

## شمارش دستی سلول های خونی (RBC ، WBC و پلاکت)

شمارش سلولهای RBC ، WBC و پلاکت در واحد حجم بیان می شود که بر اساس واحد SI، بر حسب لیتر گزارش خواهد شد ولی علاوه بر آن واحد متداول میکرولیتر نیز می باشد .  
 برای شمارش سلولی به روش دستی از یک ابزار به نام لام هماسیتومتر استفاده می شود که با توجه به وجود دستگاههای شمارش سلولی اتوماتیک هنوز هر تکنولوژیست آزمایشگاه باید قادر به استفاده از لام هماسیتومتر باشد و محدودیت های آن را نیز بداند .  
 هر روش شمارش سلولهای خونی شامل سه مرحله است : رقیق کردن نمونه ، نمونه برداری از سوسپانسیون رقیق شده در یک حجم مشخص و شمارش سلول ها در همان حجم .  
**نکته :** چه ضرورتی به استفاده از این ابزار وجود دارد ، در حالیکه امروزه دستگاههای اتوماتیک بسیار دقیق موجود می باشد؟  
**الف:** در ارزیابی اعتبار روشهای الکترونیک برای کالیبراسیون  
**ب:** در بررسی اعتبار شمارش الکترونیکی لکوسیت ها در بیماران مبتلا به لکوپنی (کاهش گلبول سفید) ترومبوسیتوپنی شدید (کاهش پلاکت )  
**ج:** در صورت وجود گلبول های بسیار ریز (میکروسیت) که در شمارش پلاکتی تداخل ایجاد می کند.  
**د:** به عنوان یک روش کمکی  
**ه:** شمارش سلول ها در مایع مغزی نخایی (CSF)

### الف: رقیق کردن نمونه :

#### ۱ - شمارش گلبول سفید

برای شمارش WBC باید گلبولهای قرمز را لیز کرد . (تقریباً به ازای هر یک عدد گلبول سفید بین ۷۰۰ تا ۱۰۰۰ عدد گلبول قرمز در بدن موجود است که می تواند سبب تداخل در شمارش شود)  
 برای لیز کردن گلبولهای قرمز از محلول ۲٪ اسید استیک در آب مقطر استفاده می شود و به نام محلول تورک مشهور است . (می توان برای تفکیک آن از محلول شمارش RBC ، کمی رنگ متیلن بلو به آن اضافه کرد)<sup>۱</sup>

#### برای رقیق کردن خون در محلول تورک سه راه وجود دارد:

##### راه اول : استفاده از پیپت ملاتژور سفید:

به توجه به شکل مقابل این ابزار دارای یک ساقه و یک محفظه مخلوط کننده می باشد که حجم ساقه برابر با یک حجم مخلوط کننده برابر با ۱۰ می باشد و حاوی یک مهره پلاستیکی سفید رنگ برای مخلوط نمودن خون و تورک می باشد. در حالت نرمال ، خون را تا درجه ۵/۰ از ساقه کشیده و بعد از تمیز کردن اطراف بیرونی ساقه ملاتژور ، آن را وارد محلول تورک کرده و تا درجه ۱۱ پیپت ملاتژور از محلول تورک پر می کنیم . سپس دوانتهای پیپت ملاتژور را با انگشت گرفته و تا ۵ دقیقه بصورت افقی روی شیکر قرار می دهیم .



$$\text{رقیق} = \frac{\text{حجم ساقه } 0/5}{\text{حجم محفظه } 10} = \frac{1}{20}$$

**نکته :** در صورتی که زمان کشیده خون تا اندازه ۵/۰ ، خون حدود ۲ میلی متر بالاتر یا پایین تر بود می توانیم با خالی کردن خون اضافی و یا کشیدن خون بیشتر آنرا جبران کنیم ولی در صورت بیشتر بودن دیگر قادر به استفاده از آن پیپت نیستیم و باید پیپت را شسته و خشک نماییم تا دوباره مورد استفاده قرار بگیرد.  
**نکته :** ضد انعقاد مناسب برای شمارش سلولی EDTA می باشد.

#### راه دوم : استفاده از پیپت سالی (Sahli)

این پیپت در اصل برای اندازه گیری هموگلوبین مورد استفاده قرار می گیرد که حجم آن برابر با ۰/۰۲ سی سی است . برای اینکه رقت معادل ۱/۲۰ پیپت ملاتژور را بدست بیاوریم باید ۰/۰۲ سی سی خون را با ۰/۳۸ سی سی محلول تورک مخلوط نماییم .

$$\text{رقیق} = \frac{\text{حجم ماده حل شونده } 0/02}{\text{حجم ماده حل شونده} + \text{حجم ماده حل کننده } 0/38} = \frac{0/02}{0/40} = \frac{1}{20}$$

#### راه سوم: استفاده از سمپلرهای با دقت بالا:

این ۲۰ خون را با ۳۸۰ تورک مخلوط می کنیم .

<sup>۱</sup> محلول مارکتو نیز از دیگر رقیق کننده های شمارش WBC میباشد

## ۲- شمارش گلبول قرمز :

برای شمارش گلبول قرمز باید از رقیق کننده ای ایزوتونیک استفاده کرد تا بر روی RBC اثر مخرب نداشته باشد که برای این منظوری توان از سرم فیزیولوژی (نرمال سیلین) ۰/۹ گرم درصد یا محلول هیام (Hayam) ویا گاور (Gower) استفاده نمود. در اینجا نیز می توان از سه ابزار پیت ملانژور قرمز ، پیت سالی ویا سمپلر استفاده نمود.

### راه اول : پیت ملانژور قرمز:

این پیت با حجم ساقه یک و حجم مخلوط کننده ۱۰۰ واحد می باشد ویک مهره قرمز نیز در آن موجود است . در حالت نرمال تا حجم ۰/۵ از ساقه خون کشیده و بعد از تمیز کردن اطراف ملانژور به کمک نرمال سیلین تا حجم ۱۰۱ نمونه را رقیق می کنیم . دو انتهای ملانژور را با دوانگشت در حالت افقی گرفته و برای ۳ تا ۵ دقیقه روی شیکر قرار میدهم .

$$\text{رقت} = \frac{1}{\frac{0.5}{200}} = \frac{200}{0.5} = 400$$

راه دوم: با استفاده از پیت سالی نیز می توان خون را رقیق کرد که برای این هدف ۰/۰۲<sup>cc</sup> خون را با پیت سالی در ۳/۹۸ سی سی نرمال سیلین رقیق می کنیم .

$$\text{رقت} = \frac{1}{\frac{0.02}{200 + 3.98}} = \frac{200}{0.02 + 3.98} = 50$$

راه سوم : استفاده از سمپلرهای دقیق ۰/۰۲ و سمپلر متغیر ۰/۰۳۹۸ تا رقت ۱/۲۰۰ حاصل شود.

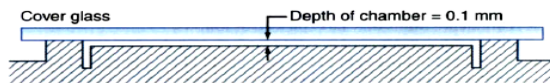
## ۳- شمارش پلاکت :

برای شمارش پلاکت های خونی با استفاده از هموسیتمتر، از آگزالات آمونیوم ۱٪ استفاده می کنیم [ آگزالات آمونیوم ۱٪ : ۱ گرم نمک آگزالات آمونیوم در ۱۰۰ سی سی آب مقطر حل می کنیم ] . این محلول را در یخچال نگهداری می کنیم و قبل از مصرف روزانه باید آنرا از صافی عبور داد و باقیمانده محلول صاف شده را در پایان کار دور ریخت. خونی که به خوبی مخلوط شده است با نسبت ۱/۱۰۰ در مایع ۱٪ آگزالات آمونیوم رقیق کرده و برای ۱۰ تا ۱۵ دقیقه روی شیکر مخلوط می کنیم .

### ب: نمونه بردای از سوسپانسیون رقیق شده :

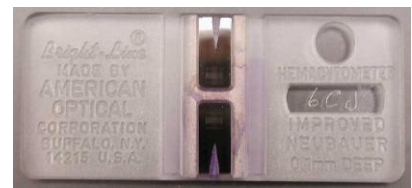
س: لام هماسیتومتر چیست؟

ج : لام هماسیتومتر محفظه شیشه ای است که قسمت مرکزی این لام توسط یک شکاف از هر طرف سکوی کناری متصل است . ( مطابق شکل ب ۱ ) بر روی صفحه مرکزی این لام خط کشی مخصوصی انجام شده است که این سطح نسبت به سکوی کناری ۱/۱ میلی متر پایین تر می باشد و در صورتی که یک لامل مخصوص (لام سنگی ، Polish cover glass) روی سکو قرار بگیرد ، فاصله بین لامل و کف خط کشی شده برابر ۰/۱ میلی متر خواهد بود. در بسیاری از لام ها ، صفحه مرکزی به دو قسمت مساوی تقسیم شده است و امکان شمارش سلولی دو بیمار را بر روی یک لام برای ما فراهم می سازد. نوع استاندارد شده این لام را با نام Improved Neubauer می شناسند.

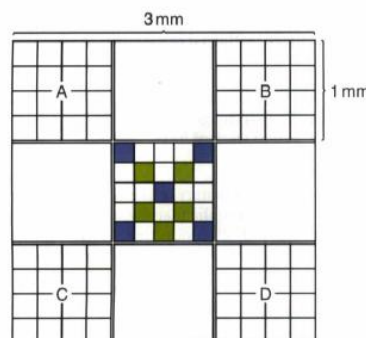
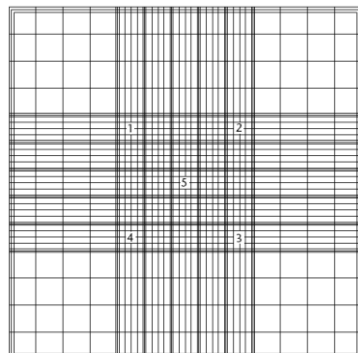


(شکل ب ۱)

Figure 29-3 The upper figure is a diagram of the improved Neubauer ruling; this is etched on the surface of each side of the hemocytometer. The large corner squares, A, B, C, and D, are used for leukocyte counts. The five blue squares in the center are used for red cell counts or for platelet counts, and the 10 green plus blue squares for platelet counts. Actually, each of the 25 squares within the central sq mm has within it 16 smaller squares for convenience in counting. The lower figure is a side view of the chamber with the cover glass in place.



با توجه به تصویر ب - ۲ ، خط کشی صفحه مرکزی شامل یک مربع است که ابعاد آن ۳ × ۳ میلی متر می باشد و خود این مربع به ۹ مربع مساوی با ابعاد ۱ × ۱ میلی متر تقسیم شده است.



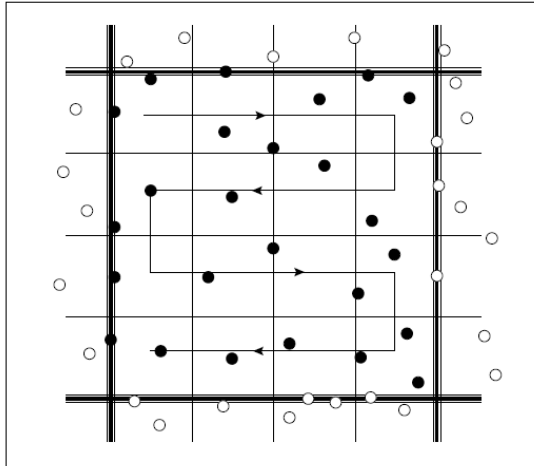
چهار مربع که در گوشه قرار گرفته اند و با حروف A, B, C, D مشخص شده است ، مخصوص شمارش گلبول سفید می باشد که برای آسانتر شدن شمارش WBC خود این مربع ها دوباره به ۱۶ مربع کوچکتر تقسیم شده اند . مربع وسط که دور تا دور آن با خط کشی های ۳ تایی متمایز است مخصوص شمارش گلبول های قرمز می باشد. که خود به ۲۵ مربع کوچک تر

تقسیم شده اند و هر مربع کوچک به اضلاع ۲/۰ میلی متر می باشد. برای آسان تر شدن شمارش گلبولهای قرمز (به علت تعداد زیاد) هر مربع از این ۲۵ عدد دوباره به میزان ۱۶ مربع کوچک تر تقسیم شده است و دقیقاً ۴۰۰ مربع کوچک را برای ما ایجاد کرده است. شمارش گلبول های قرمز معمولاً در ۵ خانه از ۲۵ عدد مربع که در چهار گوشه و مرکز مربع است، صورت می گیرد، یعنی ۸۰ مربع کوچکتر یا سطحی معادل ۱/۵ کل مربع مخصوص RBC.

برای انتقال نمونه از ملانژور پس از گذشت ۵ دقیقه و مخلوط شدن نمونه با رقیق کننده، ابتدا باید چند قطره از خون رقیق شده درون ملانژور را دور ریخت زیرا در ابتدای ساقه ی ملانژور تنها محلول رقیق کننده می باشد و سپس نوک ملانژور را در کنار لامل مماس با صفحه مرکزی قرار داده و به آرامی فضای زیر لامل را از خون رقیق شده پرمی کنیم.

خون رقیق شده باید فضای زیر لامل را کاملاً بپوشاند ولی وارد شکاف های اطراف لامل نشود و هیچ حباب یا ذرات گرد و غبار روی سطح لامل وزیر لامل نباشد و از شناور شدن لامل به واسطه ریختن خون اضافی بر روی لامل جلوگیری کرد.

چ : شمارش سلول ها



برای شمارش WBC از عدسی با بزرگنمایی ۱۰ و برای شمارش RBC با بزرگنمایی ۴۰ استفاده می کنیم. قبل از شمارش چند دقیقه به سلول ها اجازه می دهیم تا بر روی لامل ساکن شوند و سپس با بزرگنمایی ۱۰ از توزیع یکنواخت سلول ها اطمینان حاصل می کنیم. همانطور که قبلاً هم ذکر شد، WBC ها را در چهار خانه C, B, A و D و RBC ها را در مربع وسطی و در سطحی معادل ۱/۵ کل مربع شمارش می کنیم.

سلول هایی که به طور مماس خارج یا متقاطع بر روی اضلاع مربع ۱ × ۱ میلی متر قرار گرفته اند را تنها در دو ضلع مجاور هر مربع که به شکل حرف L میباشد، شمارش می کنیم.

**محاسبه :**

$$\text{شمارش گلبول سفید در } \text{mm}^3 = \frac{\text{مجموع WBC های شمارش شده در ۴ مربع C, B, A و D}}{\text{تعداد خانه های شمارش شده}} \times \text{رقت} \times \text{ضریب ارتفاع}$$

رقت = ۲۰

ضریب ارتفاع = ۱۰

تعداد خانه های شمارش شده = ۴

$$\text{تعداد خانه شمارش شده} \times \text{ضریب ارتفاع} \times \text{رقت} \times \text{مجموع RBC های شمارش شده در ۵ خانه از مربع وسطی} = \text{شمارش گلبول قرمز در } \text{mm}^3$$

رقت : ۲۰۰

ضریب ارتفاع : ۱۰

تعداد خانه شمارش شده : ۵

مثال ۱: برای شمارش WBC بیمار خون را تا درجه ۵/۰ وارد ملانژور نموده و پس از شمارش در ۴ خانه مربوط به WBC، تعداد ۱۸۰ گلبول سفید شمرده شده، تعداد گلبول سفید بیمار در میلی متر مکعب را گزارش نمایید.

$$\text{WBC}(\text{mm}^3) = \frac{180}{4} \times 20 \times 10$$

$$\text{WBC} = 9000 \text{ mm}^3$$

مثال ۲: برای شمارش RBC بیماری که کم خون بود خون را تا درجه ۱ وارد ملانژور کردیم و تعداد RBC های بیمار را در ۱۰ خانه از ۲۵ مربع وسط هماسیتومتر شمریم که برابر با ۴۵۰ بود، تعداد RBC بیمار در میلی متر مکعب را گزارش نمایید.

رقت = ۱/۱۰۰

$$\text{ضریب تعداد خانه شمرده شده} = 25 \div 10 = 2/5$$

$$\text{RBC} = 450 \times 100 \times 10 \times 2.5 = 1.125 \times 10^3 \text{ mm}^3$$

برای شمارش پلاکتی در محلول آگزالات آمونیوم پس از اینکه محفظه هماسیتومتر را پر کردیم، ابتدا لام را در ظرف حاوی یک گاز مرطوب برای ۱۵ دقیقه قرار می دهیم تا پلاکت ها ساکن شوند . پلاکت ها در این حالت گرد یا بیضی و اکثراً دارای یک یا چند زائده دندریتی هستند . پلاکت ها را در ۱۰ مربع کوچک از ۲۵ خانه RBC می شماریم و در صورتی که در این مقدار خانه کمتر از ۱۰۰ عدد بود ، باید مربع های بیشتری شمرده شود تا دست کم ۱۰۰ عدد پلاکت شمرده شود .

$$\text{پلاکت } (mm^3) = \frac{\text{پلاکت شمرده شده}}{\text{مربع های شمارش شده}} \times 250 \times \text{رقت}$$

### گویچه های قرمز هسته دار (NRBC) :

در زمان شمارش لکوسیت ها چه به روش دستی و چه توسط دستگاه های اتوماتیک شمارش سلولی ، گویچه های قرمز هسته دار (NRBC) به عنوان WBC شمارش می شوند و در روش دستی با بزرگنمایی که جهت شمارش لکوسیت ها استفاده می شوند قابل افتراق از یکدیگر نیستند . برای تفکیک این NRBC ها از گلبول های سفید باید یک لام از بیمار تهیه نموده و اگر تعداد زیادی از گویچه های قرمز هسته دار در گسترش رنگ شده مشاهده شوند ، باید بر اساس فرمول زیر اصلاح صورت پذیرد .

$$\text{شمارش صحیح لکوسیت ها} = \frac{100 \times \text{شمارش کل}}{100 + \text{تعداد NRBC}}$$

در اینجا تعداد NRBC به معنای تعداد گویچه قرمز هسته داری است که در خلال شمارش ۱۰۰ لکوسیت در شمارش افتراقی شمرده شده اند . مثال : یک گسترش خونی تعداد ۲۵ گویچه قرمز هسته دار را در ۱۰۰ لکوسیت نشان می دهد . شمارش کل سلول های هسته دار ۱۰۰۰۰ است بنابراین :

$$\text{شمارش تصحیح شده گلبول سفید} = \frac{10000 \times 100}{100 + 25} = 8000 / \text{لیتر}$$

مقدار مرجع : در شمارش لکوسیتی تام ، همه شش نوع سلول طبیعی (نوتروفیل و بانده ، لنفوسیت ، مونوسیت ، ائوزینوفیل و بازوفیل) شمارش میشوند . میزان مرجع شمارش کل گلبول سفید برای بالغین  $4/5 - 11 \times 10^9 / L$  است .

**نکته:** برای شمارش ائوزینوفیل با استفاده از لام هماسیتومتر از محلول دانجر (Dunger's solution) که محتوی رنگ ائوزین می باشد استفاده میشود.

منابع:

1--Richard A. McPherson MD, Matthew R. Pincus MD PhD. Henry's Clinical Diagnosis AND Management BY Laboratory Methods. 12 7002 ©<sup>st</sup> Edition

2- Dacie and Lewis Practical Haematology, 10th ed., Copyright © 2006 Churchill Livingstone

3-Frank C. Hay PhD, Olwyn M.R. Westwood PhD. Practical Immunology, 4 th edition, 2002 by Blackwell Science Ltd

۴- روش های آزمایشگاهی و کنترل کیفی در خون شناسی ، دکتر حبیب الله گل افشان ۱۳۷۹