دراسة مكونات الدم Blood analysis

طرق جمع عينة الدم Blood collection

تتم في الأبقار والأغنام والماعز باحد الاماكن الاتية:

أ- بالوخز فى الوريد الحافي بالأذن Marginal Vein.

ب- الأخذ من الوريد الوداجي Jugular vein لأخذ كميات كبيرة من الدم.

ت- الأخذ من الشريان الذيلي للحصول على عينة دم شريانية (حيث يتطلب ذلك فى بعض التحليلات).

الانابيب المستخدمة لجمع الدم نوعين:

1. انابيب تحتوي على مانع تخثر Blood collection tube with coagulation
2. انابيب لا تحتوي على مانع تخثر Blood collection tube without coagulation باستخدام انبوب غطائه احمر او انبوب زجاجي عادي او انبوب بلاستيكي عادي

أغطية أنابيب سحب الدم الملونة

تشير السدادات المطاطية المستعملة كغطاء في أنابيب جمع الدم إلى وجود أو غياب المواد المضافة إلى الأنبوب والتي عادة ما تكون مواد حافظة أو مواد مضادة للتخثر، فالمواد الحافظة تمنع التغيرات في العينة ومضادات التخثر تمنع تشكل الخثرة وتمنع التجلط وتستخدم أنابيب خاصة مفرغة من الهواء تسمى Vacutainer Tube. وتصنف هذه الأنابيب إلى الأنواع التالية :

1- **الأنبوبة ذات الغطاء الأحمر Red Tube:** وتكون خالية من المواد المضافة مثل مضادات التخثر ويوجد أنواع منها يضاف لها عنصر السيليكون أو الهلام Gel (تكون ذات لون أحمر أو أسود) لغرض التقليل من عملية التحلل الدموي ويجب عدم رج أو تقليب أو تحريك الدم بعد جمعه ، بل يترك لمدة 15 دقيقة حتى يتجلط كل الدم ثم تبدأ عملية الطرد المركزي لفصل كريات الدم عن السيرم أو البلازما.

2- **الأنبوبة ذات الغطاء البنفسجي Purple Tube:** وتكون المواد المضافة عبارة عن EDTA .

3- **الأنبوبة ذات الغطاء الأخضر Green Tube:** ويكون مضاف إليها إما الصوديوم أو الليثيوم هيبارين Li. Heparin.

4- **الأنبوبة ذات الغطاء الأزرق Blue Tube:** ويكون مضاف إليها سترات الصوديوم Sodium Citrate.

5- **الأنبوبة ذات الغطاء الأصفر : Yellow Tube :** ويوضع فيها مادة فاصلة للمصل مثل الهلام .

6- **الأنبوبة ذات الغطاء الرمادي Gray Tube :** وتستعمل لتعيين مستوى الكلوكوز وتحتوي على فلوريد البوتاسيوم الذي يمنع تغير تركيز الكلوكوز عن طريق إيقاف تحلل السكر في كريات الدم.

انواع موانع التخثر بالدم Coagulants

تستخدم مضادات التخثرفي حالة استعمال عينات من البلازما أو الدم الكلي حسب ما تقتضيه التجربة وعليه يجب إضافة مضاد للتخثر إلى أنبوبة جمع الدم حال سحبه مباشرة وعادة يغلف جدار أنبوبة جمع الدم بمضاد التخثر ، وتجدر الإشارة إلى أن اختيار مضاد التخثر يجب أن يقوم على اعتبار أن هذا المضاد لن يؤثر على التحليل الكيميائي وهذه النقطة مهمة جدا. لأن مضادات التخثر هي مركبات كيميائية لأملاح بعض المعادن مثل الصوديوم والبوتاسيوم والليثيوم، لذلك لا يمكن استخدام مضادات التخثر من أملاح الصوديوم والبوتاسيوم عندما يخص التحليل تعيين الإلكتروليتات كالصوديوم والبوتاسيوم لأن ذلك سوف يؤدي إلى خطأ إيجابي أكبر في نتائج التحليل ولكن في مثل هذه الحالة يمكن استخدام مضادات التخثر لليثيوم أو الأمونيوم.

أما في حالة تحليل الكالسيوم في الدم فلا يمكن استخدام أوكزالات الصوديوم لأن هذا الملح سوف يزيل كل ما تحتويه العينة من الكالسيوم بترسيبه على شكل أكزالات الكالسيوم .

وهذه بعض أنواع المواد المضادة لتخثر للدم:

1- الهيبارين Heparin

هو مادة مضادة للتخثر وهو من مكونات الدم الأساسية ولكنه يوجد بتركيز لا يكفي لمنع تخثر الدم ، ويتولد الهيبارين من خلايا الكبد فهو موجود بتركيزعالي في الكبد كما أنه موجود أيضا في الخلايا الرئوية. ويتميز عن غيره بكونه لا يتداخل معه أي اختبار من اختبارات التحليل الكيميائي، ويمكن الحصول عليه تجاريا في الوقت الحاضر من أملاح الصوديوم Sodium Heparin أو ملح البوتاسيوم Potassium Heparin أو ملح الليثيوم Lithium Heparin .

2- اوكزالات البوتاسيوم Potassium Oxalates

يعمل هذا المضاد على ترسيب أيونات الكالسيوم وبذلك يمنع تجلط الدم ويفضل استعماله لسهولة ذوبانه ، ونحتاج عادة إلى 20 – 10 ملغم من إكزالات البوتاسيوم لمنع تجلط 10مل من الدم.

3- فلوريد الصوديوم Sodium Fluoride

4- إيثلين ثنائي الأمين رباعي حامض الخليك Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid (EDTA)

يفضل استخدام هذا المضاد في اختبارات علم الدم Hematology بصورة خاصة حيث يعمل على المحافظة على المكونات الخلوية من التلف ويستخدم عادة بشكل ملح ثنائي الصوديوم أو ثنائي البوتاسيوم،

وتعزى فعالية هذا االملح كمضاد للتخثر إلى قابليته للارتباط مع كالسيوم الدم وعزله كليا عن القيام بدوره في عملية التخثر.

ومن الفحوصات المهمة للدم سنأخذ تباعاً :

❖ **العد الكلي للدم Complete Blood Count (CBC)**

ويشمل :

1- العدد الكلي لكريات الدم الحمراء(RBC).

2- العدد الكلي لكريات الدم البيضاء (WBC).

3- العدد النوعي لكريات الدم البيضاء (WBC).

أهمية إجراء تحليل العد الكلي للدم (CBC)

يتم العد الكلي للدم من اجل مقارنة النتائج التي تم الحصول عليها مع المعدلات الطبيعية ومن ثم يتبين لنا نوع المرض لدى الشخص. ومن أهم الأمراض التي يتم تشخيصها عن طريق عمل هذا التحليل الأمراض التالية:

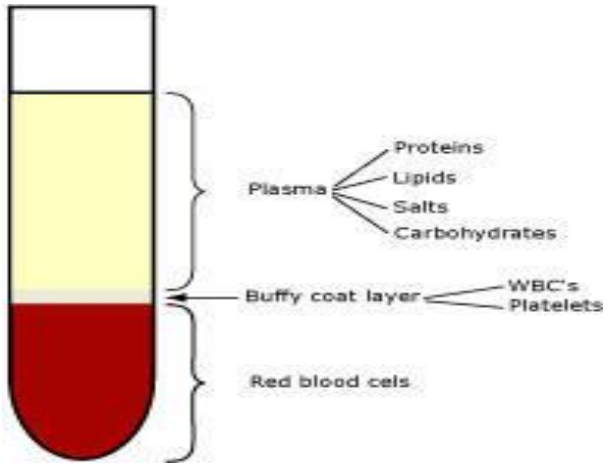
1- الكشف عن أنواع مرض فقر الدم (Anemia).

2- الكشف عن سرطان الدم (Leukemia).

3- الكشف عن الأمراض النزيفية (Bleeding Disease).

4- الكشف عن الالتهابات (Inflammation) مثل التهاب الزائدة الدودية، إذ تكون نسبة الخلايا المتعادلة (Neutrophils)مرتفعة مع زيادة في العدد الكلي لخلايا الدم البيضاء(WBC).

5-الكشف عن أي خلل في وظيفة النخاع العظمي (Bone Marrow) إذ تحدث تغيرات في أعداد خلايا الدم النوعي والكمي.



اولاً : العدد الكلي لكريات الدم الحمراء Red Blood Cell or Erythrocyte Counts

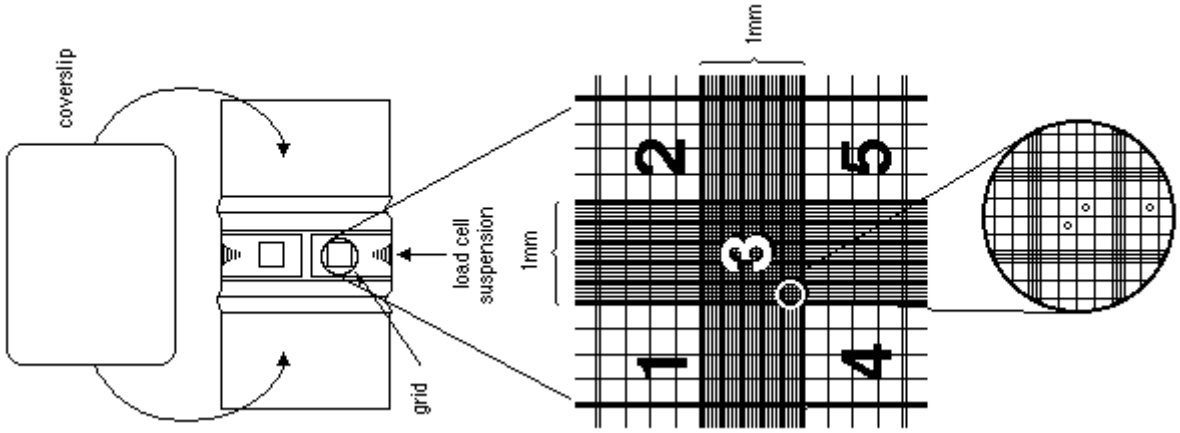
الهدف منه :

تعيين عدد كريات الدم الحمراء في عينة دم باستخدام الهيموسيتوميتر Hemocytometer.

الاجهزة والمواد المستخدمة :

1- مجهر

2- شريحة العد *Hemocytometer*



وصف الهيموسيتومتر Hemocytometer

عبارة عن شريحة زجاجية سميكة يوجد على مسرحها الوسطي 25 مربع. كل مربع منها مقسم 16 مربع أصغر.

طول المربع الصغير يساوي 1 / 20 ملم وعرضه كذلك . وهو محفور بعمق 1 / 10 ملم .

لذا يكون حجمه = (1 /20)× (1 / 20)× (1 / 10) = 1 / 4000 ملم^3.

3- *غطاء الشريحة Slide cover*

4- *ماصة شعرية خاصة بكريات الدم الحمراء* **Diluting pipet**

الماصة مدرجة بعلامتين سفلية 0.5 وعلوية 101 ويمثل الرقمان حجم الفراغ داخل الماصة بالمليمترات المكعبة وقبل العلامة العلوية يوجد انتفاخ في الماصة به خرزة ذات لون احمر تستخدم لتقليب المحلول.

5- محلول التخفيف وهو على نوعين :

أ- محلول هانس : Hayems solution ويتكون من :

المادة	مذابة في 100 مل ماء مقطر
$HgCl_2$	25.0 غم
NaCl	0,5 غم
Na_2SO_4	2,5 غم

ب- المحلول الاخر يتكون من :

المادة	الكمية
Sodium Citrate	31,3 غم
Formalin 40 volume	10 مل
Distilled water (D.W.)	1000 مل

خطوات إجراء التجربة:

1- اسحب بواسطة الماصة دم غير متجلط حتى علامة 0.5 ثم أكمل باحد المحلولين السابقين حتى علامة 101. ثم أغلق نهايتي الماصة بواسطة الإبهام والسبابة ورج الماصة لمزج الدم بالمحلول المخفف

.

2- تخلص من بضع قطرات من الدم المخفف عبر الفتحة السفلية للماصة بعد ذلك ضع قطرة من الدم المخفف عند حافة الغطاء الزجاجي الموضوع على الشريحة. لاحظ أن قطرة الدم ستنتشر بالخاصية الشعرية ما بين الغطاء الزجاجي والشريحة. اترك الشريحة لمدة دقيقة لكي تترسب خلايا الدم الحمراء ثم ضعها تحت المجهر لكي تفحص.

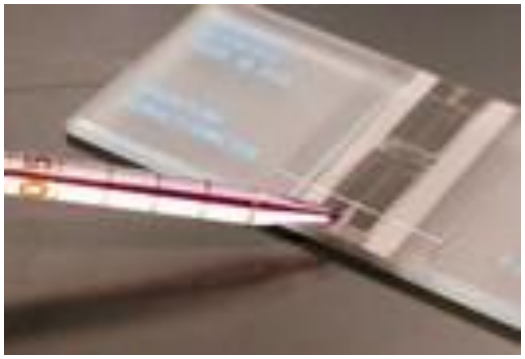
3- بدء الفحص بالقوة الصغرى لمعرفة توزيع خلايا الدم الحمراء لأنة ينبغي أن يكون التوزيع متجانسا وبلا تجمع ، فان وجد تجمع نظف الشريحة وضع قطرة جديدة. وإذا تكرر وجود التجمع فهذا يعني أن الدم لم يسحب بالطريقة الصحيحة ولم يخفف كما ينبغي . وفي هذه الحالة يجب إعادة التخفيف.

4- ولعد خلايا الدم الحمراء استخدم العدسة الكبرى . ويتم العدد في خمسة مربعات كبيرة تقع على أحد قطري المربع. لاحظ أن كل مربع كبير يحتوي على 16 مربع صغير ، أي يجري العد في 80 مربع صغير (انظر الأشكال الاتية) .

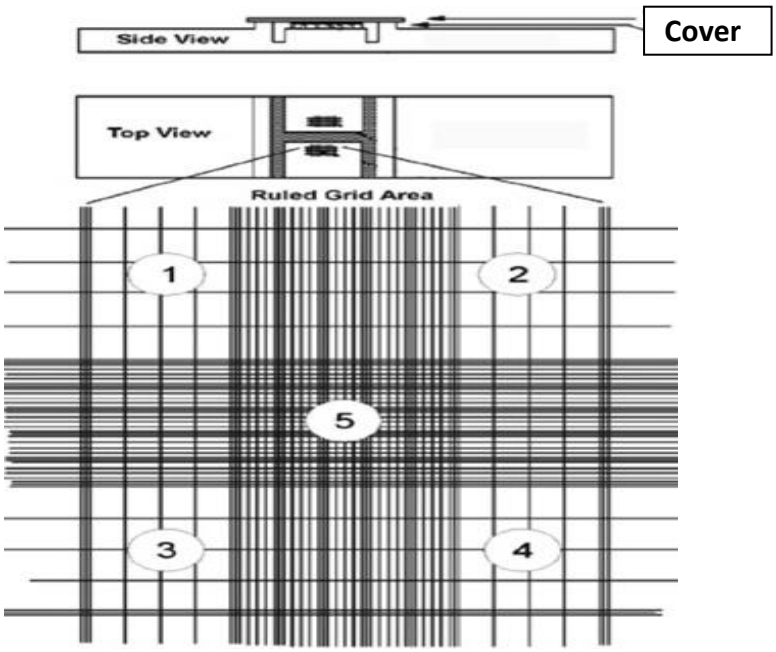
ملاحظة :يجب مراعاة أن لا تزيد الفروق بين أعداد خلايا الدم الحمراء في المربعات الخمسة الكبيرة عن 10%زيادة أو نقصانا وإلا كان توزيع الخلايا غير متجانس.

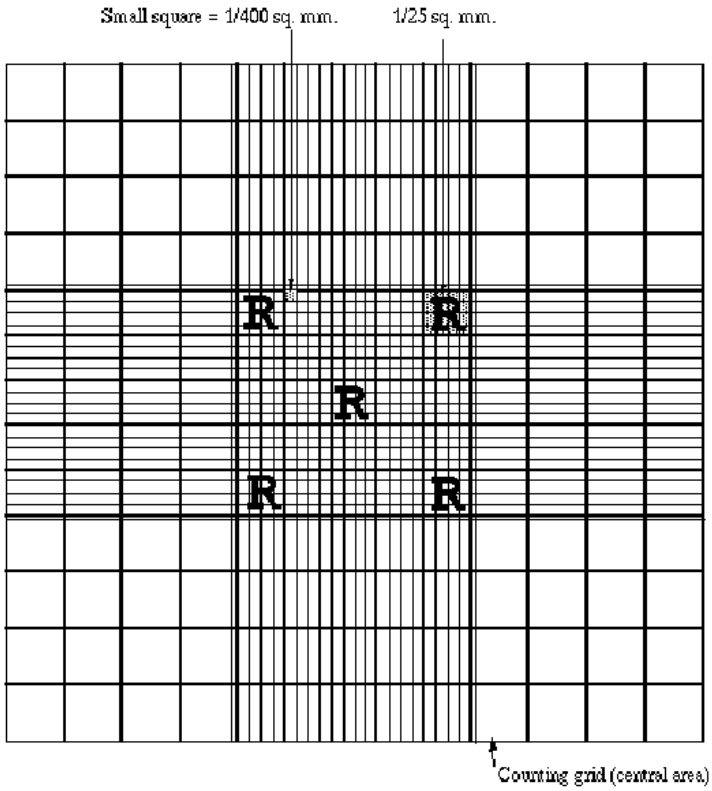
أغلق طرف الماصة بإصبعك وهزها جيدا من اجل خلط المحلول.
Seal the tip with your finger and shake well to mix.

أفرغ حوالي نصف الماصة إلى اناء المحلول الزائد .
Empty ~1/2 of pipet into waste container.



اضف كمية صغيرة من الدم المخفف إلى واحده من غرف الهيموسيتوميتر حتى تمتلئ.
Add a small amount of the diluted blood to one chamber of the Hemocytometer to just fill the chamber





ركز المربع الأوسط من شريحة العد تحت المجهر ثم عد كريات الدم الحمراء في المربعات الصغيرة الخمسة الموضحة في الشكل بـ (R) (كل مربع صغير يتكون من 16 مربع أصغر).

Center the grid at and count and record the RBCs in each of five fields (R) (each with 16 smallest squares).

طريقة الحساب :

عدد خلايا الدم الحمراء في 80 مربع صغير = X

حجم المربع الصغير= (1 /20) ×(1 / 20) ×(1 / 10) = 1 / 4000 ملم^3.

التخفيف = 1 : 200

عدد خلايا الدم الحمراء/ ملم^3 دم = $\frac{X}{80}$ × 4000× 200 خلية دم حمراء / ملم^3 من الدم.

مثال :

إذا كان مجموع عدد الخلايا المعدودة في المربعات الخمسة مساويا لـ 450 كرية حمراء (والتي تم عدها في 80 مربع صغير [5 × 16]حجم كل واحد منها 4000/1 ملم3) ودرجة تخفيف الدم كانت (1: 200). فان عدد كريات الدم الحمراء في المليمتر المكعب الواحد من الدم غير المخفف تحسب بالمعادلة الأتية:

عدد خلايا الدم الحمراء/ ملم^3 دم = 450 / 80 × 4000 × 200

= 4.5 × 10^6 خلية دم حمراء / ملم^3 من الدم.

أسباب الزيادة في عدد كريات الدم الحمراء :

نقص الأوكسجين – أمراض القلب وامراض تليف الرئتين ووجود بعض أنواع الهيموكلوبين غير الطبيعي.

أخطاء تؤدي إلى زيادة العدد:

1. حجم الدم اكثر من 20 ميكرولتر أو حجم المحلول اقل من الحجم المطلوب.
2. عدم مزج العينة جيدا مع محلول التخفيف.
3. توزيع كريات الدم الحمراء في شريحة العد (هيموسيتوميتر) غير متوازن.
4. مل خاطئ لشريحة العد.
5. عد جميع كريات الدم الحمراء الملامسة للخطوط الجانبية.

أسباب نقص كريات الدم الحمراء :

أمراض الدم مثل اللوكيميا وفشل النخاع العظمي .... الخ

أخطاء تؤدي إلى نقص العدد:

1. حجم الدم اقل من 20 ميكرولتر أو حجم المحلول اكثر من الحجم المطلوب.
2. تأجيل العد لمدة طويلة.

3. وجود جلطة صغيرة في العينة.

4. وجود فراغات هوائية أو شوائب.

5. استعمال شريحة غير نظيفة.

ثانيا :العدد الكلي لخلايا الدم البيضاءWhite Blood Cell or Leucocyte Counts

الهدف من التجربة:

تعيين عدد كريات الدم البيضاء في عينة دم باستخدام (الهيموسيتوميتر).

الأدوات المستخدمة في التجربة:

1- ماصة تخفيف Diluting pipetخاصة تحوي خرزة ذات لون أبيض.

2- الهيموسيتومترHemocytometer

3- محلول تخفيف خلايا الدم البيضاء ويتكون من:

أ- 2.5 مل حمض خليك ثلجي Glacial acetic acid(لتكسير الكريات الحمراء)

ب- 3-2 قطرة مثيل ازرقMethylene blue (لصباغة الخلايا البيضاء).

ج- 97.5 مل ماء مقطر

4- أغطية شرائح زجاجية

5- مجهر ضوئي

مبدأ التجربة:

تعتمد التجربة على تخفيف الدم بالمحلول الخاص بتخفيف كريات الدم البيضاء الذي يحلل كريات الدم الحمراء تاركاً كريات الدم البيضاء سالمة. وتعد كريات الدم البيضاء باستخدام (الهيموسيتوميتر) تحت المجهر .

ولكن هنا تستخدم ماصة تختلف مقاييسها عن تلك التي استخدمت لعد خلايا الدم الحمراء. إذ أن تدريجها عبارة عن علامتين، سفلية 0.5 وعلوية 11 وقبيل العلامة العلوية يوجد انتفاخ في الماصة في خرزة ذات لون ابيض تستخدم لمزج الدم بالمحلول المخفف.

خطوات إجراء التجربة:

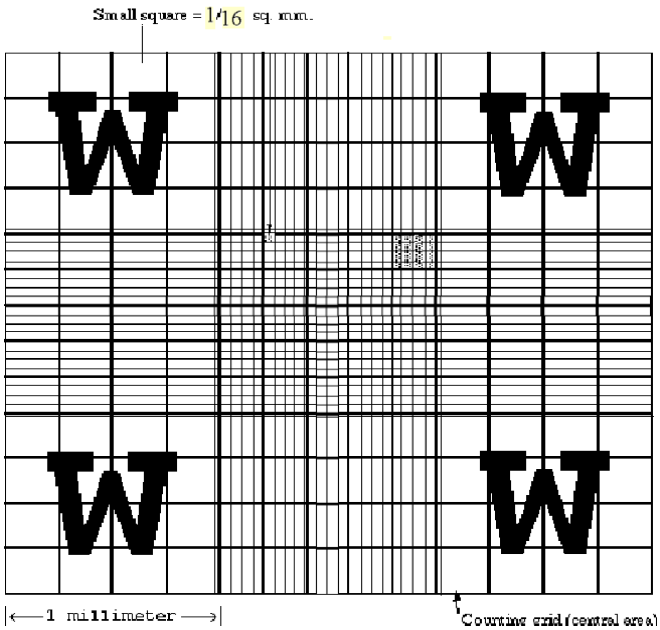
1- حضر محلول تخفيف خلايا الدم البيضاء.

2- اسحب بواسطة الماصة دم غير متجلط حتى علامة0.5ثم اكمل بمحلول التخفيف حتى علامة 11 ثم افرك الماصة عند الانتفاخ بين راحتي اليدين لمزج الدم بمحلول التخفيف.

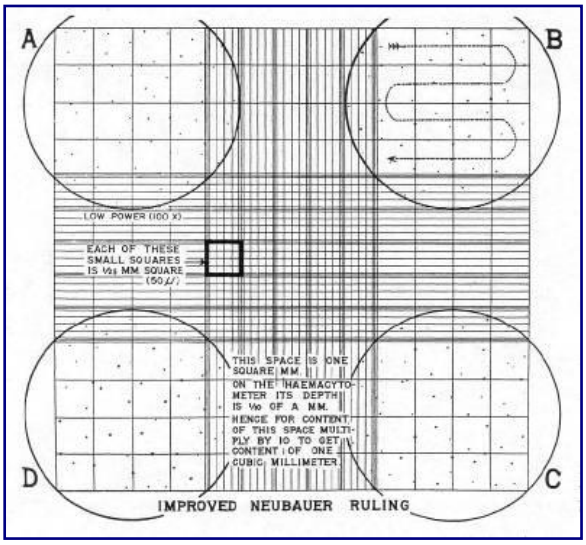
3- تخلص من بضع قطرات من الدم المخفف عبر الفتحة السفلية للماصة بعد ذلك ضع قطرة من الدم المخفف عند حافة الغطاء الزجاجي الموضوع على الشريحة. لاحظ أن قطرة الدم ستنتشر بالخاصية الشعرية ما بين الغطاء الزجاجي والشريحة. اترك الشريحة لمدة دقيقة لكي تترسب خلايا الدم البيضاء ثم ضعها تحت المجهر لكي تفحص.

4- إبداء الفحص بالقوة الصغرى لمعرفة توزيع خلايا الدم البيضاء لأنه ينبغي أن يكون التوزيع متجانسا وبلا تجمع، فان وجد تجمع نظف الشريحة وضع قطرة جديدة. وإذا تكرر وجود التجمع فهذا يعني أن الدم لم يسحب بالطريقة الصحيحة ولم يخفف كما ينبغي . وفي هذه الحالة يجب إعادة التخفيف.

6- ولعد خلايا الدم البيضاء استخدم العدسة الصغرى فقط. ويتم العد في أربعة مربعات كبيرة تقع في اركان المربع الكبير. لاحظ أن كل مربع كبير يحتوي على 16 مربع صغير، أي يتم العد في 64 مربع صغير (انظر الشكل التالي).



يتم عد كريات الدم البيضاء تحت المجهر في الأربعة مربعات الموضحة في الشكل بـ (W)
(كل مربع يتكون من 16 مربع صغير).
Record the WBCs in each of four fields (W) (each with 16 small



في كل من المناطق الأربع (A-B-C-D)، احسب كل الخلايا البيضاء التي تقع ضمن المربع وأولئك الذين يمسون الخطوط المركزية العليا واليمنى. أما الخلايا البيضاء التي تمس الحدود اليسرى والسفلى فلا يتم حسابها. ويجري العد "بخط على شكل أفعى" كما أشير إليه في المربع (B) في الشكل السابق.

الحسابات:

التخفيف = 1 : 20

حجم المربع الصغير = (1 / 4) ×(1 / 4)× (1 / 10) = 1 /160مم^3

افترض إن عدد خلايا الدم البيضاء في 64 مربع صغير (4 × 16) = س

فان عدد كريات الدم البيضاء في المليمتر المكعب الواحد من الدم غير المخفف تحسب بالمعادلة الأتية:

س

عدد خلايا الدم البيضاء/ ملم^3 دم= ------- × 160 × 20 خلية دم بيضاء / ملم^3 من الدم.

64

الأخطاء التي تؤدي إلى زيادة أو نقص عدد كريات الدم البيضاء :

نفس الأسباب التي تم ذكرها عند عد كريات الدم الحمراء . لتلافي هذه الأخطاء يمكن عد عينه أخرى أو عدد أكبر من الكريات البيضاء.

أسباب الزيادة في عدد كريات الدم البيضاء:

1- زيادة فسيولوجية أثناء الحمل والولادة ، عقب مجهود عضلي وفي الأطفـال حديثي الولادة (18000 – 25000/مم^3).

2- زيادة مرضية – العدوى بالميكروبات العنقودية والسبحية مثل التهاب اللوزتين والزائدة الدودية والتهاب حوض الكلى – التدرن.

3- أمراض الحساسية والجلدية والطفيليات.

4- العدوى بالفيروسات.

5- الأورام الخبيثة وسرطان الدم.

أسباب النقص في عدد كريات الدم البيضاء:

1- العدوى ببعض الفيروسات.

2- فشل النخاع العظمي.

3- التيفود والباراتيفود.

ثالثا: العد النوعي (التفريقي) لخلايا الدم البيضاء Differential Leucocyte Counts

الهدف من التجربة:

في هذه الطريقة يتم تقدير النسبة المئوية لأنواع خلايا الدم البيضاء (WBC) المختلفة و التفريق بينها ، وهي باختصار كما مر في محاضرة سابقة :

1- خلايا محببة يكون السيتوبلازم فيها محبب وتنقسم إلى ثلاثة أنواع:

أ- خلايا متعادلة (Neutrophils)

ب- خلايا حامضية (Eosinophils)

جـ- خلايا قاعدية (Basophils)

2- خلايا غير محببة تنقسم إلى قسمين:

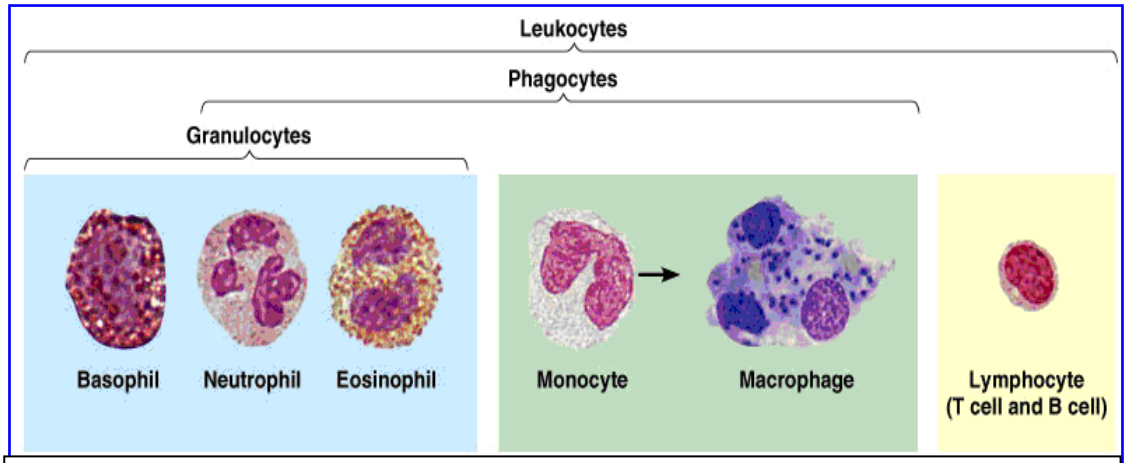
أ- خلايا لمفاوية (Lymphocytes)

ب- خلايا وحيدة النواة (Monocytes)

وتعد لذلك مسحات من الدم (Blood film) على شرائح زجاجية نظيفة تصبغ بصبغة خاصة تظهر خلايا الدم البيضاء بوضوح، والصبغة هي صبغة جيمسا Giemsa's Stain.

الأدوات المستخدمة في التجربة:

1- عينة دم Blood Sample
2- شرائح زجاجية نظيفة Clean Slides
3- صبغة جيمسا Giemsa's stain
4- محلول منظم Buffer
5- ماء مقطر Distilled Water
6- ماصة Pipette
7- مجهر Microscope
8- كحول الميثانول Methyl alcohol
9- وعاء صبغ الشرائح



كريات الدم البيضاء Leukocytes كما تظهر تحت المجهر الضوئي.