

اندازه گیری هموگلوبین A₂

اصول - خطاها - دامنه مرجع - تفسیر نتایج

اندازه گیری هموگلوبین F

اصول - خطاها

ترجمه و گردآوری : دکتر کتایون خداوردیان

ویرایش دوم

تیر ۱۳۸۷

آزمایشگاه مرجع سلامت

اندازه گیری هموگلوبین A2

یکی از تست های تشخیصی مهم جهت تأیید وجود بتا تالاسمی مینور تعیین درصد هموگلوبین A2 می باشد. هموگلوبین A2 را می توان به روش های زیر اندازه گیری نمود:

- کروماتوگرافی تعویض یونی

۱-ستون میکرو

۲- HPLC (کروماتوگرافی تعویض یونی کاتیونیک)

- الکتروفورز استات سلولز همراه با الوشن

اندازه گیری هموگلوبین A2 با استفاده از ستون میکرو

کروماتوگرافی تعویض یونی از انواع کروماتوگرافی های مایع - جامد بوده که بر اساس واکنش متقابل گروه های باردار مولکول هموگلوبین و رزین ، جداسازی صورت می گیرد. بر روی رزین یونهای وجود دارد که قابل تعویض با یونهای همبار خود در همولیزات می باشند. در این روش از رزین آنیونیک دی اتیل امینواتیل سلولز DEAE52 استفاده می گردد.

اساس روش :

۱- تورم رزین با بافر و به تعادل رسیدن آن با بافر تا PH رزین به PH بافر برسد

۲- اضافه نمودن همولیزات به ستون

۳- جداسازی انتخابی اجرای نمونه بوسیله تغییر PH یا قدرت یونیک بافر

در اندازه گیری هموگلوبین A2 به روش کروماتوگرافی ستونی با استفاده از ستون میکرومی توان از بافر گلايسين یا بافر تریس استفاده نمود.

۱) روش گلايسين : بافر اول ترکیبی از گلايسين و سیانور پتاسیم (KCN) می باشد و بافر دوم همان ترکیب بافر اول به همراه کلور سدیم می باشد که با اضافه نمودن نمک به بافر دوم قدرت یونی آن افزایش یافته و سایر هموگلوبین ها را از ستون خارج می سازد. PH رزین باید توسط HCL یک مولار و به کمک PH متر طوری تنظیم شود که پائین تر از نقطه ایزوالکتریک هموگلوبین A2 بوده و بالاتر از نقطه ایزوالکتریک سایر هموگلوبین ها باشد ، لذا بلافاصله پس از جذب همولیزات به روی رزین و اضافه نمودن بافر اول ، هموگلوبین A2 بصورت یک حلقه از ستون خارج می شود ، سپس با اضافه کردن بافر دوم ، با افزایش قدرت یونی ، سایر هموگلوبین ها نیز از ستون خارج می شوند.

۲) روش تریس : روش پیشنهادی NCCLS می باشد. از محلول ذخیره تریس سه بافر با PH ۸/۵ ، ۸/۳ ، ۷ به کمک HCL غلیظ تهیه می گردد. جداسازی در این روش بر اساس تغییر در PH بافر صورت می گیرد. در این روش PH بافر دوم (۸/۳) بسیار مهم می باشد (در این PH هموگلوبین A2 از ستون خارج می شود) این روش بدلیل استفاده از بافرهای متعدد (۳ بافر) در آزمایشگاهها کمتر مورد استفاده قرار می گیرد. قابل ذکر است که درصد هموگلوبین A2 با استفاده از بافر تریس مختصری پائین تر از روش استفاده از بافر گلايسين میباشد. هم چنین در مقایسه با روش تریس ، بافر گلايسين حساسیت کمتری به تغییرات مختصر PH دارد.

با تهیه رزین با بافر گلايسين و PH مناسب جهت جداسازی هموگلوبین A2 می توان نمونه هایی که حاوی هموگلوبین S میباشد را نیز جدا کرد. (طول رزین داخل ستون باید افزایش یابد) بدلیل عدم ساخت رزین و بافر در آزمایشگاهها مراحل کنترل کیفی آن ذکر نمیگردد.

اکثر کیت های اندازه گیری هموگلوبین A2 موجود در ایران بر اساس کروماتوگرافی تعویض یونی با استفاده از بافر گلايسين می باشد که جدا سازی هموگلوبین A2 بافر دوم به کمک بافر اول یا همان محلول Developer صورت می گیرد. با تهیه لوله توتال (آب مقطر به همراه همولیزات) بجای استفاده از بافر دوم درصد هموگلوبین A2 محاسبه می گردد.

روش کار : با توجه به دستورالعمل درون کیت می باشد لذا از ذکر آن خودداری می گردد.
(۳) *دستور العمل داخل کیت باید بدقت خوانده شود.

تهیه نمونه : خون به همراه ماده ضد انعقاد EDTA مناسب می باشد. حداکثر زمان نگهداری خون در دمای چهار درجه (یخچال) ۸ روز می باشد . بهتر است همولیزات تازه و در روز آزمایش تهیه شود.

* نکات مهم در نقل و انتقال کیت هموگلوبین A2

- ۱- رعایت زنجیره سرد (در مورد کیت هایی که باید حتما" در یخچال نگهداری شوند)
- ۲- بررسی صاف بودن ستونهای داخل کیت (سر و ته نبودن ستونها)

* رعایت نکات زیر در هنگام اندازه گیری هموگلوبین A2 توصیه می گردد:

- ۱- در صورتی که ژل داخل ستونها تغییر رنگ داده باشند نباید مورد استفاده قرار گیرند
- ۲- قبل از استفاده از ستونها و بافر باید حتما" به دمای اتاق برسند. (در مورد کیت هایی که در دمای یخچال نگه داری می شوند)
- ۳- بهتر است از پی پت پاستور تمیزو یا سمپلر با نوک نو جهت مخلوط نمودن رزین داخل ستونها با بافر و حل شدن حبابهای هوای داخل رزین استفاده نمود.
- ۴- ستونها باید از یک Flow rate مناسب برخوردار باشند $1ml/4min$ ، $10-20 ml/hour$ -۵ قبل از تهیه همولیزات باید نمونه خون تام کاملاً" مخلوط شود .
- ۶- پس از تهیه همولیزات بهتر است سریعتر کروماتوگرافی انجام شود (پس از لیز کامل گلبول های قرمز)
- ۷- قبل از نمونه گذاری به هیچ وجه نباید رزین خشک شود. به محض اینکه محلول رویی رزین خارج شد باید همولیزات به ستون اضافه شود.
- ۸- از سمپلر کالیبره باید جهت برداشت نمونه خون، بافر و همولیزات استفاده نمود.
- ۹- باید از لوله های مدرج استاندارد جهت جمع آوری هموگلوبین A2 از ستون و تهیه لوله توتال استفاده نمود. در صورت عدم دسترسی به لوله های فوق لوله های معمولی را به روش دستی (قلم الماس ، ماژیک) مدرج نمایید.
- ۱۰- افزودن همولیزات باید به آرامی و درست در سطح رزین صورت گیرد و سطح آن نباید در هنگام نمونه گذاری آسیب ببیند.
- ۱۱- بهتر است از یک نوک سمپلر جهت ریختن همولیزات بداخل ستون و لوله توتال استفاده شود .
- ۱۲- به محض جذب شدن همولیزات بر روی رزین باید بلافاصله بافر اضافه شود.
- ۱۳- اگر قبل از جذب کامل همولیزات بر روی رزین، محلول بافر ریخته شود باعث کاهش کاذب هموگلوبین A2 می گردد.
- ۱۴- باید دقت شود تمامی بافر اضافه شده از ستون خارج شود.
- ۱۵- قبل از خواندن جذب نوری ، باید لوله A2 و توتال کاملاً" مخلوط شوند.
- ۱۶- باید از یک اسپکتروفتومتر کالیبره جهت خواندن جذب نوری لوله ها استفاده شود.

۱۷- باید از یک نمونه که هموگلوبین A2 آن مشخص شده است (یا در صورت دسترسی به کنترل تجاری) به عنوان نمونه کنترل در هر سری کاری استفاده گردد.
در صورتی که نمونه کنترل در محدوده مورد انتظار بخواند، نیازی به انجام نمونه های بیماران بفرم دوتایی نمی باشد.

دامنه مرجع:

در کتب مرجع پیشنهاد میگردد که هر آزمایشگاه دامنه مرجع خود را با استفاده از حداقل ۲۰ نمونه خون فرد سالم (هموگلوبین و اندکس های گلبولی طبیعی) بدست آورد و تفسیر نتایج هموگلوبین A2 در مقابل این دامنه صورت گیرد. قابل ذکر است که دامنه مرجع ممکن است مختصری در روش های مختلف اندازه گیری هموگلوبین A2 و در بین آزمایشگاهها متفاوت باشد. (دامنه مرجع ممکن است در روش HPLC 0.1-0.2% بالاتر باشد).

بطور معمول دامنه مرجع هموگلوبین A2 بر طبق توصیه NCCLS، ۱/۵-۳/۵٪ می باشد در حالی که کتاب خون شناسی Dacie ۲-۳٪ را پیشنهاد میکند. در ایران نیز بنظر می رسد که دامنه پیشنهادی فوق قابل قبول تر باشد. در نهایت بدنبال تعیین دامنه مرجع هم، هنوز مشکلاتی در تفسیر نتایج لبه مرزی Border line وجود دارد. در این موارد تکرار نتایج نیز ممکن است 0.1-0.2% تفاوت نشان دهد. طبق پیشنهاد کتاب خون شناسی Dacie بهتر است نتایج 3.4-3.7% هموگلوبین A2 بعنوان لبه مرزی در نظر گرفته شود و هموگلوبین A2 در همان نمونه و یک نمونه مجدد تازه تکرار شود.

* تفسیر نتایج هموگلوبین A2 باید در کنار شمارش گلبولهای قرمز، میزان هموگلوبین، اندکس های گلبولی و بررسی گسترش خون محیطی فرد صورت گیرد. در نهایت در موارد مشکوک و لبه مرزی باید بررسی فامیلی و آزمایش های تکمیلی نظیر جدا سازی زنجیره ها و بررسی DNA صورت گیرد.

دامنه مرجع %	تفسیر
>7	- وجود هموگلوبین A2 به تنهایی بسیار نادر است - موارد نادر موتاسیونهای β تالاسمی
3.8-7	- صفت β تالاسمی - هموگلوبین ناپایدار - صفت هموگلوبین S - آنمی داسی شکل - آنمی مگالوبلاستیک
3.4-3.7	- فقر آهن بسیار شدید همراه با صفت β تالاسمی - همراهی واریانت های زنجیره دلتا (δ) با صفت β تالاسمی - تاثیر متقابل تالاسمی α و β - موتاسیونهای نادر β تالاسمی - حضور هموگلوبین S (در این مورد صحت اندازه گیری هموگلوبین A2 مشکل می شود) - تاثیر متقابل تالاسمی α و هموگلوبین S - خطاهای آنالیتیکال (آزمایش باید تکرار شود)
2-3.3	- فرد طبیعی - دلتا بتا (δ β) تالاسمی (اگر هموگلوبین F بالا باشد) - موارد نادر صفت β تالاسمی (شامل همراه شدن β با دلتا تالاسمی و α و β تالاسمی) - صفت α تالاسمی
<2	- دلتا بتا (δ β) تالاسمی (اگر هموگلوبین F بالا باشد) - صفت α تالاسمی - بیماری هموگلوبین H - حضور واریانت های زنجیره دلتا

- این متد برای اندازه گیری هموگلوبین A2 اختصاصی نیست بطوری که بسیاری از هموگلوبین های همبار با هموگلوبین A2 نیز از ستون خارج می شوند که شامل هموگلوبین arab C, E, O و بعضی از واریانت های هموگلوبین A2 (A'2) و زنجیره دلتا میباشند. لذا هموگلوبین A2 از این هموگلوبین ها قابل تفکیک نیست.

- در مواردی که هموگلوبین A2 بیشتر از 7٪ می باشد باید به وجود هموگلوبین های arab C, E, O شک نمود که همراه با هموگلوبین A2 از ستون خارج می شوند. در این مورد نیاز به بررسی تکمیلی نظیر الکتروفورز هموگلوبین در PH=6- و PH=8.4 و بررسی فامیلی می باشد.

- اگر تمامی همولیزات اضافه شده یکباره از ستون پایین آید، باید به وجود سایر هموگلوبینوپاتی ها نظیر هموگلوبین S یا D و G و یا هموگلوبین E, C شک نمود.

- اندازه گیری هموگلوبین A2 به روش کروماتوگرافی ستونی نباید در بیمارانی که اخیراً خون دریافت کرده اند صورت گیرد.

در صورت وجود هموگلوبین A2 بیش از ۷٪ در کروماتوگرافی ستونی مراحل زیر می بایست انجام گیرد:

۱- انجام الکتروفورز استات سلولز در $PH=8.4$ ← تایید وجود باند پر رنگ در ناحیه هموگلوبین A2

۲- انجام الکتروفورز سیترات اگر در $PH=6-6.2$

الف) در صورت مشاهده باند در منطقه هموگلوبین C ← بیمار هموگلوبین C دارد که مقدار بدست آمده برای هموگلوبین A2 مجموع هموگلوبین A2 و C است.

ب) در صورتیکه باندی در منطقه هموگلوبین C دیده نشود ← بیمار احتمالاً هموگلوبین E یا O دارد که جهت تایید وجود هموگلوبین E ، آزمایش رسوب با ایزوپروپانول انجام می گردد.

ج) در صورت مشاهده باندی در منطقه هموگلوبین S ← نمونه ممکن است حاوی هموگلوبین S یا C-Harlem باشد، که جهت تایید وجود هموگلوبین S تست حلالیت انجام می گردد.

د) اگر باندی در منطقه بین محل نمونه گذاری وباند هموگلوبین S دیده شود ← نمونه حاوی هموگلوبین O arab خواهد بود.

Anode(+)

C

S C-Harlem

..... O_{arab}
Origin.....

A D,E,G,Lepore,H,I,N,J

FBarts

Cathode(-)

تصویر شماتیک جدا سازی هموگلوبین ها در الکتروفورز سیترات آگار

اندازه گیری هموگلوبین A2 به روش HPLC

در این روش از ستون های تعویض کننده کاتیونی استفاده می گردد و دارای دقت و صحت قابل قبول می باشد. پس از جذب همولیزات در ستون ، با تغییر قدرت یونی بافروراینت های هموگلوبین قابل جدا سازی می باشند. هموگلوبین ها براساس شارژ الکتریکی خود در زمان مشخصی **Retention Time** از ستون خارج می گردند، که مبنای جدا سازی این متد می باشد.

مزایا:

- حجم کم نمونه (در حدود ۵ میکرو لیتر)
- زمان کوتاه اندازه گیری
- تعیین در صد هموگلوبین **A2, F** و بسیاری از واریانت های هموگلوبین در هر سری کاری (هموگلوبین های **S, C** قابل جداسازی اند)

معایب :

- هموگلوبین **E, Lepore** بطور همزمان با هموگلوبین **A2** از ستون خارج می شوند. در این موارد باید از روش های تکمیلی تأیید کننده استفاده گردد.
- هموگلوبین **D** ایران با هموگلوبین **A2** همزمان از ستون خارج می گردند
- هزینه بالا

الکتروفورز استات سلولز همراه با الوشن

بدنبال الکتروفورز استات سلولز و جداسازی باند ها، منطقه هر باند بریده شده و عمل الوشن در مجاورت آبمقطر صورت خواهد گرفت . با خواندن جذب نمونه در مقابل لوله شاهد در طول موج ۴۱۵ نانومتر درصد هموگلوبین تعیین می گردد. قابل ذکر است که این روش جهت تعیین درصد هموگلوبین **A2** در حضور سایر هموگلوبین های همبار با هموگلوبین **A2** از صحت مناسب برخوردار نمی باشد.

هموگلوبین F

سه روش رایج اندازه گیری کمی هموگلوبین **F** عبارتند :

۱- روشهای مقاومت نسبت به قلیا

۲- کروماتوگرافی : ستونی - **HPLC**

۳- روشهای ایمونولوژیک

روش مقاومت قلیا بدلیل داشتن عدم دقت و صحت مناسب در دامنه ۲-۴۰ درصد بطور گسترده در آزمایشگاهها مورد استفاده قرار میگیرد. روش پیشنهادی **NCCLS** روش **Betke** می باشد که قابل قبول ترین روش ، برپایه مقاومت قلیایی می باشد. در این روش پس از تبدیل هموگلوبین به سیان مت هموگلوبین (به کمک محلول درابکین) با اضافه نمودن یک قلیا قوی، و بدنبال آن توقف فرایند دناتوره شدن با اضافه نمودن محلول سولفات آمونیم ، هموگلوبین **F** اندازه گیری می گردد. قابل ذکر است که روش **Singer** بدلیل نیاز به نمونه کمتر و مراحل ساده تر می تواند جایگزین مناسبی باشد ، ولی باید توجه نمود که جهت مقادیر هموگلوبین **F** کمتر از ۵ درصد از صحت لازم برخوردار نیست. (هم چنین عدم دقت آن نیز کمتر است) از مزایای تبدیل هموگلوبین به سیان مت هموگلوبین در روش بتکه، عدم افزایش کاذب هموگلوبین **F** در افراد سیگاری است. (بدلیل افزایش میزان کربوکسی مونوکسی هموگلوبین مقاوم به قلیا در این افراد)

روش **Jonxis & Visser** برای مقادیر هموگلوبین **F** بالای ۵۰ درصد و خون بند ناف مناسب می باشد. در این روش افزایش مقاومت هموگلوبین **F** به دناتوره شدن توسط قلیا، با مشاهده تغییرات جذب نوری در طول موج ۵۷۶ نانومتر که با افزودن هیدروکسید آمونیوم حاصل می گردد ، قابل سنجش است.

نکته: بدلیل آنکه محدوده طبیعی هموگلوبین F وابسته به نوع روش اندازه گیری می باشد، لذا هر آزمایشگاه می بایست بر اساس روش مورد استفاده ، دامنه طبیعی را با استفاده از نمونه ۲۰-۳۰ فرد نرمال تعیین نماید (بخصوص در صورت استفاده از روش Singer)

☒ روش کروماتوگرافی ستونی در مورد مقادیر هموگلوبین F بیشتر از ۴۰ درصد کاربرد دارد.

☒ روش های ایمونولوژیک (راديو ايمونواسی یا رادیال ايمونو ديفیوژن) در مورد مقادیر هموگلوبین F کمتر از ۲درصد کاربرد دارد.

روش اندازه گیری هموگلوبین F در تمامی کتب مرجع موجود است لذا از ذکر مراحل آن خوداری می گردد.

منابع خطا (روش بتکه) :

- ۱- پیپت کردن نادرست
- ۲- رعایت نکردن دقیق زمان (زمان دو دقیقه برای عمل دناتوره شدن بسیار مهم است) بهتر است از کرومومتر استفاده گردد.
- ۳- مخلوط کردن نا کافی
- ۴- طول موج نامناسب فتومتر، فتومتر غیر کالیبره
- ۵- کدورت همولیزات تهیه شده
- ۶- غلظت نامناسب سود و سولفات آمونیم. در صورت استفاده از غلظت نامناسب سود تا ۲۵ درصد از هموگلوبین F در مرحله دناتوره شدن و یا رسوب از بین می رود.
- ۷- استفاده از معرف های کهنه
- سود: حداکثر پایداری سود تا ۳۰ روز است ، ولی نباید در صورت وجود هر گونه کدورت یا رسوب نیز استفاده گردد.
- سولفات آمونیم: محلول سولفات آمونیم حداقل برای سه ماه پایدار است ، در دمای ۲۰-۲۵ درجه قابل نگه داری است. کریستال های حل نشده در ته ظرف باید در طول مدت نگه داری قابل مشاهده باشد.
- ۸- استفاده از کاغذ صافی نامناسب
- باید از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ و یا ۴۲ استفاده گردد.

کنترل کیفی

- تفاوت بین خوانده های دو تایی در هموگلوبین F کمتر از ۵ درصد نباید از ۰/۵ درصد تجاوز کند.

- تفاوت بین خوانده های دو تایی در هموگلوبین F بین ۵-۱۵ درصد نباید از ۱ درصد تجاوز کند.

- تفاوت بین خوانده های دو تایی در هموگلوبین F بالاتر از ۱۵درصد نباید بیش از ۲درصد باشد.

نکته :

- * در صورتی که در الکتروفورز هموگلوبین باندى در منطقه F دیده شود، اما در روش شیمیایی میزان هموگلوبین F طبیعی باشد باید به وجود مت هموگلوبین A شک نمود.
- * در مواردی که در الکتروفورز هموگلوبین باندى در منطقه F دیده می شود (درصد آن بالاتر از حد طبیعی باشد) حتما باید به روش شیمیایی درصد آن تایید گردد.

منابع:

2-Chromatographic (micro column) determination of Hemoglobin A2 NCCLS
2004

3-Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods 2007

4-Quantitive Measurement of Fetal Hemoglobin Using the Alkali Denaturation
Method Approved Guideline NCCLS 2000