۲۰- کنترل تست Anti thrombin
- ۲۱- کنترل تست D- Dimer
- ۲۲- کنترل تست فیبرینوژن
- ۲۳- کنترل تست Osmotic Fragility
- ۲٤- کنترل تست Sucrose, Hams
- ۲٥- کنترل Diff
- ۲٦- کنترل ESR
- ۲۷- کنترل تست CT, BT
- ۲۸- کنترل تست Sickle Cell
- ۲۹- کنترل تست LE Cell
- ۳۰- کنترل تست الکتروفورز هموگلوبین
- ۳۱- کنترل تست HbA1C
- ۳۲- کنترل اسمیر Leishman و Malaria

ج- کنترل فرآیند پس از انجام آزمایش در بخش هماتولوژی (خروجی بخش):

- ۳۳- صحه گذاری نتایج نهایي در بخش توسط سوپروایزر
- ۳٤- کنترل جواب های نهایي توسط مسئول فني
- ۳٥- کنترل جواب های کنترل کیفی روزانه توسط مسئول کنترل کیفی

شماره ایستگاه	عنوان	شرح کنترل	مسئول انجام	زمان انجام	طریقه گزارش	مسئول دریافت گزارش
1	نمونه CBC خون تام با ضد انعقاد K3EDTA جهت تست های CBC, Retic, BG, Osmotic Fragility, Fibrinogen, G6PD, WBC, Hct, Hb, Sucrose, Hams	ویال CBC ضد انعقاد داشته باشد	نمونه گیر	قبل از نمونه گیری	فرم گزارش نامنطبق	مسئول نمونه گیری سپس مسئول QC
1	نمونه CBC خون تام با ضد انعقاد K3EDTA جهت تست های CBC, Retic, BG, Osmotic Fragility, Fibrinogen, G6PD, WBC, Hct, Hb, Sucrose, Hams	- حد اقل خون داخل ویال یك CC باشد.	نمونه گیر	قبل از نمونه گیری	فرم گزارش نامنطبق	مسئول نمونه گیری سپس مسئول QC
1	نمونه CBC خون تام با ضد انعقاد K3EDTA جهت تست های CBC, Retic, BG, Osmotic Fragility, Fibrinogen, G6PD, WBC, Hct, Hb, Sucrose, Hams	- موارد کمتر از یک CC با هماهنگی مسئول بخش هماتولوژی انجام شود.	نمونه گیر مسئول بخش	قبل از نمونه گیری	تلفنی حضوری	مسئول بخش هماتولوژی

شماره ایستگاه	عنوان	شرح کنترل	مسئول انجام	زمان انجام	طریقه گزارش	مسئول دریافت گزارش
1	نمونه CBC خون تام با ضد انعقاد K3EDTA جهت تست های CBC, Retic, BG, Osmotic Fragility, Fibrinogen, G6PD, WBC, Hct, Hb, Sucrose, Hams					
1	نمونه CBC خون تام با ضد انعقاد K3EDTA جهت تست های CBC, Retic, BG, Osmotic Fragility, Fibrinogen, G6PD, WBC, Hct, Hb, Sucrose, Hams					
1	نمونه CBC خون تام با ضد انعقاد K3EDTA جهت تست های CBC, Retic, BG, Osmotic Fragility, Fibrinogen, G6PD, WBC, Hct, Hb, Sucrose, Hams					

شماره ایستگاه	عنوان	شرح کنترل	مسئول انجام	زمان انجام	طریقه گزارش	مسئول دریافت گزارش
1	نمونه CBC خون تام با ضد انعقاد K3EDTA جهت تست های CBC, Retic, BG, Osmotic Fragility, Fibrinogen, G6PD, WBC, Hct, Hb, Sucrose, Hams					
1	نمونه CBC خون تام با ضد انعقاد K3EDTA جهت تست های CBC, Retic, BG, Osmotic Fragility, Fibrinogen, G6PD, WBC, Hct, Hb, Sucrose, Hams					
1	نمونه CBC خون تام با ضد انعقاد K3EDTA جهت تست های CBC, Retic, BG, Osmotic Fragility, Fibrinogen, G6PD, WBC, Hct, Hb, Sucrose, Hams					

شماره ایستگاه	عنوان	شرح کنترل	مسئول انجام	زمان انجام	طریقه گزارش	مسئول دریافت گزارش

شماره ایستگاه	عنوان	شرح کنترل	مسئول انجام	زمان انجام	طریقه گزارش	مسئول دریافت گزارش