إعداد المهندس/ مجاهد العنتري
mualshz@yahoo.com
en.mualshz@gmail.com

عدادات خلايا الدم

BLOOD CELL COUNTERS(BCC)

يحتوي الدم بجسم الإنسان على عدد كبير من الخلايا موجودة بسائل يسمى البلازما(الدم بدون كريات) وتشكل هذه الخلايا نسبة 45% من حجم الدم بينما تشكل البلازما نسبة 55% , وهناك عدة أنواع من هذه الخلايا منها:

- كريات الدم الحمراء Red Blood Cells (RBC) أو ما تسمى بالـ Erythrocytes.
- كريات الدم البيضاء White Blood Cells (WBC) أو ما تسمى بالـ Leucocutes.
- الصفيحات الدموية Platelets أو تسمى Thrombocytes.

حيث قسمت خلايا الدم إلى هذه المجموعات تبعاً لعملها وشكلها.

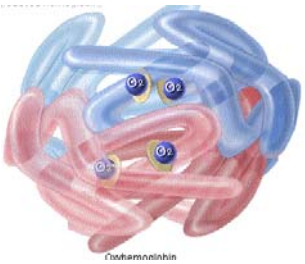
إن تحديد حجم وعدد خلايا الدم في واحدة الحجم يعطي معلومات قيمة من أجل التشخيص الدقيق , حيث يشكل الدم حوالي 5 – 6 Liter من ثقل الجسم الكلي , وعند الإنسان البالغ يبلغ حجم الدم 5 – 10 % . تتحدد لزوجة الم من خلال مادة Hematocrit التي تمثل نسبة خلايا الدم الحمراء (RBC) إلى حجم الدم الكلي حيث أنة بزيادة لزوجة الدم فإنه يؤدي إلى زيادة ضغط الدم الشرياني ونقصان اللزوجة تؤدي إلى انخفاض ضغط الدم الشرياني لأنة:

كلما كانت لزوجة الدم منخفضة ⟸ مقاومة محيطية للشرايين أقل ⟸ زيادة تدفق الدم ⟸ نقصان ضغط الدم , والعكس بالعكس .

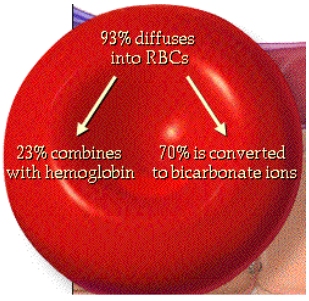
يحسب متوسط حجم الخلية Mean Cell Volume (MCV) من خلال معرفة الحجم الخلوي المخزون Packed Cell Volume (PCV) , ومعرفة عدد RBC ويعطى متوسط حجم الخلايا من العلاقة التالية:

$$MCV = \frac{\text{الحجم الخلوي المخزون}}{\text{عدد كريات الدم الحمراء}} = \frac{PCV}{RBC}$$

على سبيل المثال إذا كان PCV= 0.45 هذا يعني أن اللتر من الدم يحتوي على 0.45 ليتر من RBC . حيث أن المتوسط الطبيعي لحجم الخلية الحمراء هو 86 ± 10 Femoliter حيث $f/\text{liter} = 10^{-15}$. في الحالات المرضية تنخفض هذه القيمة إلى $50\ f/l$ أو تزداد إلى $150\ f/l$. بما أنة يتم نقل كريات الدم الحمراء عبر الأوعية الدموية بحيث تحوي كل كريه دم حمراء على 250 مليون جزيئه من الـ Hemoglobin حيث تقوم كل جزيئه Hemoglobin واحدة بنقل أربع جزيئات من الـ Oxegen

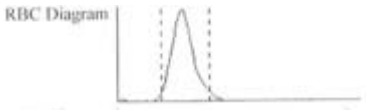


جزيئه Hemoglobin



خلية RCB

- ويمكننا حساب متوسط خضاب الدم للخلية Mean Cell Hemoglobin(**MCH**) من خلال معرفة Hemoglobin(Hb) ومعرفة عدد RCB بواسطة العلاقة التالية:



مخطط كريات الدم الحمراء

$$\mathrm{MC}H = \frac{\text{عدد الجرامات من } Hb \text{ في ليتر من الدم}}{\text{عدد كريات الدم الحمراء}} = \frac{\mathrm{Hb/g}}{\mathrm{RBC}}$$

- أما متوسط تركيز خضاب الدم للخلية Mean Cell Hemoglobin Concentration(**MCHC**) فيحسب من العلاقة التالية :

$$\mathrm{MC}HC = \frac{\text{عدد الجرامات من } Hb \text{ في ليتر من الدم}}{\text{الحجم الخلوي المخزون}} = \frac{\mathrm{Hb/g}}{\mathrm{PCV}}$$

- متوسط حجم الصفائح Mean platelet Volume (**MPV**) :

متوسط حجم الصفائح هو نسبة حجم الصفائح المدموجة إلى عدد الصفائح الكلي ويعبر عنه بالـ femoliter , وهي طبيعيا تتراوح من $6\mu\ m^3$ إلى $10\mu\ m^3$.

- Plateletcrit (**PCT**) :

هي النسبة المئوية لحجم العينة الكلي المشغولة بالصفائح .باستخدام معلومات عن عدد الصفائح PLT ومتوسط حجم الصفائح MPV يمكن التعبير عن الـ PCT .

مخطط عدد الصفائحPLT

$$\mathrm{PCT}\ \% = \frac{\mathrm{MPV} * \mathrm{PLT} * 10^9/l}{10}$$

- عرض توزع الصفائح Platelet Distribution Width(**PDW**) :

يتعلق دليل هذا العرض بمجال الحجم المغطى بواسطة تلك الصفائح الواقعة بين 1/84% to 1/60 وهذا الرقم يعبر عن الانحراف القياسي الهندسي التقليدي لمتوسط حجم الصفائح .

- عرض توزع خلايا الدم Red Cell Distribution Width (**RDW**): هو تعبير عددي عن عرض التورع الحجمي للخلايا الحمراء , يمسح العدد الكلي للخلايا الحمراء بواسطة دارة ذات عتبة متغيره بشكل مستمر .العتبة العليا تتحرك بشكل متزايد نحو الأسفل من مستوى مساوي $360\ f/l$ حتى 20 % بالنسبة لكل الخلايا الحمراء التي لها حجم يتجاوز قيمة معينة , ويتم تسجيل ذلك كقيمة من 20% حيث أن العتبة السفلى تتحرك نحو الأسفل حتى تصل إلى المستوى الذي يكون فيه 80% من الخلايا الحمراء قد تم تجاوزها .وتتعين كنسبة مئوية من 80%ويمكن أن نعبر عن RDW بالعلاقة التالية:

$$\mathrm{RDW} = \frac{(20\mathrm{th}-80\mathrm{th})\mathrm{PrecentileVolume}}{(20\mathrm{th}+80\mathrm{th})\mathrm{PrecentileVolume}} \times 100 \times K$$

حيث K : عامل التعيير لإعطاء نتيجة مساوية إلى 20 - 10 في الأشخاص الطبيعيين.

طرق عد الخلايا

Method of Cells Counting (MCC)

هناك عدة طرق لقياس أو عد الخلايا في الدم ومنها:

- الطريقة الميكروسكوبية Microscopic Method.
- الطريقة الضوئية الآلية Automatic Optical Method.
- طريقة الناقليه الكهربائية Electrical Conductivity Method.

وسوف نقوم بشرح الطريقة الأولى والثانية فقط.

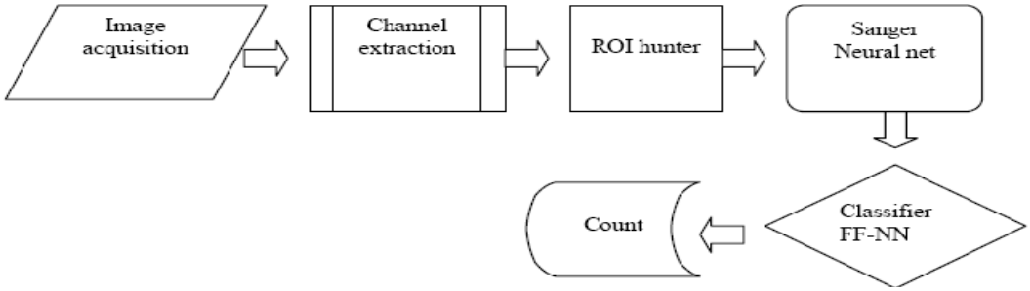
أولاً: الطريقة الميكروسكوبية Microscopic Method :

وتسمى هذه الطريق أيضا بالطريقة اليدوية وهي الطريقة الأكثر شيوعاً , وفيها يتم فصل الخلايا المراد عدها أو قياسها من باقي مكونات الدم بجهاز يسمى جهاز الفصل المركزي Centrihuge أو الطرد المركزي ومن ثم تلويه هذه الخلايا وعدها عن طريق المجهر Microscop. تستخدم هذه الطريقة في المخابر الصغيرة هناك مساوئ عديدة لاستخدام هذه الطريقة في معرفة عدد الخلايا ومنها:

Microscope

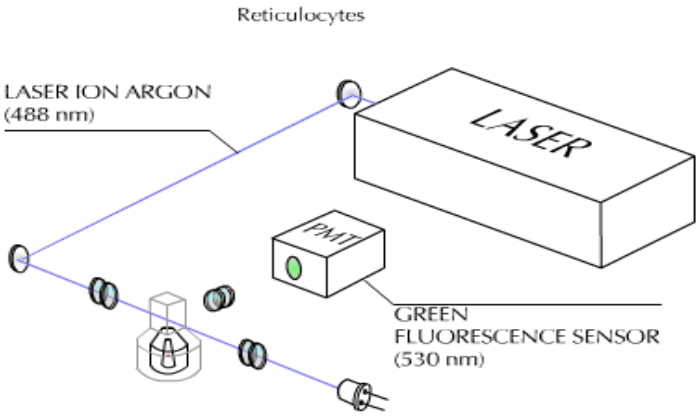
- العمل لمدة طويلة مما يؤدي إلى تعب الشخص الذي يقوم بعملية القياس .
- الإستخدام المجهد.
- انخفاض مستوى الإنتاج.
- المعلومات الناتجة عن هذه العملية ليست مناسبة بشكل مباشر للتخزين والمعالجة الإضافية والتقييم.

وهذه الطريقة أصبحت طريقة قديمة وغير مستعملة بشكل كبير مقارنتها مع باقي الأجهزة الحديثة التي تقوم بتحليل كامل لكل خلايا الجسم والبلازما والصفائح بنفس الوقت مع إعطاء مخططات عملية لتبين حالة كل مكونات الدم (RBC-WBC-PLT-PDW-MPV-PCT-HCT-MCV-MCH-MCHC-RDW-….)

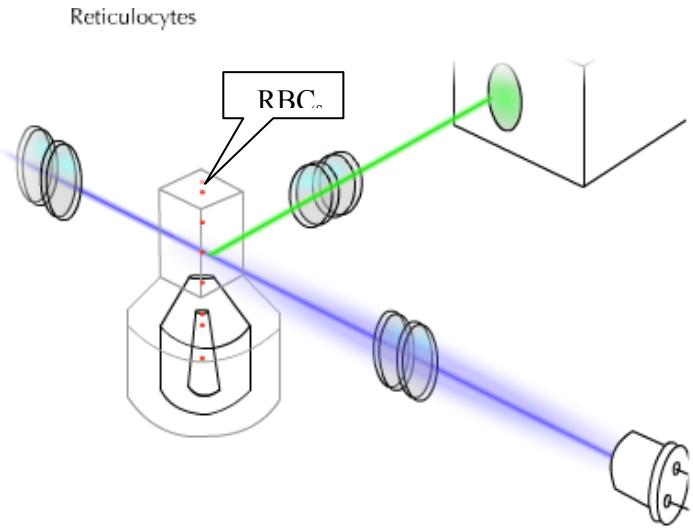


ثانياً: الطريقة الضوئية الآلية Automatic Optical Method:

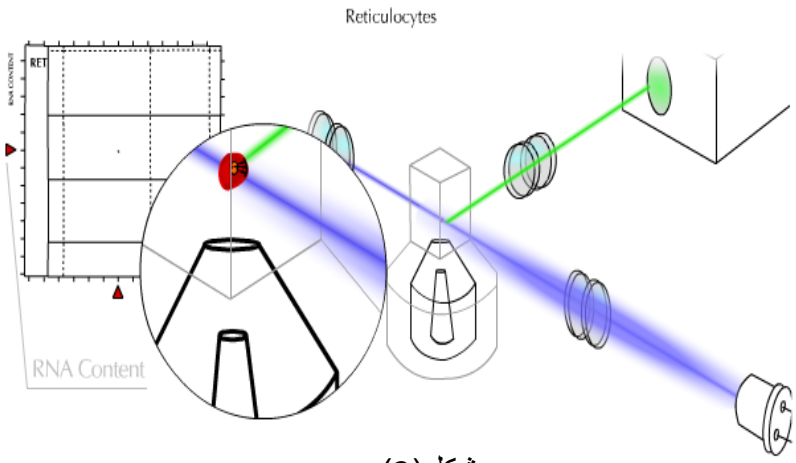
تمثل هذه الطريق طريقة عد الخلايا الدموية ضوئياً(باستخدام الليزر)



شكل(1)



شكل(2)



شكل(3)

ومن الأجهزة التي تستخدم هذه التقنية هي أجهزة الـ PENTRA60 التي تنتجها أو تصنعها شركة فرنسيه تسمى HORIBA التي تأسست منذ 1983م وقد أنتجت أنواع مختلفة ومتنوعة من هذه الأجهزة ومن أهم الأجهزة التس سنقوم بدراستها هي :

- PENTRA60 كما هو مبين بالشكل (4) .
- PENTRA60 C+ , كما هو مبين بالشكل(5).

وهي كما تظهر بالشكل التالي:

الجهاز المستخدم في المستشفى الجامعي. شكل (6)

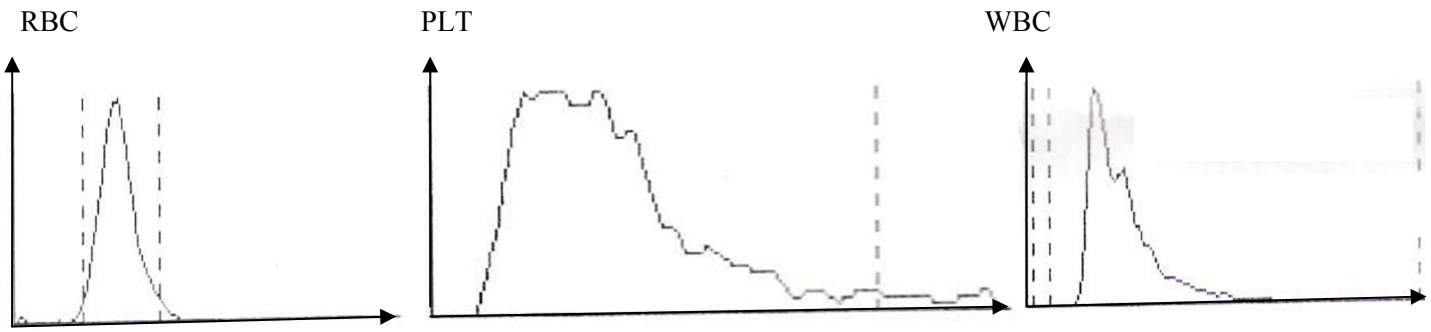
PENTRA60 شكل(4)

PENTRA60 C+ شكل(5)

وهناك العديد من هذه الاجهزة يمكن أن نشاهده على الموقع الإلكتروني http://www.abx.horiba.com

<u>مبدأ عمل هذه الأجهزة: الشكل(10)</u>

يتم تسليط ضوء من منبع ضوئي(بصري) مثل منبع الليزر كما هو واضح بالشكل (1) حيث يتم تنظيم هذا الشعاع الضوئي بشكل مناسب بحيث يتم تسليطه على الخلايا الدموية التي تعبر من خلال الفتحة للجهاز كما بالشكل(6) حيث تقوم هذه الأجهزة بالتقاط الضوء المبعثر من خلايا الدم كما في الشكل (2) ومن ثم تحويل هذا الضوء إلى نبضات كهربائية لتسهيل معالجتها وللحصول على النتائج المطلوبة,حيث يتم جمع الضوء المبعثر في الاتجاه الأمامي على أنبوب ذو مهبط مضاعف ضوئي photomultiplier حيث يمكن إنتاج نبضات في أنبوب المضاعف الضوئي تبعاً لكل خليه ومن ثم تضخم هذه الإشارة في مضخم ذو ممانعة دخل عالية ومن ثم تغذى إلى معدل أو مميز مطالي AM قابل للتعيير حتى يتم تعديل الإشارة والتخلص من التشويش والضجيج والحصول على إشارة نقية حيث يعطي هذا المعدل نبضات ذات مطالات متساوية تستخدم لقيادة المظهر الرقمي هي في النهاية تمثل مخطط بياني لـ(RBC-WBC-PLT) كما بالشكل(8) التالي:



a-RBC مخطط كريات الدم الحمراء

b- PLT مخطط الصفائح

c- WBC مخطط كريات الدم البيضاء

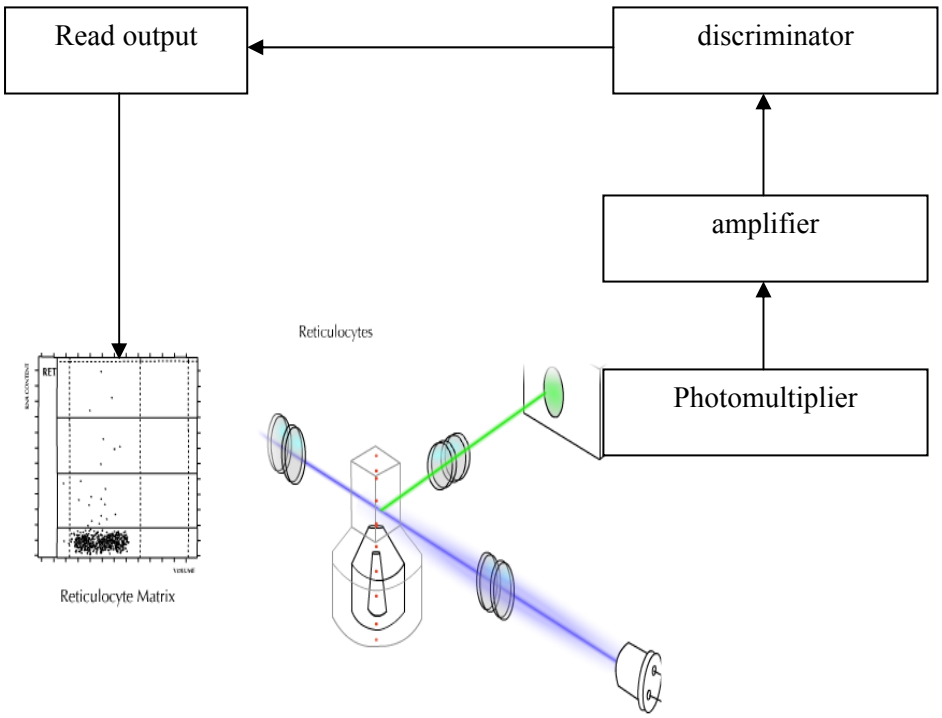
الشكل (7)

كما أن هذه الأجهزة تعطي قيم رقمية دقيقة جداً لمكونات الدم مثل:

العينة	القياس الحالي	المجال الطبيعي للعينة
HGB	14.21 g/dl	11-18.8
HCT	42.28%	35-55
WBC	8.27 10^3/mm^3	4 TO 11
RBC	4.54 10^6/mm^3	4- 6.2
MCV	93.05 um^3	80 - 100
MCH	31.27 pg	26 - 34
MCHC	33.6 g/dl	31 - 35
RDW	11.01%	10 to 20
PDW	13.25%	———
PLT	194 10^3/mm^3	150 - 400
MPV	8.32 um^3	6 to 10
PCT	0.16%	———

الشكل(8)

حيث تتضمن هذه الطريقة ثلاث خطوات كما هو مبين بالأشكال السابقة وهي:

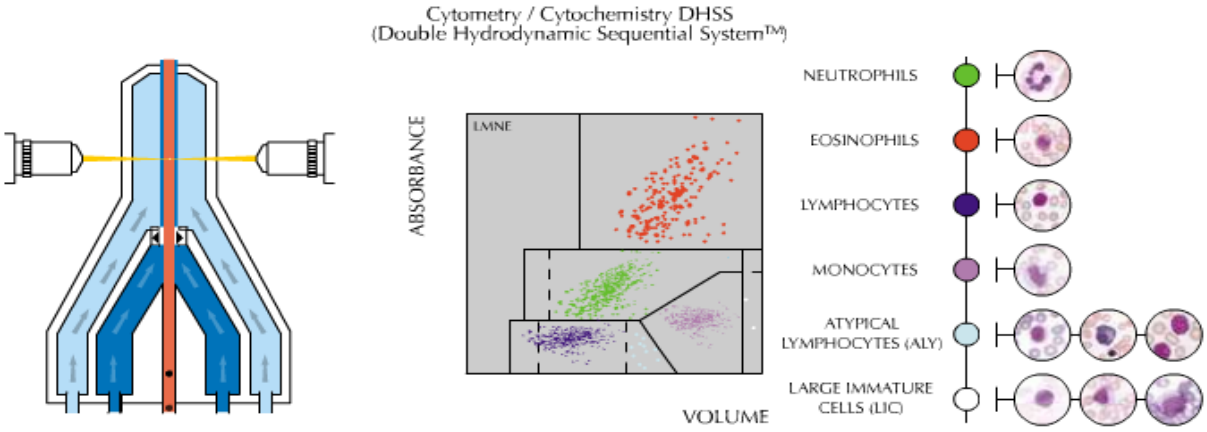


المخطط العام للـ PENTRA60 بنوعيه

شكل (9)

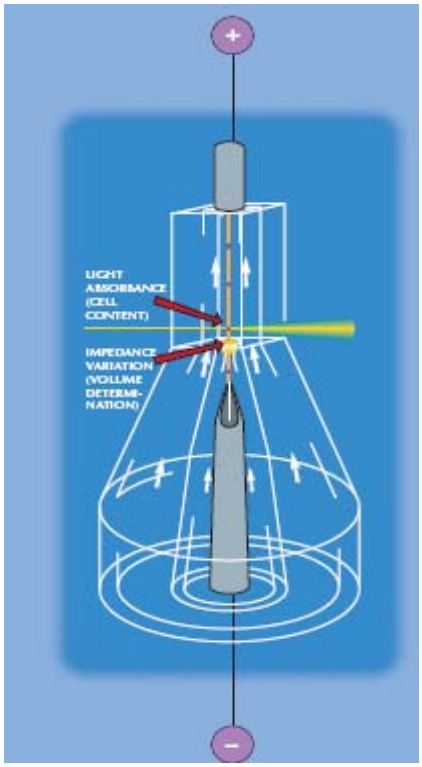
كيفية عد الخلايا خلال مرورها الفتحة:

يوضح الشكل التالي بنية الفتحة مع الحساس المكون من مرسل ومستقبل وكذلك المخطط الباني الناتج عن عد هذه العينة من الدم.



The shape of Aperture

الشكل (10)



شكل(11) DHSS

-Double Hydro Dynamic Sequential System (DHSS):

DHSS هي تقنية دقيقة جداً التي تسمح لقياس حجم الخلية وتحليل محتوى الخلية خلال تدفق خلية واحدي(لكل خلية دموية تمر عبر الفتحة) حيث يقدم DHSS فوائد خاصة منها:

- في هذا النظام التسلسلي (timing device) يتم مرور الخلية الدموية من خلال الفتحة aperture حيث تعتبر ممانعة الفتحة صفرية عند مرور الدم(البلازما) بينما تكون ذات ممانعة كبيره عند مرور الخلية الدموية ويجب أن يكون مرور الخلية خلال الفتحة متوافق تماماً مع الشعاع الضوئي الخفيف المبعثر منها الذي يتم استقباله من خلال Photomultiplier ومن ثم يتم إكمال دورة العد كما في الشكل (9) حيث تستغرق هذه العملية زمن صغير حوالي 200 microsecond وهذا زمن صغير جداً مقارنة مع طريقة العد اليدوي ولذلك فإننا نستطيع قياس أو عد عدد هائل من هذه الخلايا (مع كل مكونات الدم) خلال فتره قصيرة ولعدة عينات ,وصغر الزمن يمنع قياس الفراغات حيث

أن هذا الجهاز مزود بعملية غسيل يقوم بالغسل الآلي للجهاز نفسه بين قياسين متتاليين حتى لا يصير خلط أو مزج بين عينتين (Two Sample) ولتفادي الحصول على نتائج غير مرغوبة وتعبر هذه ميزات هامة جداً لجهاز تحليل الدم .

إن جهاز pentra 60 يعطي نتائج دقيقة جدا لكل مكونات الدم في أقل من دقيقة

بالإضافة إلى خمس قياسات خاصة بكريات الدم البيضاء WBC وبنفس عملية القياس

وهذا يدل على أن هذا الجهاز دقيق جداً ومن هذه القياسات كما بالجدول التالي:

a- PENTRA60

الحالة المقاسة لـWBC	القيمة المقاسه	النسبة الطبيعية	
Neutrophils	47.80%	3.95 10^3/mm^3	
Lymphocytes	42.90%	3.55 10^3/mm^3	
Monocytes	6.00%	0.5 10^3/mm^3	
Eosinophils	2.70%	0.22 10^3/mm^3	
Basophils	0.60%	0.05 10^3/mm^3	
وأيضاً يقوم هذا الجهاز بقياس :			
الحالة المقاسه		القيمة المقاسه	النسبة الطبيعية
Atypical Lymphocytes(ALY)		0.96%	0.08 10^3/mm^3
Large immature cells(LIC)		0.90%	0.07 10^3/mm^3

b- WBC جدول يبين قياسات خاصة بـ

شكل (12)

1. Neutrophils:هي الخلايا البالعة , وظيفتها :هضم أو بلع البكتيريا في الجسم نسبتها من % 70 – 40 إذا كان عددها قليل فإنه يدل على أن الجسم قابل للمرض بسرعة .إذا وصل عددها إلى فوق 70% هذا يعني تواجد بكتيريا بالدم.
2. Lymphocytes: هي الخلايا اللمفاوية نسبتها من % 50 – 20 من نسبة خلايا الدم البيضاء, تستجيب للإصابات الفيروسية إذا كانت نسبتها عالية فهذا يدل على وجود فيروس في الدم.
3. Monocytes : نسبته من% 5 – 1.
4. Eosinophils : نسبتها % 5.
5. Basophils :الخلايا القاعدية نسبتها % 0.5.

أنبوب ذو مهبط مضاعف ضوئي photomultiplier :

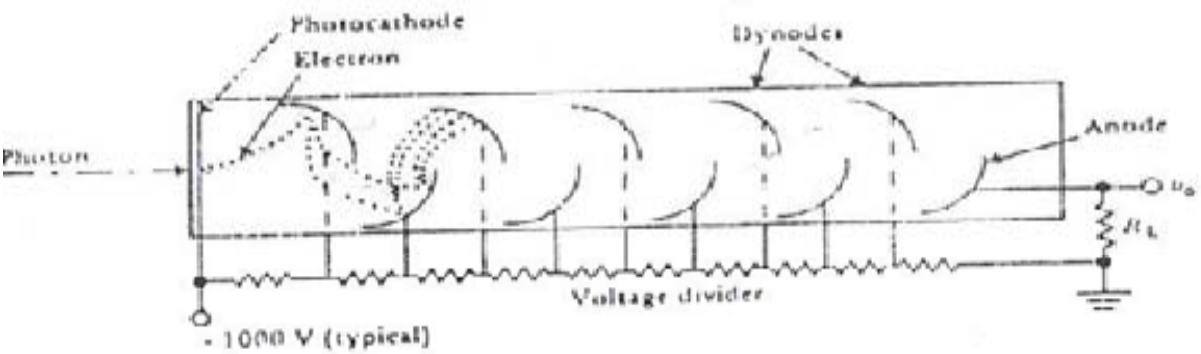
يبين الشكل التالي الرسم التخطيطي للمضاعف الضوئي , وهو أنبوب ضوئي مدموج مع مضاعف إلكتروني , وتعتبر محولات طاقة ذات الانبعاث بتأثير الضوء photomissive Transducers .

تملك هذه الحساسات مهبط ضوئي مغطى بمادة قلوية , حيث أنه بتطبيق الشعاع الضوئي المبعثر ــ الناتج عن اصطدام الشعاع الليزري مع الخلية الدموية خلال مرورها عبر الفتحة aperture ـ على photomultiplier

فإنه يصطدم مباشرة مع المهبط الضوئي فإذا كانت طاقة الـ photon للإشعاع كافية للتغلب وتفكيك الروابط الثنائيه لذرات المهبط (تابع العمل) فإنه سوف يتحرر إلكترون من مستوى طاقه أدنى إلى مستوى طاقه أعلى كونه اكتسب طاقة الفوتون الوارد وسوف يتحرك باتجاه القطب الموجب للـ photomultiplier بحركة متسارعه

تحت تطبيق جهد نموذجي (v 1000-) حيث يضرب هذا الإلكترون الـ Dynode الأول بطاقة كافية لتحرير بضعة الكترونات أخرى منه وتتسارع هذه الإلكترونات لتصطدم بالـ Dynode الثاني وهكذا تتكرر العمليه.

وهذا العمل يوافق مرور خلية دمويه فقط خلال الفتحة والإستجابه الزمنية لهذا المضاعف هي أقل من 10ns .



شكل(13): الرسم التخطيطي للمضاعف الضوئي photomultiplier

<u>عملية التثفيل :</u>

في بداية التحليل تؤخذ عينة من دم المريض المراد تحليلها ومن ثم إضافة مادة كيميائية إلي هذه العينة لتمنعها من التخثر ومن ثم تمر العينة بمرحلة التثفيل (فصل المواد السائلة عن المواد الصلبة) حيث يستفاد من هذه المرحلة في معرفة مدى شدة الترابط بن البلازما(دم بدون كريات) والخلايا الدموية (RBC – WBC - PLT) فكلما كان الترابط أكبر كان المرض بدرجة أقل والعكس بالعكس , ويبين الشكل التالي عملية التثفيل وهي عملية بسيطة جداً لكنها تستغرق وقت زمني كبير نسبياً حوالي 2 hours .

The sampling

التثفيل

الشكل(14)

الشكل (14)

هذا الجهاز ANTOMED يستخدم لتحريك أو تدوير العينات من خلال العمود الأفقي حتى لا يتم عملية تكثف أو تخثر خلايا الدم ,وتتم هذه العملية قبل آخذ العينة إلى الجهاز PENTRA 60.

الشكل(15)

❖ يبين الجدول التالي كل البارامترات التي يتم قياسها من خلال هذا الجهاز :

PENTRA 60: TECHNICAL SPECIFICATIONS

12 Parameters (CBC mode)	• RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, RDW • PLT, MPV, PCT, PDW • WBC
26 Parameters (5 DIFF mode)	• RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, RDW • PLT, MPV, PCT, PDW • WBC, LYM, MON, NEU, EOS, BASO, ALY (Atypical Lymphocytes), LIC (Large Immature Cells) in % and # RBC and BASO histograms PLT histogram High resolution LMNE matrix, including ALY and LIC populations
Sample handling	• By single button aspiration on whole blood. • Open tube mode.
Sample volume	• 30 µL in CBC mode • 53 µL in 5 DIFF mode
Throughput	• 60 samples per hour
Post-draw stability	• Up to 48 hours
Sample distribution	• MDSS technology (ABX Patent)
Counting methods	• Cytochemistry • Focused Flow impedance • Light absorbance
Sample identification	• Alphanumeric patient identification with patient run number and sequence number • Optional barcode reading

Display	• 16 lines LCD screen
Data processing	• Multitask multifunction • RS 232 C • Uni-directional
Printer	• EPSON LX 300 80 column dot matrix printer, A4 paper format
Report options	• Histogram selection for 12 or 26 parameters • User programmable parameter units • Reference values printed on every report • Full page graphic reports
Start-up cycles	• Automatic and programmable
Cleaning cycles	• Automatic and programmable
Reagents	• ABX DILUENT (20 L) • ABX ALPHALYSE (0.4 L) • ABX CLEANER (1 L) • ABX EOSINOFIX (1 L) • ABX BASOLYSE II (1 L) • Optional CN-Free Lysis: ABX LYSEBIO (0.4 L)
Reagent alarm	• Yes
Dimensions	• 51,6 x 44,4 x 48,1 cm (H x W x D)
Weight	• 35 Kg
Power supply	• 100 V to 240 V 50/60 Hz, 200 VA

Parameters	Linearity limits*	Visible range*	Error limit**
WBC	0 – 120 x 10^3/mm³	120 -150	±0.3 7.5%
RBC	0 – 8 x 10^6/mm³	8 - 18	±0.07 3%
HGB	0 – 24 gr/dl	24 - 30	±0.3 3%
HCT	0 – 67 %	67 - 80	±2 3%
PLT (WHOLE BLOOD)	0 – 1900 x 10^3/mm³	1900 - 2800	±10 12.5%
PLT (PLT CONCENTRATE)	0 – 2800 x 10^3/mm³	2800 - 3200	±10 12.5%

Parameters	Within-run precision
Lymphocytes	< 5%
Monocytes	< 10%
Neutrophils	< 3%
Eosinophils	< 20%
Basophils	< 30%

** From software release V2.2.0 and above*
*** Which ever is greater*

الشكل (16)