

کنترل متغیرهای قبل از آزمایش (Pre-analytical variables)

برای بهبود جواب آزمایشات فاکتورهای ایجاد کننده تغییر باید به حداقل رسانده شوند. فاکتورهای مؤثر شامل تغییرات هورمونی، استرس‌های خارجی، فعالیت بدنی و غیره می‌باشد. عوامل متغیر تصادفی باید به حداقل رسانده شود. مثلاً کورتیزول در ساعت مشخصی از شبانه‌روز نمونه‌گیری شود (برای کنترل فاکتورهای خارجی و فعالیت بیمار) شرایط نمونه‌گیری و آماده‌سازی بیمار باید استاندارد و یکسان باشد تا اثر عوامل متغیر تصادفی به حداقل رسانده شود.

عوامل متغیر مربوط به بیمار :

۱- فعالیت بدنی (Exercise)

فعالیت عضلانی اثرات موقت و طولانی مدت بر روی تست‌های آزمایشگاهی دارند.

الف- اثرات فوری فعالیت‌های عضلانی :

۱. کاهش فوری وسپس افزایش غلظت اسیدهای چرب آزاد در خون (۱۸٪ افزایش)
۲. افزایش آلانین به میزان ۱۸۰٪ در خون
۳. افزایش لاکتات به میزان ۳۰۰٪ در خون

یک ساعت پس از فعالیت عضلانی مکانیسم‌های جبران انرژی شروع به کار کرده و سبب تغییر غلظت مواد در خون بیمار می‌شود.

ب- اثرات طولانی‌تر فعالیت‌های عضلانی :

در اثر فعالیت عضلانی آنزیم‌های CPK, آلدولاز, AST و Idh افزایش می‌یابند مثلاً CPK به میزان ۱۲۵٪ افزایش می‌یابد.

ج- اثرات طولانی مدت فعالیت‌های عضلانی :

غلظت هورمون‌های جنسی افزایش می‌یابند. شش ماه پس از شروع ورزش، تستوسترون به میزان ۲۱٪، آندروستندیون به میزان ۲۵٪، LH به میزان ۲۵٪ افزایش می‌یابد. نسبت تستوسترون به SHBG در اثر فعالیت عضلانی طولانی مدت زیاد می‌شود.

۲- ناشتا بودن به مدت طولانی (Prolonged fasting)

ناشتا بودن به مدت بیشتر از ۲۴ ساعت سبب افزایش بیلی روبین سرم می‌شود. (۲۴٪ افزایش پس از ۴۸ ساعت ناشتا بودن) ناشتا بودن به مدت ۷۲ ساعت سبب کاهش گلوکز خون به میزان ۴۵ mg/dl, افزایش تری گلیسرید و گلیسرول و اسیدهای چرب آزاد خون شده ولی غلظت کلسترول ثابت می‌ماند.

۳- رژیم غذایی (Diet)

پس از غذا خوردن، تری گلیسرید و پتاسیم سرم افزایش می‌یابد، مقدار این افزایش بستگی به نوع غذا و مدت ناشتا بودن بیمار دارد. دو تا چهار ساعت پس از صرف غذای چرب، آلکالین فسفاتاز سرم افزایش می‌یابد که به علت افزایش ایزو آنزیم روده‌ای این آنزیم می‌باشد. این افزایش در افراد سکرِتور (secretor) گروه لوئیس (Lew+) و افراد گروه خونی O و B شدیدتر از سایر افراد می‌باشد.

کدورت سرم (lactescent) به علت حضور شیلولومیكرون‌ها پس از صرف غذا، سبب تداخل در بسیاری از تست‌های بیوشیمیایی میشود. رژیم غذایی حاوی مقدار زیادی پروتئین سبب افزایش اوره، آمونیاک، اسید اوریک سرم میشود ولی کراتینین سرم

ثابت می‌ماند. استفاده از روغن‌های مایع سبب افزایش نسبت اسیدهای چرب غیر اشباع به اسیدهای چرب اشباع در خون می‌شود. و سبب کاهش غلظت کلسترول خون می‌گردد. رژیم غذایی محتوی مقدار زیادی پورین (مثل جگر، گوشت قرمز، حبوبات) سبب افزایش اسیداوریک سرم می‌شود. خوردن موز، آناناس، مقدار زیاد گوجه و انبه به علت مقدار سروتونین در این میوه‌ها سبب افزایش SHIAA ادرار می‌گردد.

تغییرات در غلظت یا فعالیت مواد، تحت تأثیر تغذیه

تغییرات	ماده مورد نظر
افزایش پس از خوردن غذای چرب	تری‌گلیسرید سرم
افزایش پس از آشامیدن مقدار زیادی شیر	فسفات سرم
افزایش پس از خوردن گوشت	اوره سرم
افزایش پس از خوردن کربوهیدرات‌ها	گلوکز سرم
افزایش پس از آشامیدن مقدار زیادی شیر	کلسیم سرم
کاهش پس از رژیم بلندمدت فاقد آهن	آهن سرم
افزایش پس از آشامیدن الکل	گاماگوتامیل ترانسفراز (GGT)
افزایش پس از آشامیدن الکل	آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST)
افزایش پس از روزه‌داری	اجسام کتون ادرار
افزایش پس از مصرف سبزیجات	PH ادرار

مصرف نوشیدنی‌های حاوی کافئین سبب افزایش اسیدهای چرب آزاد غیراشباع (NEFFA) در خون میشود. این امر به علت آزاد شدن کاتکول آمین‌ها از قسمت مرکزی غده آدرنال و مغز می‌باشد.

۴- مصرف الکل (اتانل)

الف- اثرات فوری مصرف الکل :

افزایش لاکتات، اسید اوریک و متابولیت های اتانل (شامل استالدئید و استات) در خون

ب- اثرات بلند مدت مصرف الکل :

پس از دو هفته مصرف الکل، تری گلیسرید سرم به میزان ۴۰٪ افزایش یافته و ۵ هفته پس از مصرف الکل، تری گلیسرید سرم کاهش می یابد.

ج- مصرف مزمن الکل :

افزایش HDL (High density lipoprotein)، γ GT (γ -glutamyl transferase) و اسید اوریم سرم و افزایش MCV گلبولهای قرمز می شود .

اندیکاتورهای مصرف الکل در افراد الکلی شامل :

افزایش توأم HDL و γ GT و mcv به عنوان اندیکاتور مصرف مزمن الکل به کار می رود.

۵- استعمال دخانیات (Smoking)

در اثر مصرف دخانیات کربوکسی هموگلوبین خون به میزان ۸٪ می رسد. نرمال آن ۱٪ هموگلوبین است .

اثرات حاد مصرف دخانیات :

افزایش کاتکول آمین های خون و کورتیزول خون (به علت اثر نیکوتین و دخانیات)، کاهش ائوزینوفیل ها و افزایش نوتروفیل ها و منوسیت های خون می باشد.

در اثر مصرف دخانیات و تغییر هورمون ها ، اسید های چرب آزاد غیر استریفیته (NEFFA) پلاسما افزایش می یابد.

اثرات مزمن دخانیات :

افزایش هموگلوبین، گلبولهای سفید، MCV گلبولهای قرمز مشاهده می شود .
جهت ردیابی مصرف دخانیات در بیماران اندازه گیری تیوسیانات (Thiocyanate) پلاسما مشاهده می شود. مقدار نرمال آن تا ۶۲ میکرومول در لیتر ($62 \mu\text{mol/L}$) می باشد. غلظت این ماده در افراد سیگاری به بالاتر از ۱۶۱ میکرومول در لیتر ($>161 \mu\text{mol/L}$) می رسد.

۶- اثرات فیزیولوژیک داروها (Drugs)

مصرف داروها سبب اثرات زیر می شود:

الف- اثرات فیزیولوژیک *in vivo* (در داخل بدن): اثرات داروها و متابولیت‌های آنها باعث کاهش یا افزایش غلظت یا تغییر فعالیت مواد شیمیایی در بدن میشود.

ب- اثرات فیزیولوژیک *in vitro* (خارج بدن): داروها و متابولیت‌های آنها سبب تداخل در اندازه‌گیری غلظت یا فعالیت مواد شیمیایی در حین آزمایش می شود.

* پاسخ فارماکولوژیک افراد نسبت به داروها متفاوت است. پاسخ *in vivo* فرد به داروها بستگی به: خصوصیات فردی، دوز داروی مورد استفاده و اثر سایر داروها دارد. مثلاً مصرف داروهای زیر سبب کلستاز کبدی در بیمار می شود: استروئیدهای سنتتیک خوراکی، مشتقات سولفانیل اوره (مثل کلر پرومازین، تیواوراسیل، پروپیل تیواوراسیل، متی مازول، کلر پروپامید و تولبوتامید).

* مصرف داروهای ضدسرطانی سبب تخریب کبد، به علت افزایش فعالیت آمینو ترانسفرازها(ترانس آمینازها) میگردد.

* داروهای زیر سبب فعال شدن آنزیم‌های میکروزومال کبدی می شوند: باربیتورات ها، فنی توفین، تولبوتامید، کلردیازپوکساید، فنیل بوتازون، گلو تاتامید.

* داروهای پیشگیری از حاملگی خوراکی (قرصهای ضد حاملگی OCP= oral contraceptive pills) سبب تغییرات زیر می گردند:

۱- افزایش سرولوپلاسمین، ترانس کورتین، TBG، Alpha 1 anti Trypsin، ترانسفرین، آهن، تری گلیسرید، GGT، (ALT)SGPT (افزایش فعالیت آنزیم‌ها به علت افزایش تولید این آنزیم‌ها در کبد می باشد).

۲- کاهش آلبومین سرم، اوروسوموکوئید و روی (ZN) در خون.

این اثرات به علت استروژن موجود در این قرص‌ها می باشد.

۷- موقعیت بیمار در موقع نمونه گیری (Posture)

تغییر موقعیت بیمار از حالت خوابیده به نشسته یا ایستاده سبب خروج (Efflux) آب و مایعات و مواد محلول قابل عبور از داخل عروق به فضای بینابینی سلولها می گردد.

* اثرات تغییر موقعیت بیمار از حالت خوابیده به ایستاده :

افزایش آلبومین و پروتئین و پروتئین توتال سرم و افزایش فعالیت آنزیم ها، کلسیم، بیلروبین، کلسترول، تری گلیسرید، داروهای باند شده به پروتئین ها، هموگلوبین .

هماتوکریت، شمارش سلولهای خونی وغیره .

شیفیت آب و مایعات از داخل به خارج عروق سبب افزایش پروتئین توتال سرم به میزان ۱۰-۸٪ می شود. بر اساس مقدار عبور ماده مورد نظر از جدار عروق، تغییرات مواد متفاوت است. در افرادی که مایعات بیشتری مصرف کرده اند این تفاوت محسوس تر است . تغییر موقعیت بیمار سبب تغییر در غلظت هورمون ها می گردد. مثلاً در اثر تغییر حالت بیمار از خوابیده به

ایستاده نور آدرنالین افزایش می یابد. (۲ برابر)، رنین پلاسما افزایش می یابد (به علت کاهش حجم خون ورودی به کلیه)، آلدوسترون افزایش می یابد (به علت افزایش آنژیوتانسین II) و 8-arg-vasopressin خون افزایش می یابد. در صورت تکرار تست بر روی بیمار باید دقت شود که موقیعت بیمار همواره ثابت شود. (مثلا همیشه نشسته باشد)

۸- بستن تورنیکت

بستن تورنیکت سبب برجسته شدن وریدها و تسهیل خونگیری می شود. کاربرد نامناسب تورنیکت و باز و بسته کردن مشت، باعث خطا در تستها می شود. باز و بسته کردن مشت و پمپ کردن دست (Pumping) در طی نمونه گیری سبب افزایش غلظت پتاسیم، لاکتات، فسفر می شود. با افزایش لاکتات خون، PH خون کاهش یافته و غلظت کلسیم یونیزه سرم بالا می رود.

بستن طولانی مدت تورنیکت سبب افزایش مواد باند شده به پروتئین ها می شود. (Hemoconcentration) کلسترول، تری گلیسرید، کلسیم و آهن سرم زیاد می شود. بستن تورنیکت به مدت ۳ دقیقه سبب افزایش پروتئین توتال به میزان ۰.۵٪، کلسترول ۰.۵٪، آهن ۰.۶٪، بیلیروبین ۰.۸٪، AST به میزان ۱۰٪ می شود. برای اندازه گیری لاکتات سرم، نمونه گیری باید بستن تورنیکت انجام می شود. چون در اثر بستن تورنیکت متابولیسم سلولها از هوازی به بیهوازی تغییر یافته و غلظت لاکتات سرم افزایش می یابد. توصیه می شود نمونه گیری LDH, CPK بدون کاربرد تورنیکت انجام شود. جهت تست های دیگر تورنیکت بیشتر از ۱ دقیقه روی بازو بسته نشود.

۹- استرس (Stress)

استرس سبب افزایش هورمون آدرنال می شود. اضطراب سبب تنفس (هیپرونتیلیاسیون) و اختلال اسید و باز خون شده و لاکتات سرم را افزایش می دهد. در اثر اضطراب اسیدهای چرب آزاد غیر استریفیه خون (NEFFA) افزایش می یابند.

۱۰- تفاوت خون سرخرگی و سیاهرگی

غلظت مواد شیمیایی در خون سرخرگی و سیاهرگی تفاوت دارد. غلظت مواد شیمیایی در خون سرخرگی در تمام بدن ثابت است ولی غلظت مواد شیمیایی در خون سیاهرگی تابع مقدار فعالیت هر عضو می باشد. مثلا غلظت کلسترول خون سرخرگی بالاتر از خون سیاهرگی می باشد. غلظت مواد شیمیایی در خون مویرگی با سیاهرگی تفاوت دارد. مثلا گلوکز خون مویرگی ۳۰-۱۰٪ بیشتر از گلوکز خون وریدی می باشد. HCT, Hb خون کمویرگی بیشتر از خون وریدی است.

۱۱- خونگیری از بیماری که به دست او سرم (IV) وصل شده است.

چون ترکیبات موجود در سرم تزریق شده باعث تغییر غلظت مواد شیمیایی شده یا آنها را رقیق می کنند در این حالت لازم است حتی الامکان از بیماری که سرم به او تزریق می شود خونگیری نشود. در صورت نیاز به خونگیری لوله تزریق سرم بسته شود و از دست دیگر بیمار نمونه گیری شود.

۱۲- تداخل نونه(همولیز)

همولیز باعث تداخل در بسیاری از تستهای آزمایشگاهی می شود. همولیز به معنی پاره شدن (لیز شدن) غیر طبیعی گلوله های قرمز می باشد. همولیز ممکن است invivo (در داخل بدن) invitro (در خارج از بدن) اتفاق افتاده باشد. همولیز invitro

در موقع خون گیری با نیدل های گشادتر بیشتر از خون گیری با نیدل های تنگ تر مشاهده می شود. کشیدن خون با سرعت به درون نیدل و سرنگ سبب ایجاد جریان گردابی و پاره شدن گلبولهای قرمز و آزاد شدن هموگلوبین آنها می شود.

علل شایع همولیز *invitro* :

- ۱- الکل مصرف شده در موقع تمییز کردن پوست خشک نشود.
- ۲- همولیز در سانتریفوژ به علت سرعت زیاد آن .
- ۳- سانتریفوژ و جدا کردن سرم در هنگامی که لخته شدن کامل خون هنوز اتفاق نیفتاده است.
- ۴- بالا رفتن حرارت در موقع سانتریفوژ (سانتریفوژ با دور و زمان زیاد سبب افزایش حرارت داخل سانتریفوژ و همولیز گلبولهای قرمز می گردد).
- ۵- نامناسب بودن سایز نیدل (نیدل های ریز)
- ۶- تکان شدید نمونه خون داخل سرنگ یا لوله
- ۷- تخلیه سریع خون یا تخلیه با سر سوزن
- ۸- ذوب و فریز مکرر خون منجمد
- ۹- آلودگی به آب یا دترژانت در لوله های لخته
- ۱۰- ماندن طولانی نمونه در شرایط نامناسب
- ۱۱- فقدان خلاء در سرنگ یا وکیوتینر و ورود با تاخیر نمونه در سرنگ یا لوله خلاء
- ۱۲- یخ زدن خون در یخچال

اثرات همولیز گلبولهای قرمز :

- ۱- آزاد شدن مواد داخل گلبولهای قرمز (شامل آب) و ورود آنها به سرم
 - ۲- تداخل مستقیم هموگلوبین با واکنش های متفاوت شیمیایی
- اثرات همولیز در سرم وقتی با چشم مشاهده می شود که غلظت هموگلوبین آزاد در پلاسما به 200 mg/l یا 20 mg/dl برسد. در سرم های ایکتریک (یرقانی) ممکن است همولیز با چشم تشخیص داده نشود.
- اثرات همولیز گلبولهای قرمز (*in vitro*) : افزایش اسید فسفاتاز سرم، افزایش روی و منیزیم سرم، افزایش البومین به روش BCG
- افزایش CPK (به علت ادنیلات کیناز گلبولهای قرمز)، افزایش پتاسیم سرم و غیره.
- همولیز باعث تغییر الگوی (pattern) الکتروفورز پروتئین های سرم می شود.
- همولیز بیلی روبین را به روش اسپکترومتری مستقیم افزایش و به روش دیازو کاهش می دهد.
- اثرات ترومبولیز (لیز شدن پلاکتها) به صورت *in vitro* : افزایش پتاسیم، منیزیم، اسید فسفاتاز و آلدولاز سرم و غیره.
- اثرات گرانولولیز (لیز شدن گلبولهای سفید) به صورت *in vitro* : افزایش مورامیداز (لیزوزیم) سرم، فسفوگگرو ایزومراز، ارژیناز سرم، افزایش G6PD سرم (Glucose-6-p-dehydrogenase) و گلوتامات دهیدروژناز سرم و غیره.

۱۳- مواد ضد انعقاد (Anticoagulants)

استفاده از مواد ضد انعقاد باعث تغییرات زیادی در تست های بیوشیمی می گردد:

اکسالات پتاسیم سبب خروج آب از گلبول های قرمز و ورود آن به پلاسما شده و باعث رقت آن می شود .

EDTA (اتیلن دی آمین تترااستیک اسید) و دیگر عوامل Chelating باعث مهار آنزیم های پلاسما می شود. (مگر اینکه کلسیم اضافه شود)

آمیلاز سرم و پلاسما توسط سیترات سدیم و اکسالات مهار می شود .

LDH و اسید فسفاتاز توسط اکسالاتها مهار می شود .

اکسالاتها و سیترات سدیم و EDTA سبب کاهش کلسیم به روش اسپکتروفتومتری می شوند .
ملح سدیم و پتاسیم هیپارین، EDTA و فلوراید سبب تداخل در اندازه گیری الکترولیت ها می شوند.
فلوراید باعث مهار گلوکز اکسیداز و اسید فسفاتاز شده ولی فعالیت آمیلاز را افزایش می دهد.

۱۴- سرم های ایکتریک (Icteric serum)

زردی وقتی در سرم مشاهده می باشد که بیلی روبین سرم به $2/5 \text{ mg/dl}$ برسد. بیلی روبین (به مقدار بیشتر از معمول) باعث واکنش های زیر می شود :

۱- آلبومین به روش HABA (Hydroxy Azo Benzoic Acid)

۲- کلسترول به روش کلروفریک

۳- گلوکز به روش اورتوتولوئیدین

توتال پروتئین به روش بیوره

*بیلی روبین باعث افزایش کاذب مواد فوق می شود.

برای تصحیح ایکتریک بودن سرم ها از روش بلانک سرم (serum blank) یا خواندن جذب نوری در دو طول موج متفاوت (dual wavelength spectrophotometry) استفاده می شود.

۱۵- سرم های لیپمیک یا کدر (lactascent serum)

افزایش تری گلیسرید سرم باعث تداخل در اندازه گیری سایر موادی که در همان طول موج، جذب نوری دارند، می گردد. مثلا باعث افزایش :

۱- آلبومین به روش BCG (Bromo cresol green)

۲- کلسیم به روش CP (Cresol phetalein)

۳- فسفر به روش مولیبدات اسید امونیوم

برای تصحیح اثرات سرم لیپمیک از بلانک سرم استفاده می شود. حتی بلانک سرم هم قادر به حذف کامل همه این تداخل ها نمی باشد. سرم و پلاسما وقتی کدر می شود که تری گلیسرید بالاتر از 400 mg/dl برسد. فعالیت آمیلاز توسط غلظت بالای لیپید سرم مهار می شود. (علت این امر مشخص نیست، ممکن است قسمتی از لیپیدهای سرم باعث مهار انزیم شود یا مواد مهارکننده همراه لیپیدها باعث مهار انزیم شود) هیپرلیپدمی (بالا بودن چربی خون) سبب مهار انزیم های اوریکاز و اوره آز شده و با استفاده از این روش ها باعث کاهش کاذب اوره و اسید اوریک می شود.

تری گلیسرید بالاتر از 500 mg/dl سبب کاذب CPK، بیلیروبین، توتال پروتئین سرم می شود با استفاده از بلانک سرم قابل اصلاح نمی باشد. راه حل اصلی بر طرف کردن تداخل سرم های لیپمیک استفاده از اولترا سانتریفوژ و تکرار تست ها بر روی نمونه جدید (با مدت ناشتا بودن بیشتر) می باشد.

منبع:

کتاب جامع تجهیزات و فرآورده های آزمایشگاهی (جلد دوم) ۱۳۸۲