كلية الصيدلة

مقرر دمويات ومناعيات (عملي)

مدرس المقرر : د. هالة شاهين

رمز المقرر :PHBM947

جمع عينات الدم

- عندما يطلب الطبيب إجراء اختبارات على الدم، هناك تعليمات يجب مراعاتها من قبل المريض والمخبري قبل وأثناء وبعد عملية سحب الدم وذلك حسب نوع الاختبار وذلك تلافياً لحدوث أي نتيجة خاطئة أو اختلافات بين اختبار وآخر

من الأسباب المرتبطة بجمع العينة والتي تؤدي إلى الحصول على نتائج مضللة:

قبل جمع العينة:

- تناول الطعام والماء خلال ساعتين من سحب العينة
- النشاط البدني يتضمن المشي السريع\ خلال 20 دقيقة من سحب العينة \
- الاجهاد stress
- تناول الأدوية والمكملات الغذائية خلال 8 ساعات من سحب العينة

خلال سحب العينة

- أوقات مختلفة لسحب العينة
- وضعية المريض
- ضغط العاصبة
- الضغط السلبي المفرط خلال سحب العينة في السرنج
-

معالجة العينة

- مضاد تخثر غير كاف أو زائد
- مزج غير كاف للدم مع مضاد التخثر

- أنبوب من نوع خاطئ
- خطأ في ربط اسم المريض مع العينة
- تأخير في نقلها إلى المخبر

- تعد عينة الدم الوريدي الأكثر استخداماً في معظم الاختبارات، وقد تكون عينات الدم الشعري مقبولة لبعض الأغراض ولكن بشكل عام يجب أن يتم حصر استخدام عينات الدم الشعري للأطفال وبعض الاختبارات المحددة.

الحصول على عينة الدم الوريدي:

- **الأدوات**

- الطلب الموجه من الطبيب
- أنابيب جمع العينة
- المحقنة (السيرنج) والابر
- العاصبة tourniquet
- كحول 70 %
- ماسحات قطنية معقمة
- ضماد لاصق
- صندوق نفايات طبية
- حامل أنابيب
- قلم لتسجيل بيانات المريض على أنبوب العينة

- يتراوح قطر الابرة المناسب المستخدم 19G أو 21G لمعظم المرضى البالغين، وتستخدم الابرة ذات القطر 23G للأطفال.

- **الأنابيب المستخدمة في جمع العينات**

– تستخدم الأنابيب الحاوية على مضادات التخثر بدقة شديدة بحيث ألا يؤثر مضاد التخثر المختار على نتائج الاختبار، وذلك لأن مضادات التخثر عبارة عن مركبات كيميائية لأملاح بعض المعادن مثل الصوديوم والبوتاسيوم والليثيوم

- لا يمكن استخدام مضادات التخثر الحاوية على أملاح الصوديوم والبوتاسيوم عندما يكون هدف التحليل تحديد شوارد الصوديوم والبوتاسيوم لأن ذلك سوف يؤدي إلى خطأ إيجابي كبير في نتائج التحليل \نستخدم مضادات التخثر لليثيوم أو الهيبارين أو بدون مانع تخثر\
- لا يمكن استخدام أوكزالات الصوديوم في حال تحليل كالسيوم الدم وذلك لأن هذا الملح سوف يزيل محتوى العينة من الكالسيوم نتيجة الترسيب على شكل أوكزالات الكالسيوم.
- تعمل بعض مضادات التخثر على تثبيط فعالية بعض الإنزيمات كإنزيم الفوسفاتاز الحمضي acid phosphatase
- بينما تعمل مضادات التخثر الحاوية على فلوريد الصوديوم أو البوتاسيوم على تثبيط فعالية إنزيم اليورياز وتنشط فعالية إنزيم الأميلاز LDH

مضادات التخثر المستخدمة في أنابيب جمع العينات:

1-(الهيبارين**:** يعمل كمضاد للترومبين يتميز عن غيره بكونه لا يتداخل مع أي اختبار من اختبارات التحليل الكيميائي،الهيبارين لا يذوب مباشرة لذلك تقوم الشركات بتجفيف المحلول على جدران الأنبوبة ليكون في تماس مباشر مع الدم وبالتالي أفضل مفعول

الأسباب الرئيسية لاستخدامه المحدود هو سعره المرتفع ومفعوله المؤقت.

2-(أوكزالات **البوتاسيوم:** يعمل على منع التخثر عن طريق ترسيب شوارد الكاسيوم، ويفضل استخدامه لسهولة ذوبانه \ يجب الانتباه لعدم استخدامه في حال كان المطلوب عيار كالسيوم الدم عند المريض

3-(فلوريد **الصوديوم:** يستخدم عادة كمادة حافظة لتقدير الغلوكوز في الدم، ويستخدم كمضاد تخثر ضعيف \ يجب الانتباه إلى عدم استخدام فلوريد الصديوم عندما يكون جمع العينات من أجل تقديرات إنزيمية \

4-(**Ethylene diamine tetra acetic acid(EDTA** :من مضادات التخثر المفضلة

في علم الدم حيث يعمل على المحافظة على مكونات الدم الخلوية من التلف، ويستخدم عادة بشكل ملح ثنائي الصوديوم أو ثنائي البوتاسيوم

آلية عمل الـ EDTA هي مخلبة الكالسيوم في الدم بشكل كامل وعزله عن الدم وبالتالي غياب عملية التخثر.

5- **سيترات ثلاثية الصوديوم Trisodium citrate :** يعتبر مضاد التخثر المفضل في اختبارات التخثر واختبار سرعة التثفل

ملاحظة: كل أنبوب من الأنابيب السابقة له غطاء بلون محدد للتمييز بينهم.

سحب الدم الشعري:

- نحصل عليه من رأس الاصبع الثالث أو الرابع من جانب الاصبع لأنه أقل حساسية من قمته
- أو من شحمة الأذن ولكنه أقل استخداماً بسبب كثرة الكريات البيض الوحيدات في دم شحمة الأذن
- أو من كعب القدم أو إبهام القدم عند الأطفال
- يتم سحب الدم الشعري عن طريق الواخزات lancet حيث يتم تطهير المنطقة بالكحول ومنثم يوخز بالواخزة، يترك الدم لينساب بحرية أو بضغط خفيف جد اً
- بصورة عامة، يجب الاستغناء عن أول قطرتين نازفتين للأسباب التالية:

1(الكريات البيض: يكون عدد الكريات البيض في الدم الشعري في البداية مرتفعاً ويتناقص تدريجياً مع كل قطرة دم تخرج مع الوخز ومن ثم يصبح تعداد الكريات البيض مماثلاً للدم الوريدي

2(الكريات الحمر والصفيحات: يكون عددها مع بداية النزف منخفضاً وبعد القطرتين الأوليتين يصبح مماثلاً لما هو عليه في الدم الوريدي .

سحب الدم الوريدي:

- ✓ توضع يد المريض على المكان المناسب من المنضدة وراحة الكف إلى الأعلى
- ✓ تعتبر أوردة الثنية المرفقية أفضل الأوردة المرشحة لأخذ الدم وذلك لوضوحها وثخانتها ويفضل أخذ الدم من إحدى الشعب المشكلة لحرف Y فوق منطقة الاتصال مباشرة

- ✓ تلف الـعاصبة حول اليد بشكل مناسب وبقوة مناسبة بحيث تبطئ الجريان الدموي في الوريد
- ✓ يختار الوريد المناسب لعملية السحب عن طريق الجس واللمس بالإصبع ومن ثم يتم تطهير الجلد بالكحول
- ✓ تمسك المحقنة بحيث يكون اتجاه شطفة الابرة نحو الأعلى ومن ثم تدخل الابرة بزاوية 20-45 درجة
- ✓ تدفع الابرة بعد دخولها على مسيرة الخط الوريدي بمسافة ١- ١,٥سم ويتم سحب الدم ببطء \ السحب السريع يسبب تكسر بعض الكريات\
- ✓ بعد سحب الكمية المناسبة يتم فك ا بهدوء وتوضع قطنة مبللة بالكحول على مكان الوخز وتسحب الابرة بحركة واحدة سريع ة
- ✓ بعد سحب الابرة يطلب من المريض أن يضغط بالقطنة على مكان السحب لمدة 2 -3 دقيقة وذلك لإيقاف النزف مع الملاحظة أنه يجب أن تكون يده مبسوطة في هذه الحال ة

تعداد الخلايا الدموية RBCs ،WBCs ، platelets

1(**آلي**: عن طريق جهاز مؤتمت يعطي كافة النسب الدموية وهو غير متوفر في جميع المخابر لكلفته المرتفعة

2(**يدوي**: ويستخدم فيه ممصات التمديد ومحاليل التمديد والعدادة

ممصات التمديد: ويتألف من ثلاث أقسا م

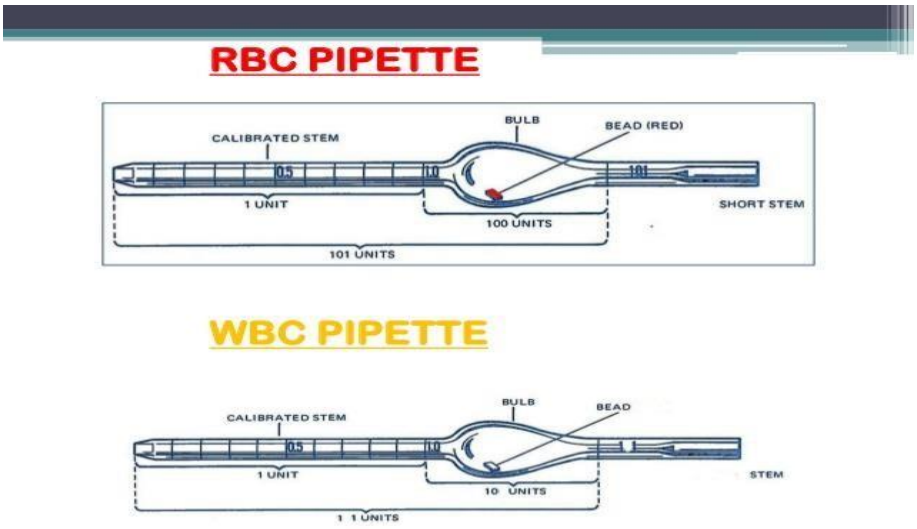
- القسم السفلي: أنبوب شعري مدرج
- القسم العلوي: الحجرة chamber
- القسم العلوي: الذي يدل على نهاية التمديد

✓ يوجد ممص للكريات الحمر وممص للكريات البيض والفرق بينهما أن ممص الكريات الحمر حجرته أكبر من ممص الكريات البيض

✓ ممص الكريات الحمر: أنبوب شعري مدرج 101 - 0,5

وحجرته حجمها 100 ضعف حجم الأنبوب الشعري لذلك تكون نهاية التمديد 101 أي حجم إلى 100 حجم.

ويوجد كرة بلون أحمر ضمن الحجرة تسمح بمزج الدم مع الممدد وفي ممص الكريات البيض تكون هذه الكرة بلون أبيض



✓ عدد الكريات البيضاء من 4-11 ألف لذلك لا نحتاج إلى نسبة تمديد عالية لنستطيع العد ١١مرة، أما عدد الكريات الحمراء حوالي 5 مليون لذلك يكون حجم ممص الكريات الحمراء أكبر بسبب الحاجة إلى التمديد العالي لنستطيع تمييز الكريات

✓ هذه الممصات كانت الحل الوحيد قبل اختراع الـ micropipette

وبالتالي هناك نوعان للتمديد:

- الممصات الزجاجية: تستخدم عند سحب حجوم صغيرة ونحتاج كمية من الممدد، وهذا يستهلك الممدد ولا ينتج محلول متجانس، مما يؤدي إلى نتائج غير دقيقة
- Micropipette: أسهل في الاستخدام ودقيق في أخذ الحجوم ونستطيع سحب كمية قليلة تقدر بالميكرون وبالتالي يكون استهلاك الممدد أقل، والمحلول متجانس، ولذلك فإن هذه الممصات الأكثر استخداماً.

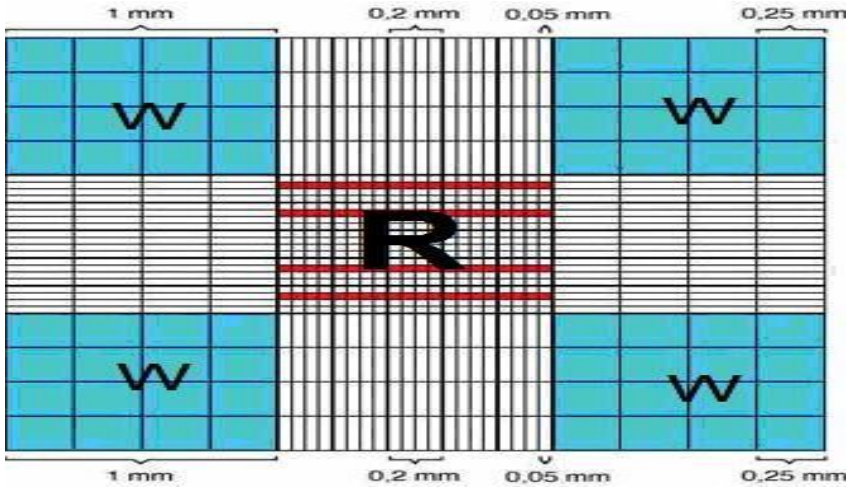
العدادة وتسمى Neubauer وذلك نسبة للعالم الذي طورها

– تحتوي حجرة التعداد على منطقتين عبارة عن مربعات محفورة ضمن العدادة، وتحت المجهر تظهر مقسمة إلى 9 مربعات

– المربعات التي تهمنا في التعداد هي 5 مربعات:

- مربعات الأطراف الأربعة: لتعداد الكريات البيض
- المربع المركزي: لتعداد الكريات الحمر

– طول ضلع كل مربع من هذه المربعات 1 ملم والارتفاع 0,1 ملم

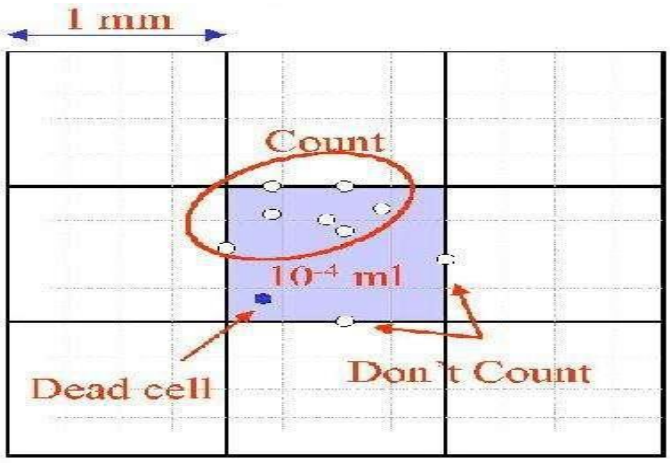


– كل مربع من مربعات عد البيض مقسم إلى 16مربع صغير، والغاية من التقسيم هي تسهيل عملية العد

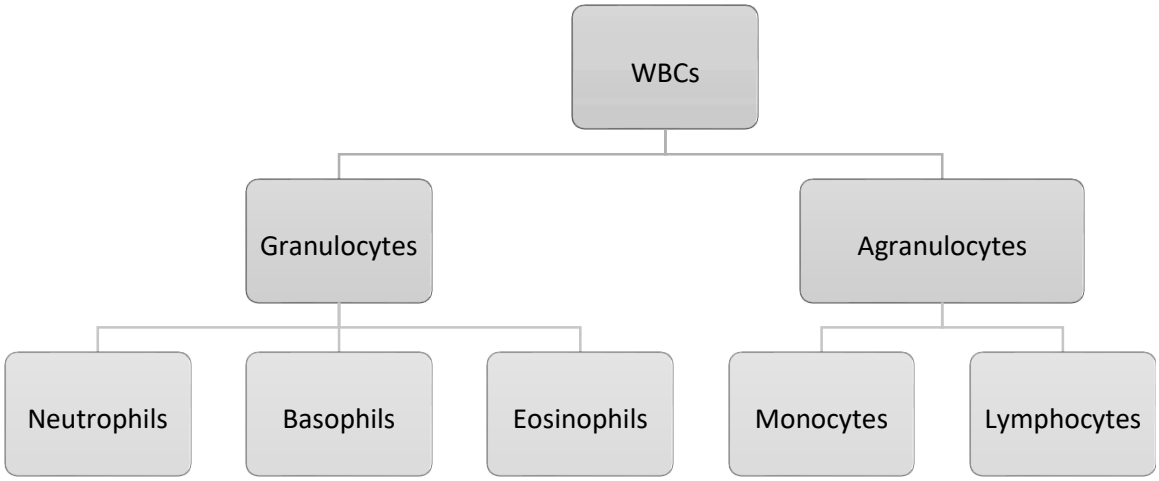
-
-

– مربع الكريات الحمر مقسم أكثر من مربع الكريات البيض: مقسم إلى 25 مربع متوسط مفصولين بخطوط ثنائية وكل مربع متوسط إلى 16 مربع صغير

محلول التمديد: يختلف محلول التمديد في حالة عد الكريات الحمر عن المستخدم في عد البيض



--- -- ---



الغاية من تعداد الكريات البيض

- تعداد الكريات البيض عبارة عن جزء من اختبار كامل يدعى بـ CBC (complete Blood count)
- يحتوي الجسم على عدة أنواع من الكريات البيض ولكل واحدة منها نسبة معينة من التعداد الكلي للكريات البيض
- إن ارتفاع أو انخفاض تعداد الـ WBCs عن المعدل الطبيعي يشير إلى حالة مرضية
- وبالتالي فإن تعداد الـ WBC من الممكن أن يشير إلى إصابات مخفية hidden infectionsضمن الجسم وينذر الطبيب بحالات طبية غير مشخصة كالأمراض المناعية autoimmune diseases وأمراض العوز المناعي immune deficiencies والاضطرابات الدموية.
- كما يساعد هذا الاختبار الأطباء في مراقبة فعالية المعالجة الكيميائية أو الاشعاعية عند مرضى السرطان.

النسب الطبيعية لتعداد الكريات البيض

يملك الرضع بعد الولادة عدد أكبر من الـ WBCs والتي تنخفض بشكل تدريجي حتى تصل للمجالات الطبيعية الموجودة عند البالغين.

يوضح الجدول التالي المجالات الطبيعية للـ WBCs بكل 1 ملم^3 في الدم تبعاً University of Rochester Medical Center (UMRC) :

Age range	WBC count (per mcL of blood)
newborns	9,000 to 30,000
children under 2	6,200 to 17,000
children over 2 and adults	5,000 to 10,000

تختلف المجالات الطبيعية بمعدل قليل بين مخبر وآخر.

والنسب الطبيعية لأنواع الـ WBCs في التعداد الكلي تكون حسب الجدول التالي، وذلك تبعاً لـ Leukemia & Lymphoma Society (LLS)

Type of WBC	Normal percentage of overall WBC count
neutrophil	55 to 73 percent
lymphocyte	20 to 40 percent
eosinophil	1 to 4 percent
monocyte	2 to 8 percent
basophil	0.5 to 1 percent

التغيرات المرضية

زيادة عدد الكريات البيض:

- فرط تصنع الدم في نقي العظم كما في الابيضاضات التي يمكن أن يرتفع فيها العدد إلى مئة ألف وأكثر
- الالتهابات والانتانات: حيث يمكن أن يصل العدد إلى 12-20 ألف/ملم^3 أو أكثر
- الاحتشاءات، الصدمة الجراحية، التمارين الرياضية، تناول الطعام، النزيف

نقص عدد الكريات البيض :

- تثبيط التصنيع في النقي كما في فقر الدم اللامصنع، العلاج الإشعاعي أو الكيميائي للسرطان....ال خ
- الإصابات الانتانية :
  ١- بعض انتانات جرثومية: الحمى التيفية، البروسيلا، الاصابات السلية الحاد ة
  ٢- انتانات طفيلية: اللاشمانيا الحشوية، بداية الملاريا
  ٣- انتانات فيروسية: كالإنفلونزا، التهاب الكبد الانتاني
- تناول بعض الأدوية: الكلورامفنكول، مركبات البيرازولون Pyrazolone، مركبات السلفا، أدوية ابيضاض الدم.

طريقة العد اليدوي

- يلزم ممص التعداد وممص التمديد أو الـ micropipette وهو الأسهل والأكثر شيوعاً ودقة
  - ممص التمديد يسمح بإجراء نوعين من التمديد
    - ✓ 10 مرات: اذا سحبنا للرقم 1 وأكملنا لل 11 بالممد د
    - ✓ 20 مرة: اذا سحبنا دم ل 0,5 وأكملنا لل 11 بالممد د
  - باستخدام الـ micropipette: نسحب 400 ميكروميتر من سائل التمديد و 20 ميكروميتر دم مسحوب على EDTA وبالتالي نحصل على تمديد 20/1
- الممدد الخاص بتعداد الكريات البيض diluent : حمض الخل الثلجي بتركيز 2%
  - ✓ وظيفته حل الكريات الحمر حتى نستطيع رؤية الكريات البيضاء لأن عدد الكريات الحمراء كبير جداً ويغطي الساحة المجهرية
  - ✓ ويعطي لمعة لنوى الكريات البيضاء، فتظهر على شكل نواة لامعة.

آلية العمل:

1- نسحب دم وريدي على أنبوب حاوي على الـ EDTA

2- نمدد الدم المسحوب: 400 مايكرومتر حمض الخل الثلجي 2% و 20 مايكرومتر دم ، نضعهم في أنبوب

3- ننتظر 5 دقائق حتى تنحل الكريات الحمر بشكل كامل

4- نجهز العدادة في هذا الوقت \غسل عدادة نيوباور وساترة بالماء ثم الكحول 70%

5-نضع على طرفي الساترة بعد انقضاء فترة الانتظار نقطة من المزيج أعلى وأسفل الساترة ونتركها تنساب بسهولة تحت الساترة وتدخل ضمن حجرة التعداد

6- نبحث عن الساحة على التكبير 10 ويتم التعداد على التكبير 40

7 - يظهر على التكبير 40 مربع واحد فقط من المربعات ال16 الصغيرة التي ينقسم إليها مربع الكريات البيضاء الكبير

8-تختلف أبعاد الكريات البيضاء حسب نوعها: الكبيرة مثل الوحيدات بحدود25 ميكرون، والصغيرة بحدود 9 ميكرون ، أما الكريات الحمراء فتكون أبعادها 7-9 ميكرون فالكريات البيضاء الصغيرة قد تكون قريبة إلى حجم الكريات الحمراء(

9- طول ضلع كل واحد من المربعات 1 ملم والارتفاع 0,1 ملم

حجم المربع الصغير= الطولX العر ضx الارتفاع = 1x1x0,1= 0,1 ملم^3

)نريد الحجم في 1 ملم^3 لذا نضرب بـ 10 (

10- لتحويل الرقم لنتيجة مخبرية: نطبق المعادلة التالية

$$\text{Cell/mm}^3 = \frac{No.of\ cell}{No.of\ sequare} \times dilution\ Factor \times volume\ Factor (10)$$

$$\Rightarrow \text{Cell/mm3} = \frac{No.\ of\ cell}{4} \times 20 \times 10$$

$$\text{Cell/mm}^3 = No.\ of\ cell \times 50$$

ملاحظة : هذه المعادلة عندما تكون نسبة التمديد 20 وعدد المربعات 4

- إذا كان المحلول ممدد 10 مرات، نطبق المعادلة من البداية، ونضرب ب 10
- إ ذا تغيرت نسبة التمديد، أو تغير عدد المربعات، فإن الرقم يتغير كليا

اختبار لطاخة الدم The Blood Smear Test

- ✓ يلعب اختبار لطاخة الدم دور أساسي في التشخيص السريع لعدواى أو أمراض معينة.
- ✓ نستخدم في هذا الاختبار قطرة دم واحدة ونفرشها على صفيحة مجهرية ومن ثم يتم معالجة هذه الصفيحة بملون له لون معين ومن ثم يتم فحصه تحت المجهر.
- ✓ توضح لطاخة الدم عينة من مكونات الدم متضمنة الصفيحات والكريات البيضاء والكريات الحمراء .
- ✓ يتم استخدام اختبار لطاخة الدم بشكل نموذجي كاختبار تابع وذلك بعد الحصول على نتائج غير طبيعية (شاذة) في اختبار التعداد الدموي الشامل CBC، وبالتالي تعد اللطاخة الدموية عبارة عن مساعد تشخيصي أساسي وحيوي في الاجراءات المخبرية.

الاجراءات:

- يتم إجراء اللطاخة من عينة 5مل دم من المريض مأخوذة على أنبوب حاوي على EDTA (الدم المأخوذ وريدي وفي حالات قليلة يقبل الدم الشعري)
- نأخذ قطرة بالأنبوب الشعري من الدم المسحوب على EDTA وتوضع على طرف صفيحة جافة ونظيفة
- نأخذ ساترة ونقربها من قطرة الدم ونقربها بزاوية 45 حتى تلامسها وتتوزع قطرة الدم على طول ضلع الساترة
- تدفع الساترة العلوية إلى الأمام وبسرعة ودون توقف مما يؤدي غلى فرش قطرة الدم بشكل متجانس على طول الصفيحة وبذلك يمكننا تمييز منطقتين على الصفيحة:
  - ✓ منطقة سميكة من الخلايا وهي المنطقة الممثلة ببداية الصفيحة

✓ منطقة رقيقة من الخلايا وهي المنطقة التي سوف تدرس فيها الصيغة (قبل الثلث الأخير)

- نتركها لتجف تماما

صفات اللطاخة الجيدة:

1(متجانسة متكاملة لا توجد فيها خطوط أو فراغا ت

2(نهاية اللطاخة ملساء وغير مشرشره

3(يجب أن يكون طولها مناسب

4(يجب أن تكون ذات ثخانة مناسبة

الملونات المستخدمة:

- ❖ بصورة عامة هناك ملونات أساسية Basic stain وملونات حامضية Acid stain
- ❖ حيث تقوم الملونات الأساسية بتلوين الهيولى، وتقوم الملونات الحامضية بتلوين نواة الخلية
- ❖ وبالتالي يلزمنا لتلوين الخلية الملونين معا (أساسي كزرقة الميتلين وحمضي كالأيوزين) وتدعى بالملونات المعتدلة التي تتكون من مزيج من الملونات الأساسية والحامضية، أي مزيج من الأيوزين وزرقة الميتلين
- ❖ أهم هذه الملونات المضاعفة وأكثرها شيوعا هما ملون رايت Wright وملون غيمزا Gimesa

تتمة الاجراءات:

- يطبق محلول غيمزا أو رايت مباشرة على اللطاخة بعد تجفيفها جيدا
- ننتظر خمس دقائق
- ملاحظة: عند التلوين في حال حصلنا على لون غامق نقلل من زمن وضع الملون، وإذا كان فاتحا نزيد من الزمن.

- نغسل اللطاخة بالماء للتخلص من الملون الزائد ولن تتأثر عينة الدم لأنه تم تثبيتها بالميتانول الموجود مع الملون والذي يحافظ على شكل الكريات كما هي ويتم الغسيل تحت الماء قطرة قطرة بحيث نزيل بقية الملون
- ننتظرها حتى تجف
- نقوم بفحصها تحت المجهر على التكبير 40
- نضع زيت الأرز ونفحص بالعدسة الغاطسة (تكبير 100)
- نقوم بالعد على الأقل 100 كرية بيضاء وننتقل على ساحات مختلفة ونختار الساحات التي يكون فيها الفرش ممتاز بحيث لا يوجد تكدس للكريات ولا نقترب من الحواف الخارجية للطاخة لأن الكريات تكون بأشكال غير نموذجية عند الأطراف وكلما عددنا أكثر كانت النسبة أدق
- إذا قمنا بعد أكثر من 100 كرية فإننا نحول العدد لنسبة مئوية

مثلا : إذا عددنا 300 كرية بيضاء تحتوي 210 عدلات ---< كل 100 كرية بيضاء تحتوي xعدلة

<u>للتمييز بين أنواع الكريات البيضاء يجب معرفة خصائص وصفات كل خلية:</u>

<u>(يجب النظر إلى مجمل الصفات وليس صفة واحدة)</u>

الخلية	أبعادها	شكل النوا ة	ماذا تحتوي السيتوبلازما
العدلات Neutrophil	9-15 ميكرون	النواة مقسمة من 2 - 5فصوص (قد تكون هذه الأقسام متصلة أو منفصلة بخيط من الكروماتين)ولونها بنفسجي إلى بنفسجي غامق	تحتوي حبيبات صغيرة جدا ولكنها ليست مميزة كثيرا كحبيبات الحمضات والأسسا ت

Band Neutrophil (هي مرحلة من العدلات قبل انقسام النواة)		نواتها على شكل حرف U أو نعل الفرس	يوجد حبيبات صغيرة ضمن السيتوبلازما
الأسسات Basophil	12 -17 ميكرون	نواتها بشكل حرف Sوهي ليست واضحة أبدا ، لأن حبيباتها متوضعة في النواة	السيتوبلازما والنواة تحتوي على حبيبات أساسية بلون بنفسجي غامق (وهذا النواة غير واضحة)
الحمضات Eosinophil	12 -16 ميكرون	مقسومة إلى فصين متوضعين قرب بعضهما	حبيباتها حامضية لونها برتقالي - زهر وحجمها كبير وهي واضحة وتشبه حب الرما ن
اللمفاويات Lymphocyte	أصغر الخلايا 6-15 ميكرو ن	نواتها بشكل بيضوي أو كروي بلون بنفسجي غامق ويوجد طرف صغير من السيتوبلازما بلون أزرق فاتح	النواة والسيتوبلاسما بلا حبيبا ت أحيانا تأخذ النواة حجم الخلية بالكامل وأحيانا تظهر السيتوبلاسما
الوحيدات Monocyte	أكبر الكريات البيض 25 ميكرو ن	نواتها بشكل الكلية ونواتها غير واضحة وشكلها غير نموذجي وقد تحتوي على فجوات وهي كبيرةالحجم	تظهر السيتوبلاسما بلون رمادي، وقد تحتوي على فجوات ولاتحتوي على حبيبات.

المطلوب:

- حضر لطاخة وتدرب جيدا حتى تحصل على محضر جيد
- لون بشكل جيد

- عد 100 كرية بيضاء على الأقل وحدد نسبة كل نوع من أنواع الكريات في اللطاخة التي قمت بتحضيرها
- مرعلى كل محضر مجهول مقدم من قبل مشرف الجلسة وحدد نسب أنواع الكريات وحدد ماهي الحالة المرضية المتوقعة إن وجد ت
- يتم العمل بشكل ثنائي على المجهر وكل طالب يقوم بتحضير محضره لوحده

تعداد الكريات الحمرRBCs

لتعداد الكريات الحمراء يلزمنا: محلول التمديد، ممص التمديد، العدادة

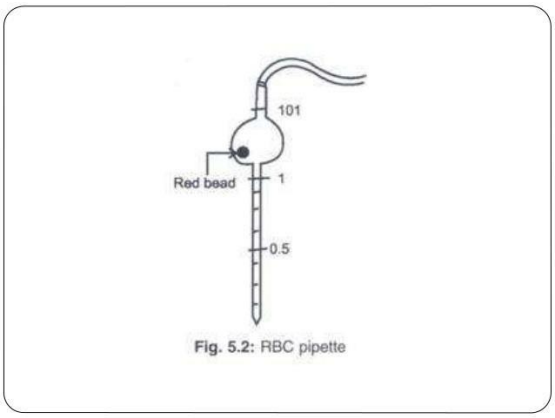


Fig. 5.2: RBC pipette

1(ممص **تمديد الكريات الحمراء:** عبارة عن

- أنبوب شعري مدرج (1 – 0,5)
- الحجرة: حجمها يحتوي 100 ضعف حجم الأنبوب الشعري، وتحتوي كرة لونها أحمر لتمزج الدم مع الممد د
- القسم العلوي يدل على نهاية التمديد\مدرج تدريجة 101
- هذا الممص يسمح بإجراء نوعين من التمديد

✓ نسحب الدم إلى 1 ونكمل بالممدد إلى 101 وبالتالي نسبة التمديد 100 مر ة

✓ نسحب الدم إلى 5.0 ونكمل بالممدد إلى 101 وبالتالي تكون نسبة التمديد 200 مر ة

✓ نسبة التمديد الاعتيادية هي 200 مر ة

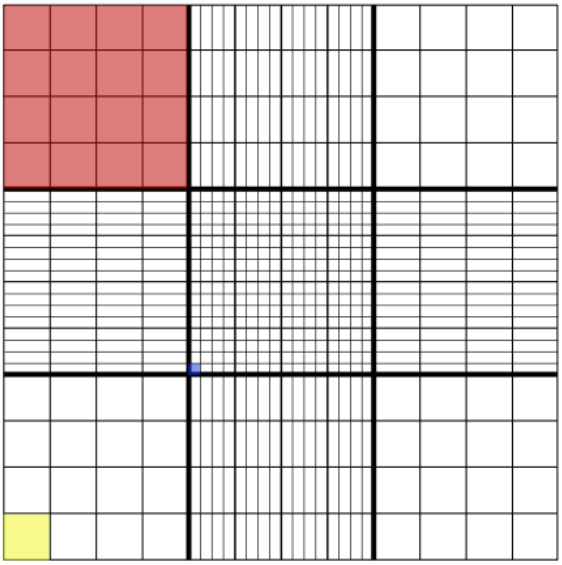
2(**الممدد *Diluent* :** إن الممدد المستخدم لتعداد الكريات الجمراء هو المصل الفيزيولوجي Normal Saline \NaCl 0.9%\ \

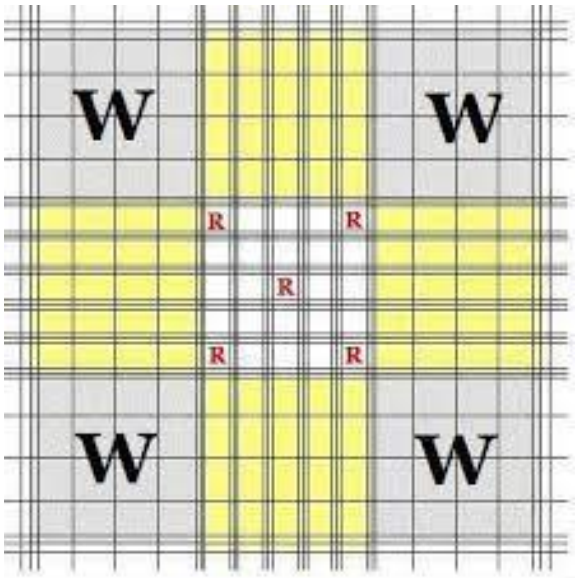
وهو عبارة عن محلول معادل للتوتر، يحافظ على شكل الكريات الحمراء، بينما في حال كان المحلول منخفض التوتر يدخل الماء إلى داخل الكرية الحمراء فتنتبج وتنفجر، وإذا كان المحلول عالي التوتر فتنكمش الكرية الحمراء ويخرج الماء منها.

- ✓ وهناك ممدد آخر مستخدم هو محلول Hayemيستخدم في تعداد الكريات الحمراء (تركيبته هي كلور الصوديوم وكبريتات الصوديوم ومحلول السليماني (كلور الزئبق) والماء)

3(**العدادة**: عدادة نيوباور حيث سنقوم بعد الكريات الحمراء في المربع المركزي المخصص للكريات الحمراء

- ✓ مربع الكريات الحمراء الكبير مقسوم إلى 25 مربع متوسط مفصولين بخطوط ثنائية
- ✓ كل مربع متوسط مقسوم إلى 16 مربع صغير
- ✓ نقوم بالبحث عن الساحة على التكبير 10 ونقوم بالعد على التكبير 40





<u>طريقة العمل:</u>

1(نسحب دم وريدي ونضعه في أنبوب يحتوي EDTA

2(نقوم بالتمديد 200 مرة\حجم دم إلى 200 حجم ممدد\ويكون التمديد إما باستخدام :

- ✓ ممص التمديد: نسحب دم حتى 5.0 ونكمل بالممدد إلى 101 وثم نقوم بالمزج وننتظر عدة دقائق ونجهز العدادة

✓ باستخدام الـ Micropipette : نسحب دم 20 ميكرون ونمدد بـ 4000 ميكرون(4مل)مصل فيزيولجي

3(قبل استخدام العدادة يجب تنظيفها وتجفيفها، ثم نثبت الساترة عليها

4(نضع السائل الذي يحتوي الدم مع الممدد ضمن حجرة التعداد

5(نضع العدادة على التكبير 10 ريثما تظهر المربعات، نبحث عن مربع الكريات الحمراء وهو المربع المركزي ومن ثم ننتقل إلى التكبير 40 (نجعل الإضاءة أقل ما يمكن)

6(نعد الكريات الحمراء فقط ب 5 مربعات متوسطة هي مربعات الأطراف والمربع المركزي وننتبه إلى موضوع الكريات الموجودة على حواف الأضلاع

7(نجمع الكريات الناتجة في المربعات الخمسة

8(لنحول الرقم الناتج عن العد إلى نتيجة مخبرية نستخدم القانو ن

$$\text{Cell/mm}^1 = \frac{No.of\ cell}{No.of\ sequare} \times dilution\ Factor \times volume\ Factor$$

$$\Rightarrow \text{Cell/mm3} = \frac{No.\ of\ cell}{5} \times 200 \times 250$$

$$\text{Cell/mm}^2 = No.\ of\ cell \times 10000$$

طريقة حساب الـ *volume factor* :

- حجم المربع = طول الضلعx طول الضلعx الارتفاع

طول ضلع المربع الكامل= 1 ملم وطول ضلع المربع المتوسط هو 5/1 ملم

---

[1] • للرجال: 7,4 – 6,1 مليون/ملم[3]

[2] • للنساء غير الحوامل: 5,4 – 4,2 مليون \ ملم[3]

والارتفاع = 0.1 ملم

وعد د المربعات = 5

- نحول حجم المربع إلى 1 ملم^3: نضرب بـ 250 وهو معامل الحجم
-

أسباب الارتفاع:

- احمرار الدم الحقيقي
- التجفاف
- المرتفعات
- آفات القلب الولادية
- التدخين

أسباب الانخفاض

- النزف
- انحلال الدم
- فقر الدم
- المعالجة الكيميائية
- قصور الكلية
- الحمل
- سوء التغذية
- الأعواز الغذائية: تتضمن عوز الحديد والنحاس والفوليك أسيد و فيتامين B12 و B6
- اضطرابات الغدة الدرقية

المطلوب خلال الجلسة:

- تعداد الكريات الحمراء لعينة دم
- التدرب مرة ثانية على مد لطاخة دموية بدون تلوين
- حضرجدول يوضح الفرق بين أسلوب تمديد لعد الكريات البيضاء والكريات الحمراء من حيث: سائل التمديد، الهدف من التمديد، نسبة التمديد، مربعات العد على العدادة

تعيين مقدار الهيماتوكريتHematocrit

- Hematocrit=Packed cell volume (p.c.v)\حجم الخلايا المكدسة\
- كلمة هيماتوكريت هي كلمة باليونانية وتعني فصل الد م
- عملياً: هي النسبة المئوية للكريات الحمراء منسوبة إلى الدم الكامل
- يعتمد هذا الاختبار على عدد وحجم الكريات الحمرا ء
- هو اختبار ملحق لاختبار الـ CBC
- بما أن الهدف الرئيسي للكريات الحمراء هو نقل الأوكسجين إلى كافة أنسجة الجسم، فإن منسب الهيماتوكريت يعتبر كنقطة مرجعية تستخدم لمعرفة مقدرة الكريات الحمراء على توصيل الأوكسجين، ففي حال كانت النسبة مرتفعة أو منخفضة فإن ذلك يدل على الاضطرابات الدموية أوالتجفاف أو الحالات الطبية الأخرى

مبدأ الطريقة:

✓ يعتمد تحديد الهيماتوكريت على تعيين نسبة الكريات الحمراء إلى البلازما الدموية في 100 مل من الدم، بعد تثفيله بمثفلة خاصة تدعى مثفلة الهيماتوكريت

✓ يعتبر هذا الاختبار من الاختبارات السهلة والسريعة وقليلة الأخطاء والتكاليف، ولذلك فهي تحظى بأهمية بالغة في الأمراض الدموية.

طريقة العمل)طريقة الأنابيب الشعرية(:

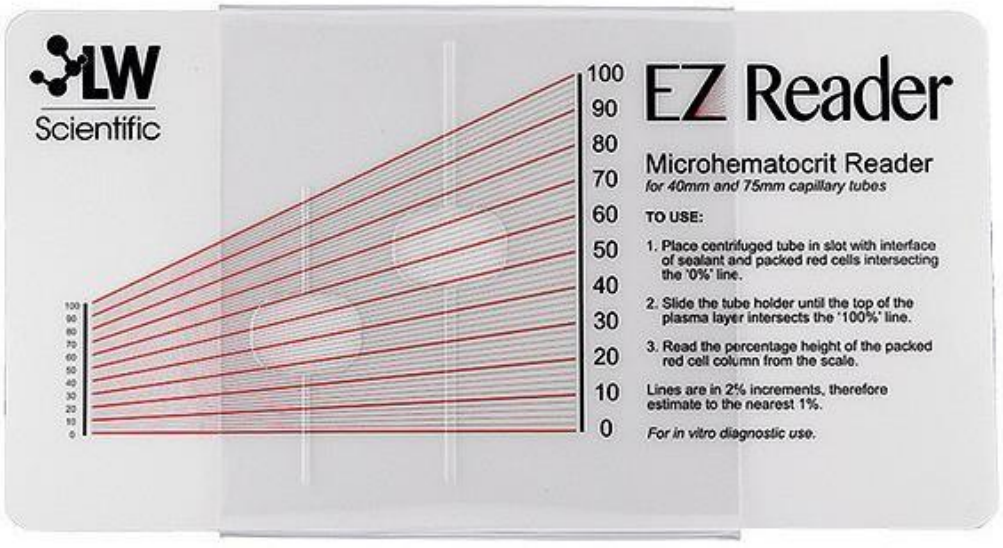
1. نستخدم لهذه الغاية أنابيب خاصة تسمى أنابيب الهيماتو كريت وهي أنابيب شعرية طولها 7,5 سم وقطرها 1 ملم مفتوحة من الطرفين

لها نوعان:

a. <u>أنابيب جافة</u>: غالباً يملك حلقة بلون أزرق على أحد طرفيه ولا تحوي مضاد تخثر، وتستخدم لتحديد الهيماتوكريت للدم المأخوذ على مضاد تخثر.
b. <u>أنابيب تحوي مضاد تخثر:</u> غالباً لون الحلقة أحمر على أحد طرفيه، حيث تكون الجدران الداخلية لهذه الأنابيب مطلية بالهيبارين، وتستخدم لتحديد الهيماتوكريت للدم المأخوذ من الاصبع مباشرة بحيث تملأ الأنابيب من دم الاصبع مباشرة.

ملاحظة: في حال سحب الدم على مضاد تخثر لا نضعه في أنبوب يحوي مضاد تخثر كي لا ينحل

٢. مثفلة الهيماتوكريت: هي مثفلة خاصة بالأنابيب الشعرية وتتسع حتى 24 أنبوب، وتقوم بفصل السائل عن المواد الصلبة باستخدام قوة التنبيذ عند الدوران بسرعة عالية
٣. المعجون الخاص بإقفال طرف الأنبوب الشعري، أو يتم الاقفال باستخدام اللهب.
٤. مسطرة الهيماتوكريت: والتي نستخدمها عند حساب حجم الكريات الحمراء، وهي مسطرة يدوية مدرجة من 0 إلى 100، خط الصفر وخط ال 100 خطان ثابتان، نثبت نهاية الأنبوب المغلقة على الخط 0 ونقوم بتحريك الأنبوب على المسطرة المرسومة حتى يصبح نهاية خط البلازما عند الخط 100، ونحدد منها نسبة الكريات الحمراء با لنسبة(نقرأ القياس عند نهاية خط الكريات الحمراء)لحجم الدم الكامل، وهو قيمة الهيماتوكريت.



طريقة العمل:

1(نملأ ثلاثة أرباع الأنبوب بالدم من الجهة غير الملونة

2(نسد طرف الأنبوب الآخر بخط معجون خاص أو بواسطة لهب مناسب و يجب أن يكون الاغلاق محكماً

3(نضع الأنبوب الشعري في المثفلة الخاصة، بسرعة دوران 7000 دورة/دقيقة لمدة خمس دقائق

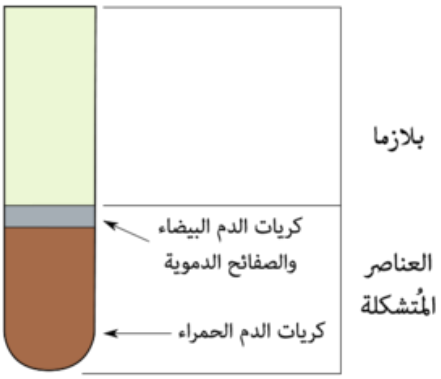
نضع الأنابيب بحيث تكون الجهة المسدودة نحو المحيط والجهة المفتوحة نحو المركز

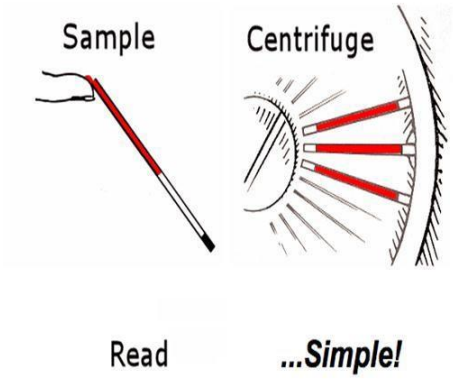
4(بعد تثفيل الدم ينفصل إلى ثلاث طبقا ت :

a. في الأسفل\ RBCs

b. طبقة غير واضحة buffy coat \صفيحات وكريات بيضاء\

c. في الأعلى\ البلازما





القيم الطبيعية للهيماتوكريت:

- نساء: 36% -48 %
- رجال: 42% - 52 %
- أطفال: 30% - 44 %

بصورة عامة:

- ينقص مقدار الهيماتوكريت بنقصان الكريات الحمر كما في النزوف والانحلالات وفقر الد م
- يزداد الهيماتوكريت بازدياد الكريات الحمراء كما في حالات زيادة الخضاب واحمرار الدم

معايرة الهيموغلوبين Haemoglobin

الهيموغلوبين -الخضاب: بروتين يتوضع ضمن كريات الدم الحمراء ويكون مسؤولا عن نقل الأوكسجين من الرئتين إلى أنسجة الجسم وإرجاع ثاني أوكسيد الكربون من الأنسجة إلى الرئتين.

معايرة الهيموغلوبين بطريقة درابكن Drabkin:

المبدأ :

– تتم معالجة الهيموغلوبين للحصول على سيان ميتهيموغلوبين Cynmethemoglobin والذي تتم معايرته لونيا

– تتم المعالجة وفق التفاعلات التالية:

$$Hemoglobin \xrightarrow{Potassium\ ferricyanide} methemoglobin$$

$$methemoglobin \xrightarrow{Potassium\ cyanide} cynmethemoglobin$$

القيم المرجعية:

الرجال: 13-18 g/dl

النساء: 11-16 g/dh

حديثي الولادة: 4-23 g/dl

✓ عند انخفاض قيم الهيموغلوبين عن المقادير المرجعية فإننا أمام حالة فقر دم والتي لها العديد من الأسباب:

– فقر دم بعوز الحديد

– فقر دم بعوز الفوليك أسيد والفيتامين B12

- فقر الدم المنجلي
- التلاسيميا وغيرها.

العينات المستخدمة:

✓ دم مسحوب على EDTA

✓ الكواشف:

- كاشف درابكن(يحتاج إلى تمديد) والذي يتألف من :

- فيري سيانيد البوتاسيوم 0.6 mmol/L
- سيانيد البوتاسيوم 0.9 mmol/L
- فوسفات أحادية الصوديوم 1.0 mmol/L

- محلول عياري من الميتيهيموغلوبين بتركيز 18 g/dL وهو جاهز ولا حاجة لتطبيق تفاعل درابكن عليه

خطوات العمل:

تختلف طريقة العمل من Kit لآخر

المطلوب خلال الجلسة

➢ سحب دم على أنبوب EDTA

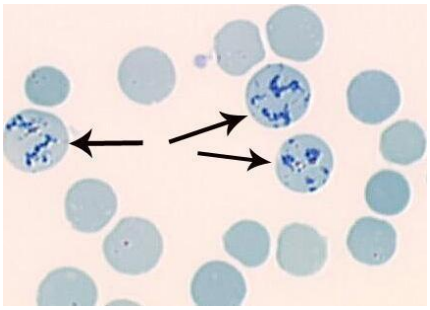
➢ تحضير العينة وملاحظة اللون الناتج

➢ قراءة الكثافة الضوئية وتسجيلها ضمن التقرير

➢ حساب التركيز المقابل للكثافة وتسجيلها ضمن التقرير

الشبكيات Reticulocytes

- هي المرحلة الأخيرة من مراحل تشكل الكريات الحمراء، حيث يتم إطلاق الشبكيات من نقي العظام إلى الدوران المحيطي



– وبالتعريف: هي كريات حمراء فتية غير ناضجة تحتاج إلى 48 ساعة أثناء وجودها في الدم المحيطي حيث تتحول إلى كرية حمراء ناضجة.

– تختلف الشبكيات عن الكريات الحمراء الناضجة بـ:

- ❖ الشبكيات أكبر حجماً: الكرية الحمراء حجمها بين 7-9ميكرون أما الشبكيات أكبر بقليل
- ❖ تحتوي الشبكيات على بقايا RNAوالتي تتخلص منها تدريجياً ثم تتحول إلى كرية حمراء ناضجة عند تخلصها من الـ RNAبشكل كامل

– نرى الشبكيات تحت المجهر بشكل كرية حمراء حجمها كبير، تحتوي عدة نقاط بلون أزرق) وهي بقايا الـ RNA(وتكون كمية الـ RNA كبيرة عندما تكون الخلية قد خرجت للتو إلى الدوران، أما عندما تكون كمية الـ RNA أصغر فتكون الخلية قد اقتربت إلى أن تصبح كرية ناضجة

– نكشف عن الشبكيات بتلوين الخلايا إما بزرقة الميتلين أو زرقة الكريزيل اللماعة والتي تقوم بترسيب الـ RNAعلى شكل حبيبات وخيوط تبدو واضحة عيانياً ومميزة للشبكيات.

– اختبار الشبكيات هام للتمييز بين فقر الدم المصنع وفقر الدم اللامصنع:

- في فقر الدم المصنع تكون نسبة الشبكيات عاليةحيث يقوم نقي العظام السليم بمحاولة لتعويض فقر الدم فيعمل بمعدل أعلى من الطبيعي فترتفع نسبة لشبكيات
- أما في فقر الدم اللامصنع: تكون نسبة الشبكيات قليلة جداً ونقص في عناصر الدم وذلك لقصور إنتاجها من نقي العظام لوجود مشكلة فيه فلا يستطيع تعويض النقص وبالتالي تكون نسبة الشبكيات قليلة.

طريقة العمل:

1(نسحب دم وريدي ونضعه في أنبوب يحوي مضاد تخثر EDTA

2(نأخذ أنبوب نظيف ونضع فيه حجم من الدم مع حجم مساو له من الملون ثم ننتظر 20 دقيقة بحرارة 37 درجة بجو لا يحوي تيار هوائي

3(بعد 20 دقيقة نحضر اللطاخة على سلايد حيث نضع نقطة من المزيج (الدم مع الملون) على أحد طرفي السلايد ونمدها على كامل السلايد كما فعلنا في جلسة مد اللطاخة

4(بعد مد اللطاخة نلاحظ 3 مناطق: منطقة كثيفة ثم منطقة أقل كثافة ثم منطقة واحدة من الخلايا ذات لون فاتح (وهي المنطقة التي ندرس فيها الشبكيات)

5(نعد الشبكيات ضمن 1000 كرية حمراء في اللطاخة ونحسبها كنسبة مئوية

6(نستخدم العدسة الغاطسة في العد

--- كيف نعد 1000 كرية حمراء؟

- نعد ساحتين متتاليتين بنفس الخط الشاقولي لتكون سماكة اللطاخة متقاربة
- نحسب المتوسط الحسابي لعدد الكريات الحمراء في هاتين الساحتين
- نحسب كم ساحة يلزمنا لنصل إلى 1000 كرية حمراء تقريباً، بناء على المتوسط الحسابي

مثال:

- ❖ في الساحة الأولى يوجد 100 كرية حمراء وفي الساحة الثانية يوجد 120 كرية حمراء
- ❖ يكون المتوسط الحسابي ١١٠ كريا ت
- ❖ وبالتالي نفترض أنه يوجد حوالي 110 كريات في كل ساحة، فإذن يلزمنا 9 ساحات لكي يصبح العدد 1000 كرية
- ❖ ننتقل إلى 9 ساحات متتالية ونعد الشبكيات فقط دون عد الكريات الحمراء (لا يوجد تقسيمات أومربعات)
- ❖ نحسب النسبة المئوية للشبكيات

7(إذا طلب منا العدد المطلق للشبكيات، نقوم بإجراء الاختبار السابق لمعرفة النسبة المئوية للشبكيات ثم نقوم بعد الكريات الحمراء بالعدادة لمعرفة العدد الكلي للكريات الحمراء

مثال:

تعداد الكريات الحمراء بالعدادة 4 مليون وعدد الشبكيات 0,5% فيكو ن

كل 100 كرية حمراء تحتوي 0,5 شبكية

كل 4 مليون كرية حمراء تحتوي xشبكية

x= 20 ألف شبكية القيمة المطلقة

القيم الطبيعية للشبكيات:

- للكبار:0,5 -2 % من عدد الكريات الحمراء الناضجة
- الولدان: 2-6% من عدد الكريات الحمراء الناضجة
- القيم المطلقة للشبكيات هي 25000- 75000 كرية/ ملم^3

التغيرات المرضية:

- تزداد الشبكيات في حالات النزوف، استئصال الطحال، انحلال الدم، الحمل، فقر الدم المنجل ي
- تنقص الشبكيات في حالات فقر الدم بعوز فيتامين B12، التعرض للأشعة، فقر الدم اللامصنع.

المطلوب من الجلسة:

1(حساب قيمة الهيماتوكريت لكل مجموعة طلاب مكونة من طالبين.

2(سحب دم وريدي على أنبوب حاوي على EDTA

3(حساب نسبة الشبكيات في العينة وقيمتها المطلقة

مناسب الكريات الحمراء Red Blood Cell Indices

كانت هذه المناسب تدعى سابقا بالقيم المطلقة للكريات الحمراء Absolute Value وهي ذات قيمة تشخيصية هامة في الأمراض الدموية وتشمل القيم التالية:

1(متوسط خضاب الكريات MCH \Mean Corpuscular Hemoglobin

2(متوسط حجم الكرية MCV \Mean Corpuscular Volume

3(متوسط تركيز خضاب الكرية MCHC \ Mean Corpuscular Hemoglobin concentration

أولاً: متوسط خضاب الكريات *MCH*: كمية الهيموغلوبين في الكرية الحمراء الواحدة

- **واحدته:** بيكو غرام p.g = 10^{-12} غرام

حسابه: ✦ $MCH = \frac{Hb(g/dl)}{RBC\ count\ (million/mm3)} \times 10$

- **القيم السوية:**
  - ✓ البالغين والأطفال: 31 p.g -27
  - ✓ حديثي الولادة: 32-34 p.g

ثانياً: متوسط حجم الكرية *MCV*:

- **واحدته:** فيمتوليتر Femtoliter = 10^{-15}

حسابه: ✦ $MCV = \frac{HT(\%)}{RBC\ count\ (million/mm3)} \times 10$

-
-

- **القيم السوية:**
  - ✓ ثلاثة أضعاف قيم MCH

 82-92 Fl

التغيرات المرضية لـ MCV و MCH

 يرتفع كل منهما في :

- ✓ فقر الدم الوبيل (نقص حمض الفوليك أو نقص فيتامين B12)
- ✓ آفات الكبد

 يتناقص كل منهما في:

- ✓ فقر الدم بعوز الحديد

✓ التلاسيميا

ثالثاً: متوسط تركيز خضاب الكرية *MCHC*

- واحدته: غ/دل، أو%

حسابه: $MCHC = \frac{Hb(g/dl)}{HT(\%)} \times 100$

- القيم السوية: 31-37 %
- ينخفض في حالات فقر الدم بعوز الحديد والتلاسيميا
- يرتفع في داء تكور الكريات

مثال لتوضيح كيفية الحساب:

✓ لنفترض أن الهيماتوكريت = 45 %

✓ الخضاب 14

✓ عدد الكريات الحمراء 5 مليون بالملم^3

إذا :

- $MCH = \frac{14}{5} \times 10 = 28\ p.g$
- $MCV = \frac{45}{5} \times 10 = 90\ FL$
- $MCHC = \frac{14}{45} \times 100 = 31.11\%$

سرعة التثفل

Erythrocyte sedimentation rate

هو عبارة عن مسافة سرعة ترسيب كريات الدم الحمراء، وذلك بعد ترك عينة الدم غير المتخثر في وضع عامودي مدة ساعة أو ساعتين من الزمن، وتقاس هذه السرعة بالميلي متر في الساعة mm/hr.

- ❖ تحليل سرعة ترسيب الدم هو تحليل غير نوعي، فهو لا يقوم بحد ذاته بدلالة أو تشخيص لمرض معين أو حالة مرضية محددة، ولكنه دلالة عامة على وجود التهاب inflammation في الجسم سواء كان حادا أو مزمنا .
- ❖ هناك عدة طرق لقياس سرعة الترسيب منها طريقة wester greenوطريقة ويستر غرين المعدلة وطريقةwintrobe

مبدأ العمل:

- ✓ قياس ارتفاع عمود البلازما الطافية على سطح طبقة الكريات الحمراء بعد تكدس الدم المجموع على مانع تخثر في أنبوب wester green
- ✓ ويترك ليترسب بشكل حر ضمن الأنبوب الموضوع بشكل شاقولي
- ✓ وتقرأ النتيجة بعد مدة ساعة واحدة ثم ساعتين
- ✓ يعبر عن النتيجة بالميلي متر في الساعة.

الأدوات المستخدمة:

1(مضاد التخثر المستخدم: محلول سترات الصوديوم بتركيز 3,8 غ%

2(الأنبوب المستخدم: أنبوب ويسترغرين وهو أنبوب مفتوح الطرفين طوله 30 سم وقطره 2,5 ملم ومدرج بتدريجات ميلي مترية من 0 حتى 200 ملم

3(نموذج الدم: يؤخذ أربع حجوم من الدم مع حجم واحد من محلول السيترات كمضاد تخثر و يؤخذ عادة

1,6 مل من الدم مع 0,4 من محلول السيترات

طريقة العمل:

- يوضع في أنبوب صغير عليه إشارة تدل على 2 مل محلول سيترات بمقدار 4.0 مل ويكمل حتى خط العيار2مل بالدم ويمزج جيدا، ثم نقوم بالخطوات التالية:

1(يسحب بواسطة أنبوب ويسترغرين من الدم الممزوج مع السيترات حتى التدريج 0.

2(نعلق الأنبوب بشكل قائم على جهاز خاص لهذا الاختبار.

3(ننتظر مدة ساعة ويقرأ الرقم عند الخط الفاصل بين الكريات والبلازما، ويعبر الرقم المقروء عن سرعة التثفل في الساعة الأولى مقدرا بالملم

4(ننتظر مدة ساعة ثانية ويقرأ الرقم عند الخط الفاصل بين الكريات والبلازما ويعبر الرقم المقروء عن سرعة التثفل في الساعة الثانية مقدرا بالملم.

طريقة ويسترغرين المعدلة:

لدى سحب الدم على مضاد تخثر EDTA يتم تمديد الدم لإجراء سرعة التثفل على الشكل التالي:

- 1,6 مل من الدم المأ خوذ على EDTA
- 0,4 مل من محلول السيترات أو المصل الفيزيولوجي

أو بالشكل التالي:

- 0,25 مل مصل فيزيولوجي
- 1 مل من الدم المأخوذ على EDTA

تمزج المقادير بشكل جيد وتعلق على الجهاز المختص.

الدم المستخدم :

- يجب أن يستخدم خلال ساعتين إذا ترك في حرارة الغرفة

- أو خلال 12 ساعة إذا ترك في درجة حرارة+ 4 مئوية.
- العينات المجمدة غير صالحة للاختبار.

المقدار الطبيعي:

إن المقدار الطبيعي لسرعة التثفل في الساعة الأولى هو:

Age	Male	Female
0-50	<15 mm/h	<20 mm/h
51-85	<20 mm/h	<30 mm/h
>85	<30 mm/h	<42 mm/h

Source: Sox H.C., Liang M.H. The erythrocyte sedimentation rate: guidelines for rational use. Ann Int Med 1986;104:515-23.

تتأثر سرعة التثفل بعدة عوامل:

- **نسبة بروتينات الدم:** من المعروف أن الألبومين يمنع ترسب الكريات الحمراء ولذلك فإن نقص الألبومين وزيادة الغلوبولينات المناعية بوجود التهاب تؤدي إلى زيادة سرعة التثفل
- **عدد الكريات الحمراء وحجمها:** إن لعدد وحجم الكريات الحمراء دور في زيادة أو نقصان سرعة التثفل

فمثلا: تزداد سرعة التثفل في فقر الدم، بينما تنقص في حالات زيادة عدد الكريات الحمراء كما في حالة احمرار الدم. \

بشكل عام تكون التغيرات المرضية لسرعة التثفل على الشكل التالي:

- **الحالات التي تزداد فيها سرعة التثفل:**

✓ تزداد سرعة التثفل فيزيولوجيا مع:

- تقدم العمر
- أثناء الحمل

- الحيض

✓ تزداد سرعة التثفل مرضيا في الحالات التالية:

- الالتهابات والأمراض الانتانية
- المراحل الحادة من الروماتيزم
- احتشاء القلب ويكون له قيمة تشخيصية هامة لأنها ترتفع في اليوم الثالث أو الرابع منه
- في أمراض الكلى وخاصة التهاب الكبيبات الحاد
- في الورم النقوي المتعد د نتيجة ارتفاع الغلوبولين
- ضخامة غلوبولين الدم "داء والدنستروم" نتيجة ارتفاع الغلوبولين
- الأورام الخبيثة

✓ **الحالات التي تنقص فيها سرعة التثفل:**

- احمرار الدم
- التجفا ف (الاسهالات الشديدة الاقياءات والتسممات الغذائية والكوليرا)
- انخفاض نسبة البروتين في الدم نتيجة خلل في الكبد أو الكلية

ملاحظات هامة :

- تنقص زيادة مضاد التخثر من سرعة التخثر
- يغير انحلال الدم من سرعة التخثر
- وجود فقاعات الهواء في ممص ويسترغرين إلى حدوث خطأ في النتائج
- يجب أن تكون الحرارة المستخدمة في سرعة التثفل 20 -25 مئوية وإذا حفظ الدم في البراد يجب أن ترتفع الحرارة إلى المجال المذكور قبل بدء العمل .
- يجب عدم هز المكان الموجود به أنبوب سرعة التثفل الحاوي على العينة

- لا تتأثر سرعة ترسيب الكريات الحمراء بموانع التخثر سترات الصوديوم أو EDTAعندما تستخدم بنسبتها الصحيحة، في حين يغير الهيبارين أو الأوكسالات سرعة ترسيب الكريات الحمراء وشكلها.

تعداد الصفيحات الدموية

إن تعداد الصفيحات يمكن إجراؤه سواء على الدم الوريدي أو الشعري: حيث يتم أخذ الدم الوريدي على EDTA

السوائل الخاصة بتمديد الصفيحات:

- ❖ يستخدم محلول حماضات الأمونيوم 1% لتمديد الصفيحات: يقوم هذا المحلول بحل الكريات الحمراء ويقدم خلفية واضحة لرؤية الصفيحات.
- ❖ ويستخدم أيضا محلول reez-eker: المؤلف من سترات الصوديوم وزرقة الكريزيل اللماعةوفورمول 40% وماء مقطر حتى 100 مل.

عد الصفيحات بالطريقة اليديوية التقليدية:

لتمديد الدم طريقتان:

- ❖ إذا كان عدد الصفيحات المتوقع كبيرا فإننا نمدد بنسب تمديد الكريات الحمر\200 مرة\ ونقوم بالعد في مربعات الكريات البيض حيث نعد في مربعين كبيرين متقابلين
- ❖ أما إذا كان عدد الصفيحات المتوقع صغيرا فنمدد بنسب تمديد الكريات البيض\20 مرة\ ونعد الصفيحات بمربع الكريات الحمر (المربع المركزي) حيث نعد خمس مربعات متوسطة.

خطوات العمل:

نستخدم أسلوب تمديد الكريات البيض

1(400 ميكرون سائل تمديد و20 ميكرون دم مسحوب على EDTA

2(نحرك جيدا وننتظر من 3-6 دقائق

3(نضع قطرة على عدادة نيوباو ر

4(نترك العدادة لتستقر فترة 20 دقيقة بدرجة حرارة 37 وبجو رطب)

5(نعد الصفيحات في مربع الكريات الحمر المركزي

6(نطبق القانون عدد الصفيحات في 1 ملم ^{3} = عدد الصفيحات)إما في مربعين كبيرين أو 5 مربعات متوسطة(X 1000

7(يقبل الخطأ في هذه الطريقة بنسبة 15% بسبب دقة وصعوبة العد.

القيم الطبيعية:البالغين: 150-400 ألف صفيحة/ملم^3

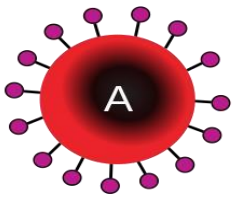
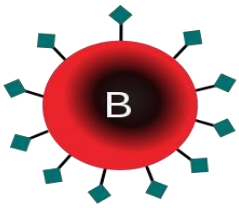
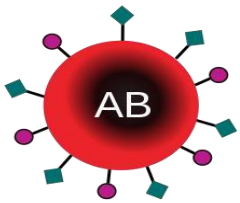
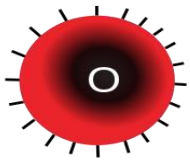
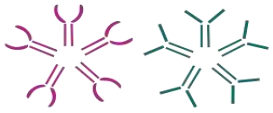
التغيرات المرضية:

- أسباب نقص الصفيحات:
  - أسباب عامة:
    - ✓ نقص إنتاج الصفيحات
    - ✓ تحطم الصفيحات (فرط الطحالية ، أخماج، أدوية)
    - ✓ استهلاك الصفيحات(التخثر الوعائي المنتشر)
    - ✓ أغلب أنواع ابيضاض الد م
  - أسباب أخرى:
    - ✓ قبل الطمث
    - ✓ بعض الأدوية: الأسسبرين والكلورامفنكول وحاصرات H2ومركبات السلفا
    - ✓ خلال الحمل يحدث نقص طفيف ويزداد بالأيام الأولى للولادة.
- أسباب زيادة الصفيحات:
  - أسباب عامة:
    - ✓ يزداد في النزوف نتيجة زيادة التصنيع النقوي كرد فعل معاو ض
    - ✓ بعض أنواع الابيضاضات

- ✓ متلازمة مابعد استئصال الطحال
- □ أسباب أخرى:
- ✓ العيش في الأماكن المرتفعة
- ✓ الجهد الشديد
- ✓ بعض الأدوية كمانعات التخثر الفموية

أنظمة Blood Group System وتنميط الدم Blood Typing :
الزمر الدموية

- تعريف الزمرة: عبارة عن مستضد antigen موجود على سطح الكرية الحمراء
- يوجد حوالي 600 antigen على سطح الكرية الحمراء مكتشف حتى الآن.

	Group A	Group B	Group AB	Group O
Red blood cell type				
Antibodies in plasma	Anti-B	Anti-A	None	 Anti-A and Anti-B
Antigens in red blood cell	A antigen	B antigen	A and B antigens	None

- من الجدول السابق يمكن أن نستنتج وجود طريقتين لمعرفة الزمرة الدموية:
  - الطريقة الكروية: وتعتمد على كشف المستضد الموجود على سطح الكرية الحمراء وذلك باستخدام مصول تحوي أضداد للزمر A,B\Anti A,Anti B ويتم العمل على صفيحة أو أنبوب
  - الطريقة المصلية: وتعتمد على كشف الأضداد الموجودة في المصل باستخدام معلق مستضدات (معلق من كريات حمراء معلومة الزمرة\ معلق كريات حمراء زمرتها Aومعلق كريات حمراء زمرتها B) ويتم العمل في الأنبوب أو على الصفيحة.

- **ملاحظات:**
  - لا يمكن تطبيق الطريقة المصلية على الأطفال دون الستة أشهر لعدم تشكل الأضداد في مصولهم بكمية كافية تسمح بكشف الزمرة
  - يجب أن يوجد تطابق بين نتيجتي الطريقتين، ولا تحدث خلافات إلا عندما تكون الزمرة ضعيفة أو التحوصب ضعيف.
  - تستخدم الكريات O لكشف الأضداد غير النظامية الفعالة بدرجة حرارة المخبر ولكشف الأضداد الباردة التي تعطي تراص مع A وB.
- الأضداد الباردة: هي الأضداد التي يظهر فيها تفاعل الارتصاص قويا وواضحا في درجات الحرارة المنخفضة ويكون التفاعل ضعيف في درجات الحرارة العالية ومنها Anti A, Anti B.

المجموعة RH (D) :

- وهو مستضد يتواجد على سطح الكريات الحمراء
- يحمل 85% من البشر هذا المستضد على كرياتهم الحمراء(إيجابي الريزوس) بينما لا تحمل البقية المستضد على كرياتهم (سلبي الريزوس)
- يتم تحديد هذا العامل على الصفيحة أو في الأنبوب بالطريقة الكروية وذلك باستخدام أضداد لهذاالمستضد Anti RH-Anti-D ولا يتم بالطريقة المصلية.

- ملاحظة هامة: عند حدوث تراص خفيف على الصفيحة أو في الأنبوب فهذا يعني كون المستضد من النوع الضعيف التراص D^U أو D Variant وقد لوحظ وجود هذا النوع من المستضدات لدى العرق الأسود

يجب الانتباه لمثل هذا المستضد الخفيف التفاعل لأن نتيجة الاختبار قد تعطى له على أنه سلبيRH وفي الحقيقة هو إيجابي خفيف، وفي هذه الطريقة يتم اللجوء لطريقة كومبس.

- إن أضداد الريزوس D تتفاعل جيدا في درجات الحرارة العالية لكونها من الأضداد الساخنة

لماذا يحدث التراص؟!

- ❖ بنية الـأضداد ثنائية التكافؤ (تأخذ شكل حرف Y)أي أنها تستطيع الارتباط مع اثنين من المستضدات
- ❖ والكريات الحمراء موجود على سطحها مستضد فعند لقاء الضد مع المستضد الموافق فيرتبطان معا، كما يرتبط الضد أيضا مع مستضد على سطح كرية أخرى، وتكثر الارتباطات فيحدث ارتصاص الكريات

هناك طريقتان لمعرفة الزمرة:

1(طريقة عكسية لنظام ABO) حصرا لأنه النظام الوحيد الذي لديه أضداد طبيعية نظامية (: يكون فيهاالمستضد معلوم و الـضد مجهو ل

2(طريقة مباشرة: مستضد مجهول والـضد معلوم.

خطوات اختبار الزمرة :

الدم الشعري هو المستخدم

1(الطريقة المباشرة\ الكروية :

- مجهول و Ab معلوم)محضر تجاريا anti A, Anti B, Anti D) الـ Ag

➢ يتم إجراء الاختبار على سيراميك خاص أو سلايد

- نأخذ 3 نقاط من الدم الشعري ويوضع بكل حجرة قطرة دم
- نضع في الحجرة الأولى نقطة من Anti A وفي الحجرة الثانية نقطة من Anti Bوفي الحجرة الثالثة نقطة من Anti D.
- خلال ثوان: يظهر التراص أو عدمه بشكل واضح في نظام ABO

– إذا حدث تراص فقط مع anti A : فإن الزمرة هي A
_ إذا حدث تراص فقط مع Anti B : فإن الزمرة هي B

– إذا حدث تراص مع Anti A , Anti B : فإن الزمرة AB

– إذا لم يحدث أي تراص مع أي من Anti A , Anti B: فإن الزمرة هي O

- أما نظام الـ Rh فيجب أن ننتظر حوالي دقيقتين لنعرف النتيجة)+أو - (
- الطريقة المباشرة هي الطريقة الأكثر شيوعا .

2(الطريقة العكسية \الطريقة المصلية :

- خاصة بنظام الـ ABO حصرا، لأنه النظام الوحيد الذي لديه أضداد طبيعية نظامية أي لم تتشكل نتيجة نقل دم سابق أو حمل سابق مخالف بالزمر
- يكون الـضد مجهول والـمستضد معلوم.
- نأخذ كريات حمراء معروفة المستضدات محضرة تجاريا أو مخبريا.
- نأخذ دم وريدي و نثفله لنحصل على المصل، ونقوم بالاختبار على حجرتين فقط لأنه خاص بنظام ABO
- نضع نقطتين من المصل المجهول الذي نريد كشف وجود الضد فيه في كل حجرة، ونضع في الحجرة الأولى نقطة من) RBCs A(أي الكريات من الزمرة A وفي الحجرة الثانية كريات من) RBCs B(ونمزج ، ونراقب حدوث التراص .
- تحتاج هذا الطريقة بعض الوقت لأن عيار الأضداد فيها هو عيار طبيعي أي الموجود في الجسم، بينما المحاليل الطبية تكون مكثفة أي يكون عيار الأضداد فيها مرتفع لذلك يحدث التفاعل بسرعة أكبر.

– إذا حدث تراص فقط مع RBCs A : فإن الزمرة B)السيروم يحتوي Anti A (

- أما إذا حدث تراص فقط مع RBCs B: فإن الزمرة A)السيروم يحتوي Anti B)
- إذا لم يحدث أي تراص : فإن الزمرة هي AB
- إذا حدث تراص مع RBCs A و RBCs B : فإن الزمرة هي O)السيروم يحتوي على Anti A, Anti B)

زمن النزف Bleeding time :

- هو الوقت اللازم لوقف النزيف بعد احداث قطع صغير بواسطة مشرط
يجرى هذا الفحص لمعرفة كفاءة الصفائح الدموية plt من ناحية الكم والوظيفة.
- يحسب زمن النزف لتحديد الوقت اللازم لتوقف النزف من الشعيرات الدموية تحت الجلد بعد وخزة قياسية.
- يبين هذا الاختبار قدرة الصفائح الدموية على الالتصاق بالجدار المبطن للوعاء الدموي وتكوين تجمعات تساعد على إيقاف النزف.

طرق تحديد زمن النز ف

زمن النزف حسب طريقة ديوك dukes :

المبدأ: إحداث نزف صغير وتحديد زمن توقف هذا النزف.

العمل:

1(نحدث نزف بسيط في مكان لا يحوي وريد سطحي أو ندبة كالإصبع أو ساعد اليد أو شحمة الأذن بواسطة واخزة

2(يترك الدم ليجري بحرية دون الضغط عليه

3(يعين الزمن بساعة مؤقت

4(يمسح الدم النازف بلطف ودون لمس الجلد بين آن وآخر بواسطة ورق نشاف حتى يتوقف النزف

5(توقف ساعة المؤقت والزمن المسجل هو زمن النزف.

الزمن الطبيعي حسب طريقة ديوك:

- 2-5 دقائق
- يزداد هذا الوقت في بعض الأمراض الدموية مثل الفرفرية حيث يمكن أن يصل إلى الساعة وفي الابيضا ض الدم وفقرالد م

زمن النزف حسب خطة إيفي Ivy

1(يطبق ضغط قدره 40 ملم زئبقي على عضد المريض

2(يوخز بالواخزة في ثلاث مواضع مع الانتباه ألا يحوي مكان الوخز وريد سطحي أو ندب

3(يستقبل الدم النازف بورق نشاف مع عدم ملامسة الجلد حتى يقف النزف وهو الزمن المطلوب.

الزمن الطبيعي حسب طريقة إيفي:

- 4-10 دقائق
- يزداد في نقص الصفيحات واعتلال الصفيحات

اختبار هيس Hess

- يستخدم هذا الاختبار لقياس مدى مقاومة الأوعية الشعرية وتقدير الهشاشة الوعائية ويتعلق أيضا بعدد الصفيحات الدموية
- ولذلك فهو اختبار غير نوعي لقياس مدى مقاومة الأوعية الشعرية ولكنه يطبق لسهولة اجراءه
- كما أنه غير نوعي للصفيحات لأنه يمكن أن يكون هناك نقص في الصفيحات ومع ذلك الاختبارسلبي والعكس أ يضا .

طريقة العمل:

1(يقاس ضغط المريض:

✓ إذا كان ضغطه فوق 100 ملم زئبقي ،يطبق ضغط 80 لمدة 8 دقائق

- ✓ إذا كان ضغطه تحت 100 ملم زئبقي، يطبق الضغط الوسطي للضغطين الانقباضي والانبساطي وبنفس الزمن (مثلا الانقباضي 12 والانبساطي 8 يطبق الضغط 10 على العضد لمدة 8 دقائق)

2(يرفع جهاز الضغط بعد انقضاء الفترة الزمنية وننتظر فترة 2 -3 دقائق ومن ثم نعد النمشات المتشكلة في مساحة 5 سم و تبعد عن ثنية المرفق حوالي 4 سم، أما النمشات عند الثنية المرفقية فلا تعد

العدد الطبيعي: لا يزيد عن 5 نمشات.

ثانياً: طرق تحديد زمن التخثر Coagulation time:

طريقة لي- وايت Lee-White :

تعتبر هذه الطريقة أكثر الطرق المستخدمة دقة وتتم بالطريقة التالية:

1(يسحب مقدار 4 مل من دم المريض

2(يوزع الدم على أنبوبين مناسبين حيث يوضع في كل منهما 2 مل

3(يوضع الأنبوبان في محم مائي حرارته 37 درجة ونشغل ساعة المؤقت

4(بعد بضع دقائق يميل الأنبوب الأول من وقت لآخر ويراقب سيلان الدم على جدار الأنبوب لدى تمييله ويعاد إلى المحم، وهكذا حتى يجمد الدم ولا يسيل على أطراف الأنبوب لدى تمييله وهو زمن التخثر

5(يعين الزمن الذي تخثر فيه الأنبوب الأول

6(يطبق ما سبق على الأنبوب الثاني

7(يعتبر الزمن اللازم لتخثر الأنبوب الثاني هو زمن التخثر لأن الأنبوب الثاني لم يحرك كثيرا بالمقارنة مع الأول.

الزمن الطبيعي لتخثر الدم بطريقة لي-وايت:

5-12 دقيقة ويزداد في مرض الناعور\ يزداد عمليا في عوز العامل الثامن أو التاسع \

طريقة الأنابيب الشعرية:

تعتبر هذه الطريقة أقل دقة من الطريقة السابقة ولكنها أسهل وأسرع ويتم إجراءها كما يلي:

1(يسحب من وريد المريض كمية قليلة من الدم ويفرغ في أنبوب شعري لا يحوي مضاد تخثر، حيث يمر الدم بسهولة إلى داخل الأنبوب بالخاصة الشعرية، وبالإمكان إحداث نزف بسيط ومن ثم تؤخذ القطرات النازفة في أنبوب شعري لا يحوي مضاد تخثر.

2(يعين الزمن بساعة مؤقت

3(يوضع الأنبوب في راحة اليد ويميل ناحة اليمين واليسار وتلاحظ حركة الدم ضمنه لتعيين اللحظة التي لا يتحرك فيها الدم ضمن الأنبوب أثناء تمييله (تخثر الدم ضمن الأنبوب)

يتم التأكد من التخثر بكسر الأنبوب وملاحظة العلقة المتشكلة حيث يلاحظ خيط رفيع يصل بين طرفي الأنبوب المكسور "خيط من الفيبرين"

4(توقف الساعة ويسجل الزمن فيكون هو زمن التخثر.

الزمن الطبيعي لتخثر الدم بطريقة الأنابيب الشعرية: 2-6 دقائق

طريقة ميليان Milian

وهي طريقة أقل دقة من الطريقة الأولى ولكنها سهلة التطبيق، وتتم حسب الخطوات التالية

1(يحدث نزف في طرف الاصبع أو شحمة الأذن

2(نتلقى قطرة الدم النازفة على صفيحة زجاجية وعادة ما تؤخذ قطرتين كل منهما على زجاجة نظيفة

3(يعين الزمن بساعة الثواني

4(تميل إحدى الصفيحتين بين آن وآخر لرؤية تخثر الد م

5(يعين الزمن الذي لا تتغير في القطرة من شكلها أثناء التحريك وتتجمد وهو زمن التخثر بطريقة ميلا ن

الزمن الطبيعي للتخثر بهذه الطريقة: 10 دقائق.