العدّ التفريقي (التمييزي) للكريات البيضاء

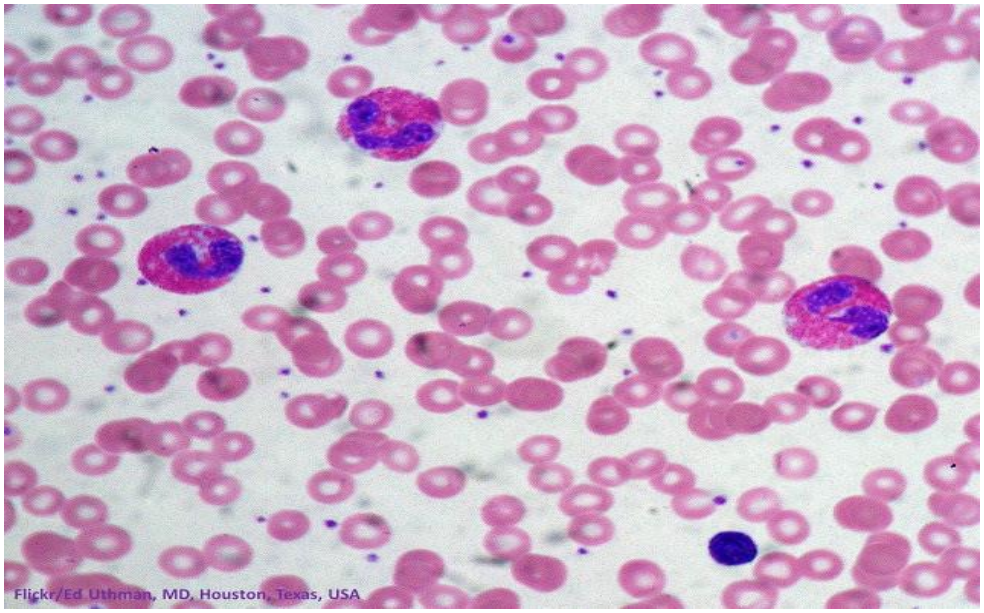
Differential Leucocyte Count

الكريات البيضاء: هي عبارة عن عناصر خلوية غير منتظمة ولماعة، وعددها قليل بالنسبة للكريات الحمراء، وتوجد في الفضاءات الحرة بين كتل الكريات الحمراء.

وتمتلك الكريات البيضاء تحت المجهر الأشكال التالية:

أولا: الكريات البيضاء المحببة:

1- الحمضات (Eosinophils): وهي خلايا كبيرة، نواتها مفصصه إلى حوالي **2-3** فصوص وهي أقل تفصصاً من العدلات. عددها قليل وتحتوي الهيولى فيها على حبيبات كبيرة الحجم. تتلون حبيباتها باللون الأحمر الطوبي بالأصبغة الحمضية (الشكل 1).

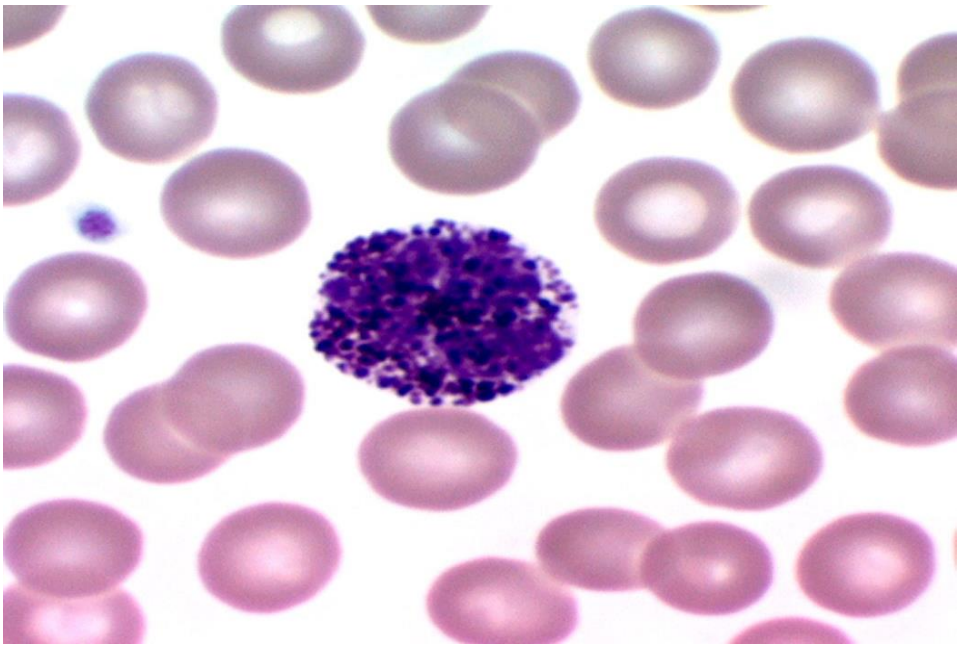


الشكل (1): الكريات البيضاء المحببة من نوع الحمضات (Eosinophils)

2- القعدات (Basophils):

وهي عبارة عن خلايا كبيرة الحجم، نواتها مفصصه، تحتوي الهيولى فيها على حبيبات كبيرة الحجم.

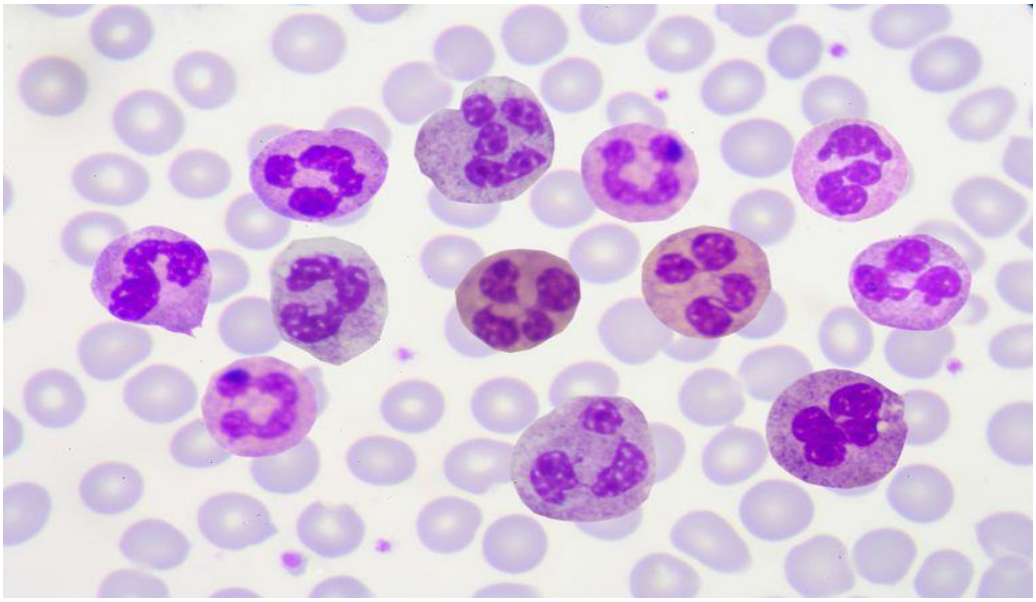
تتلون حبيباتها باللون الأزرق بالأصبغة القلوية وهي الأقل عدداً بين أنواع الكريات البيضاء (الشكل 2).



الشكل (2): الكريات البيضاء من نوع القعدات (Basophils)

3- العدلات (Neutrophils):

وهي خلايا كبيرة الحجم أيضاً ذات نواة واضحة وداكنة. حبيباتها صغيرة، تتلون حبيباتها باللون الأحمر البنفسجي وتتلون باللون الوردي أحياناً وهي الأكثر عدداً بين أنواع الكريات البيضاء (الشكل 3).



الشكل (3): الكريا ت البيضاء من نوع العدلات (Neutrophils).

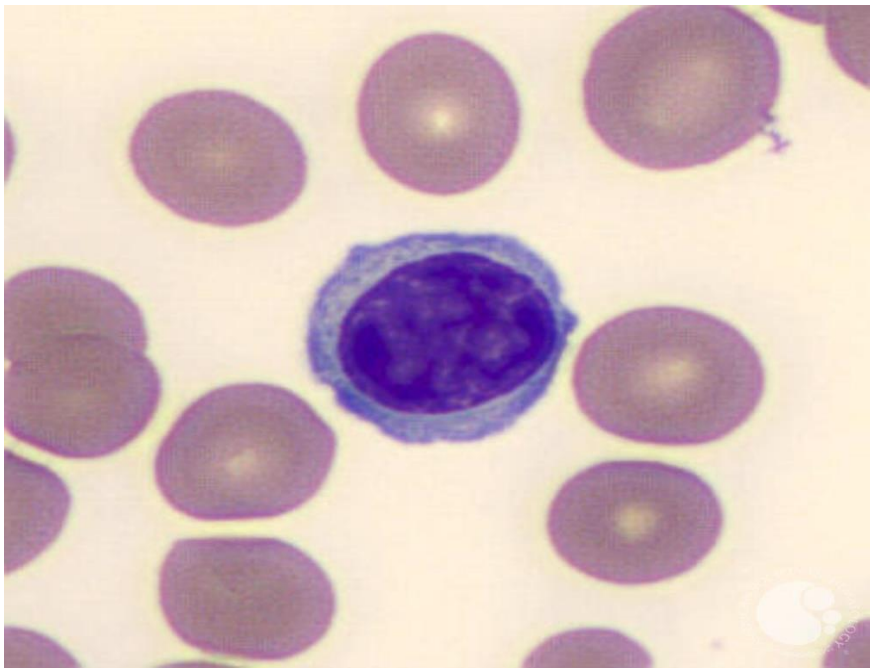
وبحسب تطورها نلاحظ أنّ العدلات الناشئة تكون ذات نواة دائرية الشكل, أمّا العدلات الفتية تكون ذات نواة عصوية الشكل أو على شكل حذوة, وقد نجد عدلات ذات شكل مفصص وهي ذات نواة مقسمة إلى عدة فصوص موصولة بخيوط دقيقة (عدلات مفصصة النواة).

ثانياً: الكريات البيضاء غير المحببة:

ويوجد منها عدة أنواع نذكر منها:

1- اللمفاويات Lymphocytes: وهي خلايا كبيرة الحجم ذات نواة واحدة كبيرة مرصوصة محاطة بحزام ضيق من الهيولى. نواتها شديدة التلون، ولا تحتوي الهيولى فيها على حبيبات.

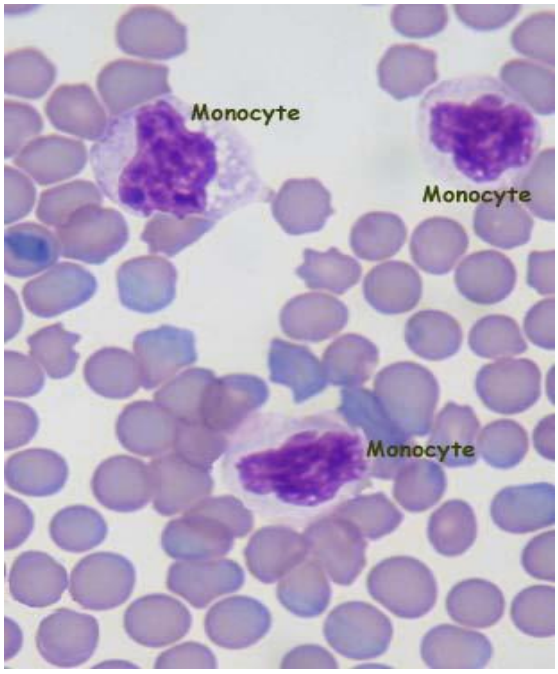
والصفة المميزة للكريات اللمفاوية، هي المنطقة النيرة (الفاتحة) حول النواة والظاهرة بوضوح على أرضية زرقاء للهيولى المصبوغة. وتبعاً للحجم يميز منها: الكبيرة والمتوسطة والصغيرة (الشكل 4).



الشكل (4): الكريات البيضاء اللمفاوية Lymphocytes

2- الوحيدات Monocytes:

وهي أكبر الكريات البيضاء حجماً ونواتها غير منتظمة الشكل (قد تكون مستديرة أو على شكل حبة الفاصولياء أو بيضاوية) محاطة بهيولى واسعة تتلون بلون أزرق-أشهب، غير محببة وأحياناً تحتوي على حبيبات قليلة ناعمة ولا تملك منطقة نيرة حول النواة (الشكل 5).



الشكل (5): الوحيدات Monocytes

يتضمن اختيار العد التمييزي للكريات البيضاء معرفة نسبة عدد كل نوع من أنواع الكريات البيضاء إلى مجموع العدد الإجمالي لهذه الكريات المعدودة (الصيغة الكريوية) ولتحديد هذه الصيغة تحضر شريحة دم وتصبغ.

تحضير شريحة الدم:

- **المطلوب للتجربة:**
- شرائح زجاجية نظيفة.
- دم.
- كحول.
- حامل خاص بتثبيت الشرائح.
- صبغة ليشمان أو صبغة رايت.
- حوض لصبغ الشرائح.
- مجهر.
- زيت خشب السيدر.
- ماء مقطر.

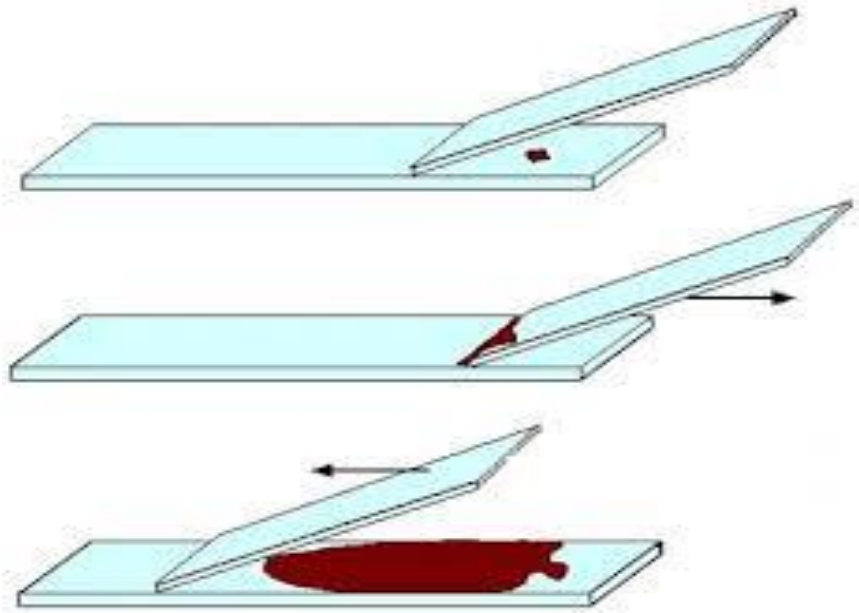
- **طريقة العمل:**

هناك أكثر من طريقة لعمل شريحة الدم نذكر منها:

1- طريقة الشرائح المجهرية: يمكن استعمال شريحتين /2.5×7.5سم/، تغطى الأولى بطبقة رقيقة من الدم (مسحة) وتستعمل الثانية لفرد الدم.

يمسح مكان أخذ الدم بالكحول ويترك ليجف، ثم تعمل وخزة بإبرة معقمة ونظيفة أو بواسطة ابرة فرانك، تمسح النقطة الأولى بعد الوخز بواسطة الشاش أو القطن، ويقرب أحد طرفي الشريحة ويلامس به نقطة الدم، ثم توضع على سطح مستو، وتوضع حافة الفاردة على سطح الشريحة أمام نقطة الدم بزاوية حادة، ثم تسحب الفاردة إلى الخلف حتى تلامس نقطة الدم، حيث ينتشر الدم على طول خط تلامسه مع الشريحة الزجاجية ببطء ورفق، وذلك لأن السرعة تسبب سماكة الشريط أو المسحة الدموية. تترك لتجف أو تلوح بلطف لتجف بسرعة.

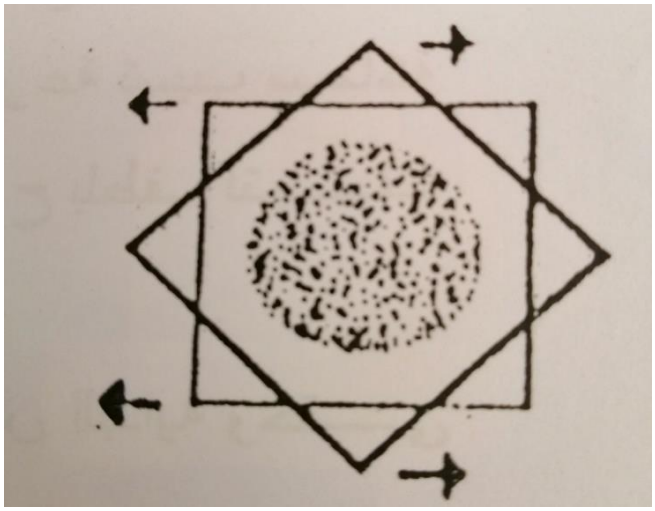
الشريط الجيد يجب أن يكون في سمك كرية واحدة من البداية وحتى النهاية (الشكل 6).



الشكل (6): طريقة تحضير مسحة الدم بالشرائح المجهرية.

2- طريقة الساترة:

نأخذ ساترتين /2×2سم/ ونضع نقطة دم على إحداهما، ثم نمسكها من زواياها المتقابلة بالإبهام والسبابة لليد اليسرى (نقطة الدم من الأعلى)، ونسقط الساترة الأخرى فوق الأولى، بحيث تظهر زواياها من منتصف الأطراف الجانبية للساترة السفلية. وبعد انتشار الدم بطبقة رقيقة بين الساترتين، تمسك الزوايا المتقابلة للساترة العليا بالابهام والسبابة لليد اليمنى ونسحب (الشكل 7) ثم نترك هذه المسحات لتجف في الهواء.



الشكل (7): طريقة تحضير الشرائح بواسطة الساترات

- **تثبيت مسحة الدم:**

تثبت مسحة الدم بتغطيس الشريحة في كأس مملوءة بالكحول. أما إذا كانت الشرائح عديدة فإنه يجب وضع الشرائح بواسطة الملقط بشكل زوجي بحيث تكون المسحات للخارج في الأخاديد المخصصة لها في كأس تثبيت الشرائح المملوءة بالكحول.

بعد /5/ دقائق تخرج الشرائح وتوضع بشكل إفرادي في وضع عمودي على ورقة ترشيح. أما سائل التثبيت فيمكن استعمالة مرات عديدة إذا ما حفظ بشكل جيد وبأوعية زجاجية مغلقة تماماً.

- **صبغ الشرائح:**

يمكن صبغ الشرائح بعدة طرق نذكر منها:

أولاً: طريقة رايت:

1- توضع الشرائح الزجاجية على حمالة الصبغ وسطح المسحة للأعلى، أما الشرائح المعمولة من الساترات فتوضع على شرائح زجاجية نظيفة موضوعة على حمالة صبغ الشرائح.
2- تسكب صبغة رايت المركزة فوق شريط الدم /الفيلم/ ويغمر بشكل كامل ويترك هكذا لمدة /4/ دقائق. الزمن تابع لسماكة الفيلم، حيث يزداد الزمن مع زيادة سماكة الفيلم.
3- يضاف ماء مقطر إلى الصبغة المركزة، وبنفس كمية الصبغة تقريباً مع مراعاة عدم انسكاب الصبغة عن الشريحة، وتمزج بواسطة النفخ بماسة، حتى يظهر بريق معدني على سطح المزيج، وتترك هكذا لمدة /4-8/ دقائق.
4- تغسل الشرائح بعد ذلك بالماء المقطر وتنشف أو تترك في الهواء لتجف.

ثانياً: صبغة ليشمان:

صبغة ليشمان: هي عبارة عن خليط أزرق الميتلين والأيوسين في الكحول، حيث يعمل الكحول كمثبت.

توضع الشرائح الزجاجية على حمالة الصبغ وسطح المسحة للأعلى، أما الشرائح المعمولة من الساترات فتوضع على شرائح زجاجية نظيفة موضوعة على حمالة صبغ الشرائح.

تسكب برفق صبغة ليشمان فوق شريط الدم ويغمر بشكل كامل، تترك الصبغة هكذا لمدة /1.5-2/ دقيقة، ثم يضاف إلى الصبغة كمية من الماء المقطر دون أن تنسكب عنها. في هذه الحالة تكون الصبغة قد مددت بنسبة 1:1 أو 1:2 بعد ذلك تشفط الصبغة المخففة بواسطة ماصة وتعاد ثانيةً عدة مرات لكي تقلب وتخلط تماماً.

فإذا كان قد خفف المحلول بشكل صحيح، فإن السائل سيغطى بطبقة خفيفة خضراء معدنية اللون. تترك الصبغة المخففة لتفعل لمدة /15-30/ دقيقة، ثم تزال وتغسل الشرائح بالماء المقطر.

هذا ويجب الانتباه إلى عدم ترسب أجزاء الطبقة الخضراء على سطح شريط الدم، والاستمرار بالغسل إلى أن يظهر اللون البرتقالي أو الأحمر الوردي. بعد ذلك تنشف الشرائح وتترك لتجف في الهواء.

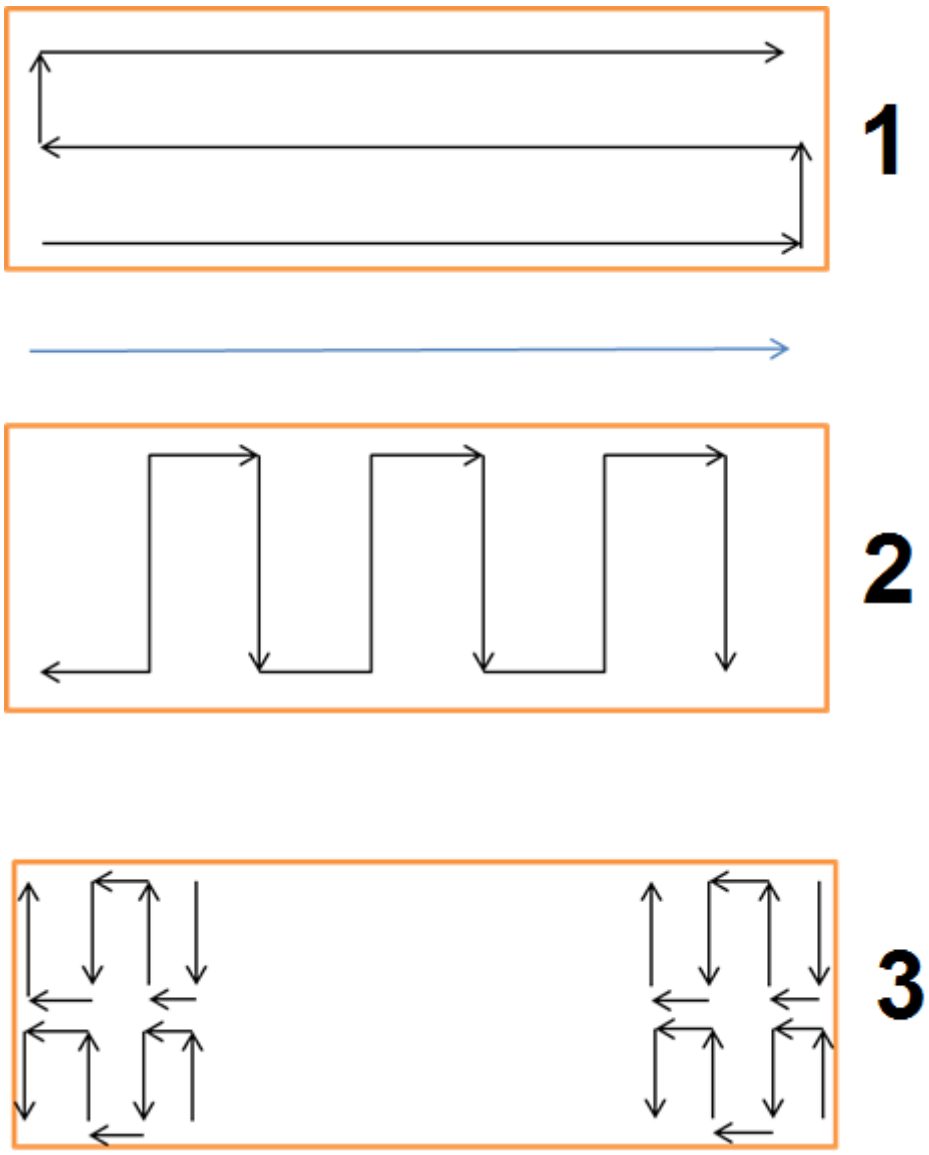
للاستعمال اليومي العادي تغطى الشريحة بطبقة من زيت خشب السيدر وتشاهد تحت المجهر، أما إذا كان من الضروري عمل شرائح ثابتة ودائمة فيمكن تثبيت غطاء شريحة (ساترة) فوق شريط الدم بواسطة بلسم كندا الطبيعي.

- **تحديد الصيغة الكريوية (العد التمييزي):**

توضع الشريحة تحت لمجهر وتشاهد في البداية تحت العدسة ذات التكبير الأقل (×10)، حيث تشاهد الكريات البيضاء منتشرة بشكل غير متساوي بين الأعداد الكبيرة للكريات الحمراء في مساحة الشريحة، وتبدو الكريات الحمراء في الشريحة المصبوغة جيداً بلون أحمر وردي.

يتم اختيار مكان يكون فيه توزع الخلايا أكثر انتظاماً وتوضع علية نقطة من زيت خشب السيدر، ثم تدرس الشريحة بشكل جيد باستعمال العدسة الزيتية (الغاطسة) والمسرح الآلي المتحرك، حيث تنخفض العدسة الزيتية ببطء وحذر (مع النظر من الجانب) إلى أن تلامس مع نقطة لزيت. ثم ترفع العدسة الزيتية لمسافة /1/ مم تقريباً، في هذه الحالة تبقى قوة التوتر السطح الزيت ملامساً للعدسة. ثم ينظر في المجهر وتخفض العدسة الزيتية ببطء وحذر شديدين مستعملين الضابط الواسع إلى أن تظهر حدود الكريات، بعد ذلك نستعمل الضابط الدقيق للضبط البؤري النهائي.

تحرك الشريحة بمساعدة المسرح المتحرك ببطء وتميز الكريات، ولدراسة الشريحة بشكل جيد ولتفادي عد الكريات أكثر من مرة نستعمل الطريقة التالية (الشكل 8).



الشكل (8): طريقة عدّ الكريات مع تفادي التكرار

1- **الطريقة الطولية:** تحرك الشريحة بهذه الطريقة بشكل طولاني ذهاباً وإياباً.
2- **الطريقة العرضية:** تحرك الشريحة بهذه الطريق بشكل عرضاني.
3- **طريقة المناطق المتعددة:** ويتم ذلك باختيار 3-4 مناطق في أطراف الشريحة والقيام بعدّها، وذلك باستعمال الطريقة العرضية السابقة في كل منطقة من المناطق المختارة.

هذه الطريقة الأخيرة تلغي إمكانية الخطاء العفوي المرتبط مع عدم التوزع المنتظم والمتساوي للأنواع المختلفة للكريات البيضاء في شريحة الدم.

أثناء ذلك نميز كل كرية بيضاء تصادفنا وننسبها ثم نسجلها في المكان المناسب في الجدول التالي.

كريات بيضاء محببة				**كريات بيضاء غير محببة**			
حمضات	قعدات	عدلات			وحيدات	لمفاويات	
		ناشئة	**شريطية**	**مفصصة**		**صغيرة**	**متوسطة**	**كبيرة**
%	%	%	%	%	%	%	%	%

كل ضلع من أضلاع المربع وكل قطر له يقابل كرية بيضاء واحدة.

نقوم بتمميز وعد /100/ والأفضل /200/ كرية بيضاء، ثم نحسب عدد الكريات في كل عمود لحساب النسبة المئوية لكل نوع من الكريات البيضاء.

ومن دراسة هذه النسب ومقارنتها مع الصيغة الكريوية الطبيعية للحيوان المدروس يمكن تحديد الحالة الصحية له، ويعتبر الدم المرآة الحقيقية للجسم, والحقيقة أن هذا الاختبار يعطينا صورة واضحة ومعلومات جداً دقيقة وهامة حول الوضع الصحي للحيوان.

وتحديد الصيغة الكريوية يظهر الانحراف عن الطبيعي فقط في العدد النسبي للأنواع المختلفة للكريات البيضاء، أما الانحراف في عدد الكريات البيضاء في واحدة حجم فيمكن تحديدة فقط عند حساب العدد العام للكريات البيضاء.