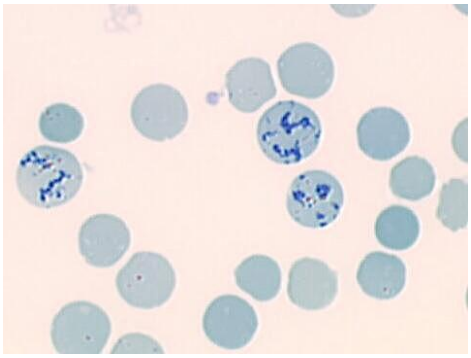
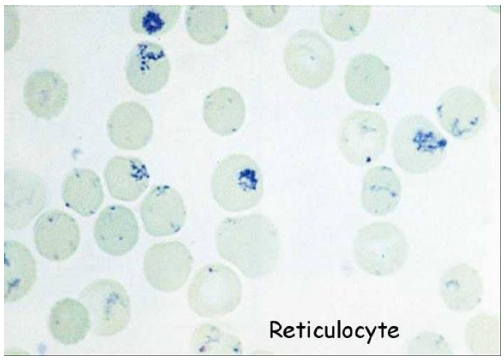
آزمایش شمارش رتیکولوسیت

رتیکولوسیت ها گلبولهای قرمز نابالغ حاوی باقیمانده های اسید ریبونوکلئیک ریبوزومی هستند که به تازگی از مغز استخوان آزاد شده اند . ویژگی ریبوزوم ها ، ایجاد واکنش با رنگهای قلیائی خاص مثل آزور B ، بریلیانت کرزیل بلو یا نیو متیلن بلو (NMB) و تشکیل رسوبی بصورت گرانول یا فیلامانت آبی یا بنفش می باشد . این واکنش فقط با رنگهای حیاتی و در نمونه های فیکس نشده صورت می گیرد. به علت زنده بودن سلول ها هنگام رنگ آمیزی، به این نوع رنگ آمیزی، رنگ آمیزی حیاتی اطلاق می گردد.
مراحل مختلف بلوغ رتیکولوسیت ها با توجه به مشخصات مرفولوژیکی، قابل شناسایی می باشند. نابالغ ترین رتیکولوسیت ها حاوی بیشترین مقدار مواد رسوبی ، و بالغ ترین آنها فقط دارای چند جز یا رشته کوتاه از این مواد مي باشند. بر این اساس ، رتیکولوسیت ها به چهار گروه تقسیم می شوندکه گروه1 دارای کلامپ رتیکولوم و گروه 4 حاوی چند گرانول کوچک می باشند. گروه 2 و3 نیز از لحاظ مرفولوژی بین این دو گروه قرار می گیرند. چون اکثر رتیکولوسیت هایی که در خون محیطی دیده می شوند از گروه4 هستند، شناسايي دقيق رتيكولوسيتها اثر قابل توجهی بر روی صحت شمارش این سلولها دارد . بنابراین ***گلبولی می بایست به عنوان رتیکولوسیت شمارش گردد که دارای هسته نبوده و داخل آن دو یا چند قطعه از رسوب آبی رنگ ، که همان RNA ریبوزومی است، دیده شود.***
رتیکولوسیتها در رنگ آمیزی معمولی(با رنگ های گروه رومانوفسکی)، بدلیل ترکیب بازوفیلي سیتوپلاسم و اسیدوفیل هموگلوبین حالت بازوفیل منتشری پیدا کرده و به بصورت "پلی کروماتیک" مشاهده می گردند . این پدیده بطور معمول در رتیکولوسیتهای نابالغ که دارای بیشترین میزان RNA هستند،دیده مي شود .





رنگ آمیزی

1- تهیه محلول رنگ

رنگ توصیه شده در مراجع معتبر بین المللی نیو متیلن بلو می باشد برای تهیه محلول رنگ، می بایست 0/1 گرم رنگ نیومتیلن بلو (NMB) یا آزور B خالص را در 100 میلی لیتر بافر فسفات ایزو اسموتیک با PH = 6/ 5 حل نمود . برای ساخت بافر ذکر شده از محلولهای زیر استفاده می شود :

A: $NaH_2PO_4 , 2H_2O$ 23.4g/L (150mmol/L)
B: Na_2HPO_4 21.3 g/L (150mmol/L)

در صورتیکه 51 میلی لیتر از محلول A با 35 میلی لیتر از محلول B مخلوط گردد ، PH بافر حاصل ، 6/5 خواهد بود .
رنگ را میتوان در100 میلی لیتر سیترات سالین نیز حل کرد که برای تهیه سیترات سالین ، یک حجم سیترات سدیم 30 گرم در لیتر با 4 حجم کلرید سدیم 9 گرم در لیتر مخلوط می شود.

محلول رنگ را می بایست درون شیشه ای قهوه ای رنگ ریخته و در مدت 24 ساعت به دفعات تکان داد .این محلول در دمای 2-6 درجه سانتیگراد قابل نگهداری می باشد . در این دما ، نیمه عمر رنگ حدود یک ماه است . هر بار قبل از استفاده، باید حجم مورد نیاز از رنگ را به منظور خارج نمودن هر گونه ذره اضافی یا رسوب ، با کاغذ صافی فیلتر نمود.

2- روش رنگ آمیزی

برای رنگ آمیزی باید دو یا سه قطره رنگ NMB را با پیپت پاستور داخل لوله شیشه ای یا پلاستیکی به ابعاد 10×75 میلی متر ریخته و به همین حجم ، خون حاوی ضد انعقاد EDTA به آن اضافه کرده و پس از مخلوط کردن به مدت 15 تا 20 دقیقه در دمای 37 درجه نگهداری نمود . قبل از تهیه گسترش می بایست لوله را به آرامی تکان داد تا گلبولهای قرمز مجددا به حالت سوسپانسیون درآیند. گسترش ها پس از تهیه و خشک شدن، بدون فیکساسیون و انجام رنگ آمیزی دیگری،توسط میکروسکوپ قابل بررسی می باشند .
حجم دقیق خونی که به محلول رنگ اضافه می شود بستگی به تعداد گلبولهای قرمز دارد . در موارد آنمی، مقدار خون بیشتر و در پلی سیتمی، مقدار خون کمتری ، نسبت به حالت طبیعی ، می بایست با رنگ مخلوط شود .
در یک گسترش مناسب ، ریبوزوم رتیکولوسیت ها به رنگ آبی در آمده و سلولهای بالغ در سطح لام به شکل سایه های کمرنگ آبی مایل به سبز دیده می شوند .
رنگ آمیزی و شمارش رتیکولوسیت خون در شرایطی که نمونه بعد از نمونه گیری در دمای 2-6 درجه نگهداری شود تا 24 ساعت امکانپذیر می باشد . با گذشت 8-6 ساعت از زمان نمونه گیری و ماندن خون در حرارت آزمایشگاه ، رتیکولوسیت ها به تدریج بالغ شده و به گلبول قرمز بالغ تغییر مي یابند که این امر بطور کاذب موجب کاهش درصد رتیکولوسیت ها می گردد. ***بنابراین توصیه می شود شمارش رتیکولوسیت بلافاصله بعد از جمع آوری نمونه انجام شود.***

نحوه شمارش و گزارش درصد رتیکولوسیت

برای شمارش و تعیین درصد رتیکولوسیت ، گسترش نباید خیلی نازک تهیه شده باشد و محلی از گسترش جهت شمارش انتخاب شود که سلولها به خوبی رنگ شده و روی هم نیز قرار نگرفته باشند . برای تعیین درصد رتیکولوسیت ها از عدسی شیئ روغنی و در صورت امکان از عدسی های چشمی دارای دیافراگم قابل تنظیم استفاده میشود. تعداد گلبولهای قرمزی که باید مورد ارزیابی قرارگیرند رابطه معکوس با تعداد رتیکولوسیت ها دارد. بنابراین به منظور افزایش دقت در شمارش ، هرچه تعداد رتیکولوسیت ها کمتر باشد می بایست تعداد گلبولهای قرمز بیشتری مورد بررسی قرارگیرند و بالعکس.

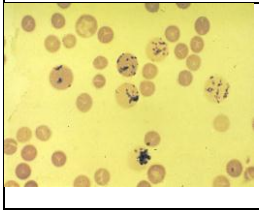
مقادیر مرجع

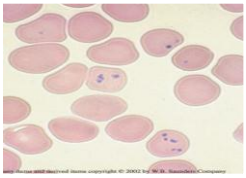
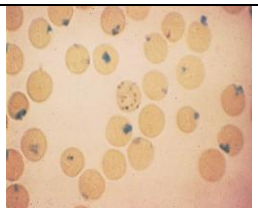
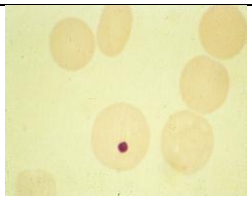
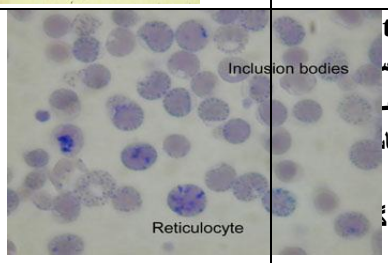
در بزرگسالان سالم شمارش رتیکولوسیت 0/5-1/5 درصد و در نوزادان 2-6 درصد می باشد که تا انتهای هفته دوم زندگی ، به میزان بزرگسالان تنزل می یابد.

افتراق رتیکولوسیت ها از دیگر انکلوزیونهای گلبولهای قرمز

انکلوزیونهای دیگری مثل هاینز بادی, Hb H ، هاول ژولی بادی و اجسام پاپن هایمر در تشخیص افتراقی با رتیکولوم رتیکولوسیت ها قرار می گیرند که در جدول زیر مشخصات هریک آمده است.
در بین این انکلوزیونها ، مشکل عمده اجسام هاینز هستند که هر چند در رنگ آمیزی NMB به رنگ آبی روشن تری مشاهده شده و عمدتا در حاشیه و نزدیک به غشا سلول قرار میگیرند ولی تفکیک آنها از دانه های ریبوزومی بسیار مشکل است . برای برطرف کردن این مشکل می توان اسمیر رنگ شده رتیکولوسیت را با متانول فیکس کرد که این امر موجب بی رنگ شدن اجسام هاینز شده ولی تاثیری بر روی رتیکولوسیت ندارد.

جدول : مشخصات ظاهری انکلوزیون های مختلف گلبول قرمز در رنگ آمیزی روش NMB

نام	ماهیت	مشخصات	تصویر
رتیکولوم رتیکولوسیت	RNA ریبوزومی	رشته های رتیکولوم یا گرانول های کوچک پراکنده	

پاپن هایمر	انکلوزیون حاوی آهن	یک یا بیشتر گرانول آبی رنگ با تمایل به حاشیه سلول که از رتیکولوم ، تیره تر رنگ می گیرند.	
هاینز بادی	هموگلوبین دناچوره	بزرگتر از پاپن هایمر با شکل نامنظم ، آبی کمرنگ ، معمولا چسبیده به غشا سلول ، که گاهی باعث برآمدگی غشا به بیرون می گردد.	
هاول ژولی بادی	DNA	بزرگتر از پاپن هایمربا شکل منظم، آبی کمرنگ که با فاصله از غشا سلول قرار می گیرند.	
Hb H	تترامر زنجیره ß هموگلوبین	بصورت متعدد (tiple و گرد ،به رنگ آبی-س به سلول ظاهر توپ گلف دهد، معمولا با انکوبا کوتاه مدت مشخص گردد و برای شکل نیازمند زمان است.	

.

References:

1-H44-A methods for Reticulocyte counting(Flow Cytometry and Supravital Dye); Approved Guideline, NCCLS VOL.17 NO.18

2-Dacie and Lewis PRACTICAL HAEMATOLOGY, TENTH EDITION