کاهش 70 درصدی خطاهای آزمایشگاهی با دانستنی‌های قبل از آنالیز

دکتر حبیب‌اله گل افشان، عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی شیراز

قسمت سوم

کد گذاری رنگی لوله‌های آزمایش

سرپوش ارغوانی کمرنگ (Lavender stopper)

دربردارنده محلول K_3EDTA یا افشان خشک شده K_2EDTA (spray) به عنوان ضد انعقاد بوده و مناسب برای آزمایش CBC است. نمک K_2EDTA برای CBC ضد انعقاد سفارش شده است. لوله آزمایش بایستی حداقل 8 بار برای یکنواخت شدن خون واژگون (inversion) شود. لوله حاوی EDTA به علت تداخل در عملکرد فاکتور 5 انعقادی و تداخل در عملکرد ترومبین روی فیبرینوژن در آزمایش‌های انعقادی کاربردی ندارد. پارامترهای آزمایش CBC تا 24 ساعت از نگهداری خون EDTA دار در یخچال 4 درجه قابل اطمینان است ولی برای جلوگیری از ایجاد مرفولوژی‌های ناهنجار بایستی تا قبل از سه ساعت گستره محیطی را تهیه کرد. برای آزمایش CBC بین 1.5 تا 2 mg از EDTA به ازای هر سی‌سی خون به کار می‌رود.

لوله‌های آزمایش با درپوش‌های مختلف رنگی

سرپوش صورتی (Pink)

دربردارنده K_2EDTA و با نشان گذاری‌های مخصوص (special label) برای نوشتن اطلاعات بیمار بر مبنای استانداردهای بانک خون است. از نمونه EDTA برای گروه‌بندی از روی گلبول و پلاسما (بجای سرم) و کومبز مستقیم و شناسایی آنتی‌بادی‌ها استفاده می‌شود.

سرپوش سفید

دربردارنده افشان (spray) خشک شده K_2EDTA به عنوان ضد انعقاد همراه با ژل جدا کننده پلاسماست که به طور اولیه در مطالعات مولکولی کاربرد دارد. از پلاسمای جدا شده می‌توان برای سنجش مارکرهای سکته قلبی و سطح آمونیاک نیز بهره گرفت.

سرپوش آبی روشن (Light blue)

حاوی سیترات سدیم 3.2 درصد برای جدا سازی پلاسما جهت آزمایش‌های انعقادی مانند PT و PTT است. نسبت حجم خون به سیترات 9:1 می‌باشد؛ برای مثال 0.2 سیترات و 1.8 سی‌سی خون و یا 0.5 سی‌سی سیترات و 4.5 سی‌سی خون مخلوط می‌شود. رعایت این نسبت اساسی است.

چنانچه هماتوکریت بیماری بیشتر از 55% باشد بایستی سیترات کمتری به خون اضافه کرد و این بدلیل کاهش حجم پلاسما در افراد پرخون است که در غیر اینصورت افزایش کاذب آزمایش‌های PT و PTT را بدنبال دارد.

برای محاسبه حجم سیترات برای هماتوکریت بالای 55% از رابطه زیر استفاده می‌شود.

$$\text{حجم سیترات برای یک سی سی خون} = \frac{100-HCT}{595-HCT}$$

برای مثال: اگر هماتوکریت بیماری 70% باشد جهت تهیه 2 سی‌سی خون برای آزمایش‌های PT و PTT چه حجم از سیترات سدیم لازم است؟

$$\text{حجم سیترات برای یک سی سی} = \frac{100-70}{595-70} = 0.05cc$$

حجم سیترات برای دو سی‌سی = 0.05 ×2 = 0.1 سی‌سی

بدین مفهوم که 0.1 سی‌سی سیترات بجای 0.2 سی‌سی در لوله ریخته و با خون به 2 سی‌سی رسانیده می‌شود.

سرپوش آبی تیره

حاوی ترومبین و بازدارنده تریپسین (Soybean Trpysin) جهت سنجش برخی از اجزای پپتیدی فیبرین و فیبرینوژن (FDP) می‌باشد.

سرپوش سیاه

حاوی سیترات سدیم 3.2 تا 3.8 درصد جهت آزمایش سرعت رسوب (ESR) به روش وسترگرن است. در این حالت نسبت حجم خون به سیترات سدیم 4 به یک است؛ برای مثال به 0.4 سیترات سدیم 1.6 سی‌سی خون اضافه می‌شود.

سرپوش سبز

حاوی هپارین به صورت لیتیوم یا سدیم هپارین می‌باشد. خون هپارینه به ویژه لیتیوم هپارین برای آزمایش‌های شیمی روی خون کامل یا روی پلاسما بکار می‌رود. الکترولیت‌های سدیم یا لیتیوم را نمی‌توان در چنین نمونه‌هایی ارزیابی کرد. از خون هپارینه برای آزمایش شکنندگی اسمزی نیز استفاده می‌شود، ولی برای CBC مورد استفاده قرار نمی‌گیرد. هپارین در رنگ آمیزی رایت ایجاد زمینه آبی می‌کند.

سبز روشن / سبز / سیاه

لوله با این کد رنگی حاوی هپارین و ژل جدا کننده پلاسماست و مناسب‌ترین لوله جهت اندازه‌گیری دقیق پتاسیم است و این به علت آن است که از رها شدن پتاسیم توسط پلاکت‌ها جلوگیری کرده و ژل مانع تماس پلاسما و گلبول‌های قرمز می‌گردد.

خاکستری (Gray)

تمام لوله‌های با سرپوش خاکستری حاوی ضد گلیکولیز مانند فلوراید سدیم هستند که تا 3 روز قند خون را حفظ می‌کند. فلوراید سدیم ضد انعقاد نیست و از این رو برای تهیه پلاسما به لوله آزمایش اگزالات پتاسیم یا Na_2EDTA اضافه شده است. از لوله‌های فلوراید‌دار نبایستی برای آزمایش غیر از گلوکز استفاده شود چون فلوراید سدیم در اندازه‌گیری CK, ALT, AST, ALP دخالت دارد. برای اندازه‌گیری سطح الکل نیز از لوله خاکستری استفاده می‌شود چون از رشد میکروب‌هایی که ممکن است الکل تولید کنند جلوگیری می‌کند.

آبی رویال (Royal blue)

این لوله برای آزمایش‌های سم شناسی و فلزات نادر، مناسب بوده و در تهیه آن موادی که باعث افزایش کاذب آنالیت شود به کار نرفته است. این لوله‌ها حاوی ضد انعقادهایی مانند K_2EDTA و یا سدیم هپارین و ژل جدا کننده با توجه به نیازهای آزمایشگاه است.

خرمایی (Tan Hemogard)

مناسب برای اندازه‌گیری سرب بوده و گواهی شده که دارای سرب کمتر از 0.01 mcg/cc (ppm) است. لوله حاوی K_2EDTA است.

زرد (yellow)

لوله با سرپوش زرد برای دو هدف در دسترس است؛ یک نوع دارای اسید سیترات دکستروز (ACD) و قابل استفاده در بانک خون برای مطالعات سلولی، فنوتایپ HLA و تست DNA و آزمایش تعیین پدر در پزشکی قانونی (Paternity) است.

لوله استریل با سرپوش زرد حاوی ضد انعقاد (Sodium polyanethol sulfonate) بوده و جهت تهیه نمونه برای کشت میکروبی است. ماده SPS نه تنها کلسیم را از حالت یونیزه خارج می‌کند بلکه دارای خواص ضد فاگوسیتوز، ضد کمپلمان و خنثی‌گر برخی آنتی‌بیوتیک‌ها نیز می‌باشد.

زرد / خاکستری و نارنجی (yellow/ gray stopper/ orange closure)

حاوی ترومبین جهت فعال سازی انعقاد و تولید لخته در 5 دقیقه است. از این لوله برای آزمایش‌های اورژانس شیمی و بیمارانی که داروهای ضد لختگی مصرف می‌کنند یا خون آنها به علت کمبود فاکتور دیر لخته می‌شود قابل استفاده است.

قرمز / خاکستری و طلایی Red/ gray stopper and gold closure

حاوی فعال کننده سیستم انعقاد خون و ژل پلیمری برای تهیه سرم جهت آزمایش‌های شیمی است. سیلیکا موجب لخته شدن سریع‌تر خون می‌گردد. این لوله‌ها به اختصار SST نامیده می‌شوند. قبل از سانتریفوژ بایستی 30 دقیقه صبرکرد تا خون لخته شود. لوله‌های پلاستیکی با سرپوش قرمز و سیلیکا به عنوان فعال کننده تشکیل لخته برای آزمایش‌های شیمی و سرولوژی به کار می‌روند. نوع شیشه‌ای با درپوش قرمز بدون افزودنی بوده و 60 دقیقه جهت ایجاد لخته و تهیه سرم لازم دارد.

اثرات ضد انعقادها و افزودنی‌ها روی آزمایش‌ها

ضد انعقاد / افزودنی	نام آزمایش	اثر
EDTA	فسفاتاز قلیایی	بازدارنده
	کراتین کینا ز	بازدارنده
	لوسین آمینوپپتیداز	بازدارنده
	آهن و کلسیم	کاهش
	PT و PTT	افرایش زمان
	سدیم و پتاسیم	افزایش
	آزمایش تجمع پلاکتی	بازدارنده
اگزالات	فسفاتاز اسیدی و قلیایی	بازدارنده

	آمیلاز	بازدارنده
	آنزیم LDH	بازدارنده
	کلسیم	کاهش
	سدیم و پتاسیم	افزایش
	مرفولوژی سلولی	ناهنجاری
سیترات	ALT و AST	بازدارنده
	فسفاتاز قلیایی	بازدارنده
	فسفاتاز اسیدی	محرک
	آمیلاز	کاهش
	کلسیم	کاهش
	سدیم و پتاسیم	افزایش
	فاکتورهای ناپایدار انعقاد	پایداری
هپارین	T_3 و T_4	افزایش
	PT و PTT	طولانی
	رنگ رایت	ایجاد زمینه آبی
	لیتیم	افزایش با لیتیم هپارین (Li Hep)
	سدیم	افزایش با سدیم هپارین (Na Hep)
فلوراید	فسفاتاز اسیدی و قلیایی	کاهش
	آمیلاز	کاهش
	کراتین کیناز	کاهش
	ALT و AST	کاهش
	مرفولوژی سلولی	ناهنجاری

توجه داشته باشید که آلوده شدن سوزن در هنگام اضافه کردن نمونه‌های خون ممکن است موجب انتقال ضد انعقاد یا افزودنی از لوله‌ای به لوله دیگر شود. این پدیده به ویژه با سیستم نمونه‌گیری با لوله‌های خلأدار با شیوع بیشتری رخ می‌دهد و از اینرو ترتیب نمونه‌گیری اهمیت زیاد دارد.

ترتیب نمونه‌گیری به سفارش (Clinical Laboratory standard institute)

ترتیب نمونه‌گیری برای سیستم‌های خلأدار و نیز وقتی که نمونه‌گیری با یک سرنگ در لوله‌های مختلف انجام می‌گیرد به شرح زیر است:

1 -نمونه استریل (لوله با سرپوش زرد یا اضافه کردن خون به بطری کشت)
2 -نمونه برای آزمایش‌های انعقادی در لوله با سرپوش آبی کمرنگ حاوی سیترات سدیم
3 -لوله‌های سرم با سرپوش قرمز و یا طلایی، شیشه‌ای یا پلاستیکی ژل‌دار (SST)
4 -لوله‌های هپارین‌دار با سرپوش سبز رنگ
5 -لوله‌های حاوی EDTA برای CBC
6 -لوله‌های با سرپوش خاکستری حاوی فلوراید
7 -لوله با سرپوش زرد/ خاکستری یا نارنجی با فعال کننده انعقادی ترومبین.

لوله‌های ژل‌دار

از لوله‌های ژل‌دار برای جدا سازی سرم استفاده می‌شود. ژل از مواد تیکسوتروب (Thixotropic) است که در ته لوله قرار می‌گیرد و در هنگام سانتریفوژ، ضربه خون به ژل وارد می‌شود و از اینرو شدت همولیز کمتر است. تغییراتی در چگالی ژل در هنگام سانتریفوژ ایجاد گردیده و موجب می‌شود که ژل بین سرم و گلبول قرار گیرد. ژل‌ها دارای فعال کننده‌های لخته مانند سیلیکا و یا ترومبین هم بوده و از اینرو انعقاد را سرعت می‌بخشند. زمان لخته شدن خون در لوله ژل‌دار حدود 30 دقیقه و چنانچه فعال کننده لخته آن ترومبین باشد 5 دقیقه است. در حالی که خون در لوله‌های ساده حدود یک ساعت برای لخته شدن زمان لازم دارد.

راحتی استفاده، کوتاه شدن زمان لخته، تولید سرم بیشتر، نیاز به یک بار سانتریفوژ، حمل نمونه بدون به هم ریزی سطح جدایی سرم از گلبول محاسن این گونه لوله‌ها است.

لوله‌های مخصوص با سرپوش قرمز/ خاکستری و طلایی دارای فعال کننده و ژل جدا کننده است که به آنها لوله‌های SSTS گویند که به مفهوم Serum separator tubes است.

از سرم جدا شده از لوله‌های ژل‌دار برای آزمایش‌های شیمی استفاده می‌شود ولی در بانک خون برای تست‌های ایمونولوژی سفارش نمی‌شود. به علت اینکه ژل‌ها ممکن است داروها را بخود جدب کنند از اینرو از لوله‌های ژل‌دار برای پیگیری سطح داروها استفاده نمی‌شود. ژل‌های سیلیکون و پلی استر از ژل‌های جذب کننده هستند در حالی که ژل‌های بر پایه آکریل (acrylic) ممکن است مشکل جذب را نداشته باشند.

نمونه همولیز

مشکل در پیدا کردن رگ، استفاده از سر سوزن بسیار باریک، کشیدن محکم خون بداخل سرنگ، وارد کردن سوزن قبل از خشک شدن الکل و تکان شدید به خون همگی با همولیز همراه هستند. آنزیم LDH و پتاسیم به طور چشمگیر تحت اثر همولیز قرار می‌گیرند. همولیز شدید با افزایش 2-3meq/L پتاسیم آنرا در طیف بحرانی

قرار می‌دهد. گفتنی است که غلظت یا فعالیت برخی از مواد در گلبول قرمز چندین برابر سرم است و با همولیز شدن خون این مواد به خون راه می‌یابند و یا برخی آنالیت‌ها رقیق می‌شوند.

برای مثال:

- ✓ فعالیت LDH در گلبول قرمز 16 برابر سرم است.
- ✓ فعالیت AST در گلبول قرمز 4 برابر سرم است.
- ✓ غلظت پتاسیم گلبول قرمز 23 برابر سرم است.
- ✓ فعالیت ALT گلبول قرمز 6.7 برابر سرم است.
- ✓ غلظت گلوکز و فسفات در گلبول قرمز بترتیب 0.82 و 0.78 سرم است.
- ✓ غلظت سدیم گلبول 0.11 غلظت سرم است.
- ✓ غلظت کلسیم گلبول 0.1 غلظت سرم است.

با توجه به موارد فوق، همولیز موجب افزایش آن دسته از موادی می‌شود که فعالیت آنها در گلبول قرمز بیشتر است در بقیه موارد که غلظت آنالیت در گلبول قرمز کمتراست با توجه به رقتی که همولیز ایجاد می‌کند نتایج متغیری در پی دارد.

نکته مهم: با رها شدن پتاسیم از پلاکت در ضمن لخته شدن خون، پتاسیم سرم بالا می‌رود و این اختلاف زمانی بسیار چشمگیر است که بیمار دارای افزایش فوق‌العاده پلاکت باشد. از این رو تهیه نمونه خون در لیتیوم هپارین مقدار صحیحی از پتاسیم را بدست می‌دهد.

در بیماران مبتلا به لوسمی چنانچه سلول‌های لوسمی ترد و شکننده باشند باعث افزایش کاذب پتاسیم می‌شود ولی چنانچه سلول‌های لوسمی از نظر متابولیکی فعال باشند با ورود پتاسیم و گلوکز به داخل سلول ممکن است موجب کاهش کاذب پتاسیم (هیپوکالمی) گردد.

نکته مهم: در بسیاری از سنجش‌های مبتنی بر الیزا، سنجش آنالیت با آنتی‌بادی‌های کانژوگه یا نشاندار شده با آنزیم پروکسیداز صورت می‌گیرد، گرچه افزایش بیلیروبین و چربی در نمونه می‌تواند تداخل در رنگ سنجی ایجاد کند ولی مراحل شستشو، تداخل آنها را کم می‌کند. در نمونه همولیز به علت اینکه خون همولیز شده گروه هیم (Heme) را رها کرده و گروه هیم خود دارای خاصیت پروکسیداز است از اینرو باعث افزایش کاذب آنالیت‌ها در روش‌های الیزا که مبتنی بر تولید رنگ توسط آنزیم پروکسیداز است می‌شود.

در سایر روش‌های الیزا که از آنزیم فسفاتاز قلیایی یا بتاگلوکورنیداز استفاده می‌شود یا روش کمیلومینسانس (Chemiluminscance)، همولیز تداخل چندانی ندارد.

گفتنی است که برخی از بیماران دارای آنتی‌بادی ضد آنتی‌بادی موش هستند و تحریک ایمنی از طریق دارویی یا کار با پروتئین‌های موش و در پاره‌ای موارد ناشناخته است. با توجه به اینکه در آزمایش‌های ایمونولوژی از آنتی‌بادی مونوکلونال موش استفاده می‌شود وجود این آنتی‌بادی در سرم بیمار نتایج تست را کاذب می‌کند.

برای حمل نمونه به صورت منجمد بایستی لوله نمونه را در یخ خشک (solid carbon dioxide) و در ظرف پلی استیرین قرارداد و چنانچه حمل هر گونه نمونه احتمال خطر عفونت دارد بایستی در ظرف مقاوم به سوراخ شدن قرار داده شود و دارای برچسب خطر بیولوژیکی (biohazard) با رنگ فلورسانس نارنجی باشد.

نکته: سانتریفوژ دوباره لوله حاوی ژل جدا کننده سرم ممکن است باعث افزایش پتاسیم یا گزارش پتاسیم نرمال در شخصی که کمبود واقعی پتاسیم دارد شود. گفتنی است که یک لایه سرم زیر ژل در بالای گلبول‌های قرمز فشرده و غنی از پتاسیم شکل گرفته که با سانتریفوژ دوباره این لایه بداخل سرم نشت می‌کند.
نکته: آنالیز سرم‌های زرد و شیری و همولیزه روی آزمایش‌های شیمی نتایج درست بدست نمی‌دهد و این به دلیل تغییرات در جذب نوری و پراکنده کردن نور توسط ذرات لیپید در آنالیزورها می‌باشد.

مطالعات مولکولی

نمونه خون برای آزمایش‌های اسید نوکلوئیک در ضد انعقاد EDTA گرفته می‌شود. گفتنی است که ضد انعقاد هپارین همراه با DNA استخراج شده و بازدارنده آنزیم DNA پلیمراز در آزمایش PCR است. ترکیبات هیم مانند همین (Hemin) که از خون همولیز در سرم یا پلاسما رها می‌شود نیز توانایی بازدارندگی پلیمراز DNA دارد. با توجه به اینکه RNA سلول‌های خون و بافت آسیب پذیر است، از این رو انجماد سریع نمونه قبل از پروسه استخراج آن لازم است. املاح نمکی، پروتئازها و فنل و کلروفرم برای استخراج بکار می‌روند. جلوگیری از آلودگی در روش کار بسیار حائز اهمیت است و سفارش می‌شود که قسمت‌های تکثیر اسید نوکلوئیک و آماده سازی پس از تکثیر در محل جداگانه باشد.

اثرات ماتریکس

آنالیت‌هایی مانند الکترولیت‌ها، مولکول‌های ریز و آنزیم‌ها و ..... در فاز مایع پلاسما یا سرم قرار دارند. افزایش پروتئین‌ها، برای مثال در مایلوم مالتیپل و یا هیپرلیپیدمی با اشغال کردن فاز مایع منجر به کاهش آنالیت‌های فوق می‌گردند.
(Solvent exclusion effect). خارج کردن لیپیدها با سانتریفوژ اولترا مؤثر است. اثرات ماتریکس با توجه به غلظت بالا یا کاهش پروتئین‌ها در مایعات بدن چشمگیر است.

وضعیت

وقتی یک شخص بالغ از وضعیت درازکش به حالت ایستاده در می‌آید حجم خون در حدود 10% در 10 دقیقه کاهش می‌یابد و این ناشی از افزایش فشار هیدروستاتیک و فرار مایعات و مولکول‌های ریز خون به فضای میان بافتی است. عکس پدیده فوق نیاز به 30 دقیقه دارد تا آب میان بافتی وارد خون گردد. فرار مایعات موجب افزایش مولکول‌های سنگین مانند توتال پروتئین (8 تا 10% افزایش)، تیروکسین، کلسترول، تری گلیسرید و داروهای متصل به پروتئین و آلبومین و برخی از آنزیم‌ها می‌گردد.
این تغییرات در افراد مبتلا به پرفشاری خون بیشتر است. گفتنی است که بستن طولانی تورنیکت موجب خروج مایعات و غلیظ شدن سلول‌های خون و پروتئین‌ها می‌شود. برای اندازه گیری سطح لاکتات نبایستی از تورنیکت استفاده کرد.

پیاده روی به مدت 4 ساعت در هفته با کاهش 5 درصدی کلسترول و افزایش 3.4 درصدی HDL کلسترول نسبت به افراد غیر فعال همراه است. سطح آنزیم‌های ماهیچه‌ای، اوره، کراتینین و تیروکسین در ورزشکاران بیشتر است.
مسافرت دور دست ریتم ترشح فیزیولوژیک را تغییر داده و برای پیدا کردن ریتم پایدار به 5 روز زمان نیاز است. بیشترین تغییراتی که خوردن غذا و ناشتا نبودن روی افزایش تست‌های آزمایشگاهی دارد عبارت است از قند، آهن، لیپید توتال و فسفاتاز قلیایی که به ویژه با خوردن غذای چرب افزایش بیشتری نشان می‌دهد و بیشترین افزایش در گروه خونی O و B دیده می‌شود. گرسنگی طولانی مدت با لیپولیز و کتوژنز کبدی همراه است و موجب افزایش اسیدهای چرب آزاد، اجسام کتونی، افزایش کلسترول و تری گلیسرید و رها شدن اسید آمینه از ماهیچه‌ها و کاهش قند خون می‌گردد. مصرف مزمن الکل فعالیت آنزیم‌ها را تحت اثر می‌گذارد. از اندازه گیری GGT (Gamma Glutamyl Transferase) و افزایش آن به عنوان نشانه الکلیسم مزمن استفاده می‌شود. تزریق عضلانی با افزایش آنزیم‌های ماهیچه‌ای مانند CK و LDH همراه بوده و افزایش تا چند روز ادامه دارد. ترکیبات مرفین با افزایش فعالیت TSH، پرولاکتین، آمیلاز، لیپاز و آنزیم‌های کبدی و افزایش بیلیروبین همراه است. هروئین، کلسترول، T_4 و پتاسیم را افزایش می‌دهد.

تب

افزایش قند خون در اوایل تب رخ داده و موجب ترشح بیشتر انسولین می‌شود، ولی افزایش هورمون رشد و گلوکاگون نیز رخ می‌دهد و از اینرو ممکن است انسولین ترشحی قادر به پایین آوردن قند خون نباشد.
تب و بیماری‌های حاد با کاهش T_4 همراه می‌باشند. سطح کرتیزول پلاسما افزایش یافته و ممکن است تغییرات ریتمی در ترشح آن موقتاً ناپدید شود.

افراد نابینا

در افراد نابینا به علت کاهش تحریک محور هیپوتالاموس- هیپوفیز ممکن است نشانه‌هایی از کم‌کاری غدد فوق کلیه و غده هیپوفیز مشاهده شود. در برخی ممکن است ریتم ترشحی کرتیزول ادامه یا ناپدید شود. تغییرات روزانه آهن سرم ناپدید گردیده و کاهش ترشح آلدوسترون ممکن است با کاهش سدیم و کلر همراه شود.

چرخه قاعدگی

در خانمی که سیکل قاعدگی دارد مقدار کلسترول توتال دارای نوسان 19% در طول ماه می‌باشد. به موازات افزایش سطح استروژن HDL- کلسترول هم افزایش می‌یابد. اوج افزایش HDL کلسترول در نیمه سیکل (تخمک گذاری) در همراهی با اوج افزایش استروژن مشاهده می‌شود. کلسترول توتال، HDL کلسترول و تری‌گلیسرید از نیمه سیکل شروع به کاهش کرده و دارای کمترین مقدار، درست قبل از شروع خونریزی است. با وجودی که سطح تغییرات در غالب موارد 5 تا 8٪ است ولی ممکن است یک جواب نرمال را غیرطبیعی کند.

تأثیر سیگار روی پارامترهای خون (Smoking)

اثرات نیکوتین در ارتباط با تعداد سیگار و مقدار دود وارد شده به ریه می‌باشد. با تحریک مدولای غده فوق کلیه غلظت اپی‌نفرین پلاسما بالا رفته و دفع ادراری کاتکول آمین‌ها و متابولیت‌های آن افزایش می‌یابد. غلظت گلوکز ممکن است 10mg% در ده دقیقه بعد از کشیدن یک سیگار بالا رفته و تا یکساعت دوام داشته باشد. غلظت انسولین پلاسما پاسخ تأخیری به افزایش قند خون نشان می‌دهد و بعد از یک ساعت از کشیدن سیگار بالا می‌رود و از این رو غلظت گلوکز در سیگاری‌ها بیشتر بوده و تحمل گلوکز ممکن است اندکی اختلال داشته باشد.
هورمون رشد حساسیت ویژه‌ای به دود تنباکو داشته و ممکن است تا 10 برابر در 30 دقیقه بعد از کشیدن یک سیگار بالا رود. کلسترول، تری گلیسرید و LDL کلسترول در افراد سیگاری بیشتر بوده و مقدار HDL کلسترول کمتر است. هر چند ریتم ترشح کرتیزول تحت اثر سیگار قرار نمی‌گیرد ولی افزایش ترشح 40 درصدی آن در 5 دقیقه از شروع کشیدن سیگار دیده می‌شود.
ترشح 5- هیدروکسی ایندول استیک اسید در افراد سیگاری افزایش می‌یابد. افزایش گلبول‌های سفید تا 30%، و افزایش کاربوکسی هموگلوبین تا سطح 10% و کاهش ویتامین B_{12} در افراد سیگاری مشاهده می‌شود. فشار اکسیژن شریانی 5 میلیمتر جیوه در افراد سیگاری کمتر از افراد غیر سیگاری است. کاهش سطح IgA و IgM و IgG و افزایش سطح IgE در افراد سیگاری مشاهد شده است.
آزمایش‌های مثبت ضعیف فاکتور ضد هسته‌ای و کارسینوامبریونیک آنتی‌ژن (CEA) مشاهده شده است. کاهش تعداد اسپرم و افزایش اشکال غیرطبیعی در مقایسه با افراد غیر سیگاری مشاهده شده است.

سن

افراد به چهار دسته سنی نوزاد، بچه، جوان و پیر طبقه‌بندی می‌گردند. مقـدار هموگلوبین F در بدو تولد بین 85-60 درصد و هموگلوبین A بین 15 تا 40 درصد است. سنتز هموگلوبین A_2 بعد از تولد آغاز می‌شود. نارس بودن کبد موجب پیدایش زردی فیزیولوژیک حدود 3 تا 5 روز پس از تولد می‌گردد؛ در حالی که حضور زردی در روز اول بیانگر کم‌خونی همولیتیک نوزاد می‌باشد. کاهش میزان قند خون در نوزاد به علت کاهش ذخایر گلیکوژن مشاهده می‌شود. غلظت پتاسیم حتی تا 7meq/L در بدو تولد دیده شده که به سرعت به مقدار نرمال برمی‌گردد. چنین روندی در افزایش کلسیم هم مشاهده شده است.
غلظت سرمی T_4 نوازد سالم شبیه خانم حامله بالاتر از حالت معمول است. بعد از تولد TSH نوزاد بالا رفته که منجر به افزایش بیشتر سطح سرمی T_4 می‌گردد. این حالت پرکاری فیزیولوژیک تیروئید نوزادی در سال‌های اول زندگی ناپدید می‌گردد.
فعالیت فسفاتاز قلیایی در کودکان به موازات رشد استخوان به طور چشمگیر بالاست ولی بعد از بلوغ کاهش می‌یابد. افزایش کراتینین سرم به موازات افزایش توده ماهیچه‌ای مشاهده می‌شود.
کلسترول توتال سرم و تری گلیسرید در زن و مرد با سرعت 2mg/dL در سال رو به افزایش رفته و به سطح ماکزیمم خود در سن 50 تا 60 سالگی می‌رسد. افزایش کلسترول در خانم‌های منوپاز به علت احتمالی کاهش استروژن است. در سن پیری سرعت فیلتراسیون گلومرول کاهش می‌یابد. سطح سرمی T_3 ممکن است به 40٪ کاهش یابد، ولی مقدار T_4 تقریباً ثابت است.

کار با نمونه خون در آزمایشگاه

پلاسما یا سرم بایستی هر چه سریعتر و ایده‌آل در ظرف یکساعت، پلاسما و تا دو ساعت سرم از خون جدا گردد. جدا کردن زود هنگام سرم موجب ادامه روند پروسه انعقاد در سرم و تشکیل فیبرین گردیده که امکان مسدود کردن پروپ (probe) آنالیزور را بدنبال دارد. برای تهیه پلاسما نمونه را با شتاب 1000g -850 برای 10 دقیقه سانتریفوژ کنید. چنانچه تأخیر در انجام آزمایش بیشتر از 4 ساعت است سرم یا پلاسما را در یخچال نگه دارید.
در شرایط اورژانس می‌توان از پلاسمای هپارینه جهت آزمایش‌های شیمی استفاده کرد. سفارش می‌شود لوله آزمایش با سرپوش سانتریفوژ گردد تا از تبخیر و قطره سازی در هوا (aerosolization) جلوگیری کرده و شرایط غیرهوازی را برای اندازه گیری پارامترهایی مانند دی اکسیدکربن و کلسیم یونیزه را بهتر فراهم کند.
نگهداری خون در یخچال موجب از کار افتادن پمپ سدیم و پتاسیم گلبول‌های قرمز شده که منجر به افزایش پتاسیم و کاهش سدیم می‌شود.
نگهداری خون لخته شده در آزمایشگاه موجب تغییراتی در آنالیت‌های خونی می‌شود؛ توجه داشته باشید که برای مثال فعالیت فسفاتاز موجب افزایش فسفر شده و برخی مواد مانند کاته‌کول آمین‌ها جذب گلبول قرمز و پلاکت می‌گردند.
برای آزمایش‌های انعقادی جداسازی پلاسما با دور 2000g برای 15 دقیقه جهت تولید پلاسمای بدون پلاکت سفارش می‌شود. نگهداری پلاسما در 4 درجه با فعال کردن فاکتور 7 زمان PT را کوتاه می‌کند در حالی که انجماد پلاسما در 20– درجه تأثیری در آزمایش PT و یا PTT ندارد.
آزمایش PT تا 24 ساعت در حرارت اتاق و PTT تا 4 ساعت در حرارت اتاق بلامانع است. اگر منظور از آزمایش PTT به منظور پیگیری درمان با هپارین است پلاسما را ظرف یکساعت جدا کرده و تا 4 ساعت می‌توان آزمایش PTT را انجام داد.

تأخیر در جدا سازی سرم یا پلاسما

تماس طولانی سرم یا پلاسما با گلبول‌های قرمز ممکن است تغییرات چشمگیری در برخی پارامترها ایجاد کند. جذب مواد روی شیشه و پلاستیک، تبخیر، ورود آب بدرون گلبول‌های قرمز و ادامه متابولیسم گلبول‌ها علت پاره‌ای از این تغییرات هستند.
گلوکز در 24 ساعت اول نمونه‌ای که سرم آن جدا نشده بشدت کاهش می‌یابد و شدت کاهش در پلاسما بیشتر است. جدا سازی سریع سرم یا پلاسما و یا نمونه گیری در لوله سرخاکستری با داشتن فلوراید سدیم از این پدیده جلوگیری می‌کند. فلوراید با ایجاد کمپلکس یونی با Mg^{++}، آنزیم‌های گلیکولیز وابسته به آن مانند انولاز (Enolase) را غیر کارآمد می‌کند و تا 3 روز میزان قند سرم را پایدار نگه می‌دارد.
ورود آب بداخل گلبول موجب افزایش بیلیروبین توتال، سدیم، اوره، آلبومین، کلسیم و پروتئین توتال می‌شود. مطالعات نشان داده است که پتاسیم، فسفر و گلوکز از پارامترهای بسیار ناپایدار در سرمی هستند که در مدت 30 دقیقه از لخته جدا نشده است. آلبومین، بیکربنات، کلراید، پپتید C، HDL، LDL کلسترول، آهن و پروتئین توتال بعد از 6 ساعت از جدا نشدن سرم از گلبول ناپایدار هستند. چربی‌ها و برخی از آنزیم‌ها با گذشت زمان در سرم یا پلاسمای جدا نشده افزایش یافته و این تغییرات در پلاسما بیشتر از سرم است. فعالیت آنزیم

LDH تا 56 ساعت به طور مداوم رو به افزایش می‌رود در حالی که آنزیم‌های AST, ALT, CK تا این مدت پایدارند.
فعالیت آنزیم GGT در پلاسما با یا بدون تماس با گلبول‌های قرمز 27% کمتر از نمونه سرمی است که در 0.5 ساعت جدا شده باشد، بهرحال فعالیت آنزیمی GGT با تماس بیشتر پلاسما با گلبول افزایش می‌یابد.
افزایش 110 درصدی کراتینین در پلاسما و 60 درصدی در سرم بعد از 48 تا 56 ساعت از جدا نشدن سرم یا پلاسما مشاهده می‌شود. ممکن است که اندازه گیری مقدار یک آنالیت در سرم یا پلاسما دارای تفاوت چشمگیری باشد. برای مثال می‌توان به هورمون پاراتیروئید با افزایش 19 درصدی در پلاسما اشاره کرد.

نکته مهم: سیکل‌های یخ زدن و آب کردن (Freeze- Thaw) دارای اثرات مهمی روی پایداری آنالیت‌های می‌باشد. کریستال‌های یخ دارای اثرات تخریبی به ویژه روی مولکول‌های بزرگ پروتئینی می‌باشند. انجماد یواش و کند با شکل‌گیری کریستال‌های بزرگ یخ و اثرات تخریبی بیشتر همراه است، در حالی که انجماد سریع برای پایداری بهتر سفارش می‌شود.