



**Faculty of Biological Science and Technology**  
**Zoology and Botanical Department**  
**Practical Animal physiology**

**شمارش حجمی گلبول های سفید**  
**White Blood Cell Count (WBC)**

**By: Shirin Kashfi**

**Ph.D in Animal Development**

**Sh.kashfi@staf.ui.ac.ir**



هدف از این آزمایش معلوم کردن این است که در حجم معینی (یک میلیتر مکعب) از خون یک فرد یا جانور، تعداد کل گلبول های سفید چقدر است

Massoud Laboratory  
آزمایشگاه مسعود

نام پرورشگر: [REDACTED]  
شماره اشتراک: EE5976  
تاریخ پذیرش: 1398/07/01  
سن: 33 سال  
(ت اجتماعی)

صفحه: 1/3 Full Report Checked By: Dr. as

**Biochemistry - Serum**

Test	Result	Reference Intervals(Sex & Age adjusted)
Uric Acid	6.6 mg/dL	Men: 3.6 - 7.7 Women: 2.5 - 6.8

Checked By: Dr. M

**Hematology CBC WBCs - Whole Blood**

Test	Result	Reference Intervals(Sex & Age adjusted)
WBC	4.8 $10^3/\mu\text{L}$	4-10
Neutrophils #	2.5 $10^3/\mu\text{L}$	1.5-8
Lymphocytes#	1.6 $10^3/\mu\text{L}$	0.8-4.8
Monocyte #	0.4 $10^3/\mu\text{L}$	0.2-1
Eosinophil#	0.3 $10^3/\mu\text{L}$	0.01-0.8
Basophil#	0.0 $10^3/\mu\text{L}$	0-0.2
Neutrophil	53.7 %	38-80
Lymphocyte	32.7 %	18-50
Monocyte	7.5 %	2-10
Eosinophil	5.8 %	0-5
Basophil	0.3 %	0-2

**Hematology CBC - RBCs - Whole Blood**

Test	Result	Reference Intervals(Sex & Age adjusted)
RBC	4.41 Million/ $\mu\text{L}$	3.8-5.4
Hb	13.5 g/dL	11.9-15.9
Hct	41.5 %	35-47
MCV	94.1 fL	80-100
MCH	30.6 pg	27-33
MCHC	32.5 g/dL	32-36
RDW-CV	13.0 %	11.5-14.5

**Hematology CBC - Platelets - Whole Blood**

Test	Result	Reference Intervals(Sex & Age adjusted)
Platelet	212 $10^3/\mu\text{L}$	140-450
PCT	0.24 %	
MPV	11.1 fL	7.2-12
PDW	17.6 %	9.0-20

1 microliter ( $\mu\text{L}$ ) = 1 cubic millimeter ( $\text{mm}^3$ )



- ▶ میزان طبیعی گلبول های سفید در جریان خون یک فرد بالغ بین ۴۰۰۰ تا ۱۱۰۰۰ عدد در هر میلی متر مکعب است
- ▶ تعداد طبیعی گلبول های سفید به سن افراد بستگی دارد و در بچه ها بیشتر است (تا  $20000/mm^3$ )

### ▶ leukocytosis

- ▶ به افزایش تعداد گلبول های سفید در جریان خون بیشتر از محدوده طبیعی گفته می شود. علت ایجاد لوکوسیتوزیس بسیار گوناگون است
  - ▶ لکوسیتوز فیزیولوژیک: مانند ورزش یا استرس
  - ▶ لکوسیتوز پاتولوژیک: مانند التهاب یا عفونت

### ▶ Leukopenia

- ▶ به کاهش تعداد گلبول های سفید در جریان خون به کمتر از محدوده طبیعی گفته می شود مانند آپلازی مغز استخوان، مصرف برخی از داروها



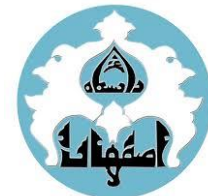
## روش شمارش حجمی گلبول های سفید

► مواد و وسایل مورد نیاز:

خون کامل (مخلوط شده با ضد انعقاد)، محلول مارکانو، لوله آزمایش، سمپلر و سر سمپلر مناسب، پنبه و الکل، لام شمارش حجمی (هموسیتومتر) نتوبار همراه با لامل مخصوص (لامل سنگین) و میکروسکوپ

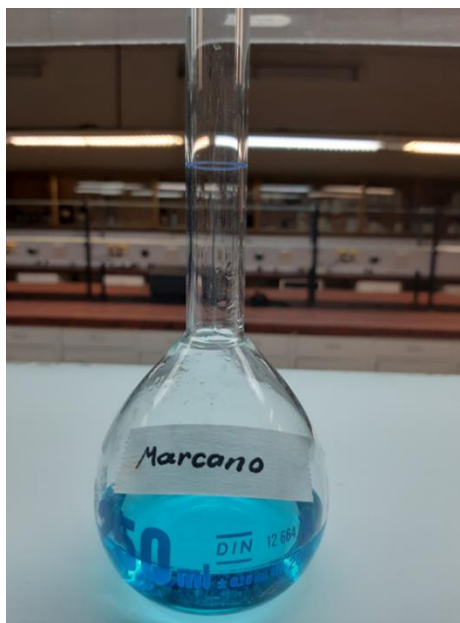
- در صورتی که خون در لوله آزمایش رقیق نشود از پپیت ملانژور سفید برای رقیق کردن خون جهت شمارش حجمی گلبول های سفید استفاده می شود
- استفاده از پپیت ملانژور به دلیل حجم کم مورد استفاده و شکستن نوک آن و ایجاد اشکال در کالیبراسیون و نیز کارکردن دقیق با آنها نیاز به مهارت خاصی دارد توصیه نمی شود





## محلول مارکانو (Marcano's solution)

- ▶ از محلول مارکانو برای شمارش گلبول های سفید استفاده می شود
- ▶ ترکیب محلول مارکانو شامل اسید استیک ۴٪ و چند قطره محلول متیلن بلو ۱٪ است
- ▶ اسید استیک موجود در محلول مارکانو موجب لیز سلول های خونی می شود و متیلن بلو باعث رنگ شدن غیر افتراقی هسته گلبول های سفید می شود.
- ▶ به این ترتیب هسته گلبول های سفید قابل رویت و در نتیجه شمارش می شوند
- ▶ این محلول موجب رقیق شدن خون نیز می شود که به این ترتیب شمارش گلبول های سفید با سهولت بیشتری انجام می گیرد



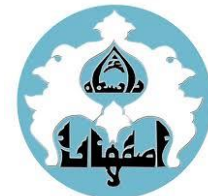


## سمپلر (sampler)

- ▶ برای برداشت خون، محلول و انتقال مخلوط خون و محلول روی لام شمارش حجمی از سمپلر استفاده می شود
- ▶ در این آزمایش از سمپلرهای ۱۰۰۰-۱۰۰ و ۲۰-۱ میکرولیتر متغیر و ۵۰ میکرولیتر ثابت یا متغیر استفاده می شود



1 milliliter (ml) = 1000  $\mu$ l



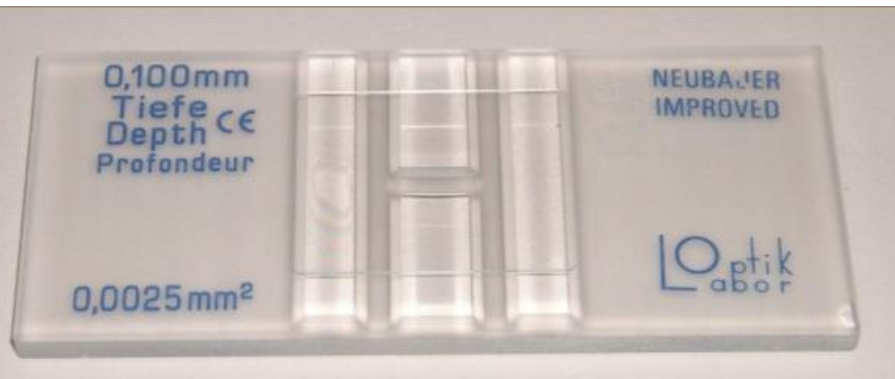
## نحوه استفاده از سمپلر



- ▶ در صورتی که از سمپلرهای متغیر استفاده می شود، ابتدا حجم مورد نظر با استفاده از پیچ مخصوص در بالای سمپلر تنظیم می شود
- ▶ سمپلر مطابق با شکل روبرو در دست گرفته می شود
- ▶ سر سمپلر به سمپلر متصل می شود
- ▶ با فشار دادن شاسی سمپلر با شست به سمت پایین و تا توقف اول در سر سمپلر خلاء ایجاد می شود؛ سپس سر سمپلر کاملاً وارد محلول شده و به آرامی شاسی رها می شود تا سر سمپلر از حجم مورد نظر از محلول مورد نظر پر شود
- ▶ سر سمپلر در ظرفی که برای وارد کردن محلول در نظر گرفته شده وارد شده و شاسی تا توقف دوم به سمت پایین فشار داده می شود



## لام هموسیتومتر نئوبار اصلاح شده (Improved Neubauer haemocytometer)



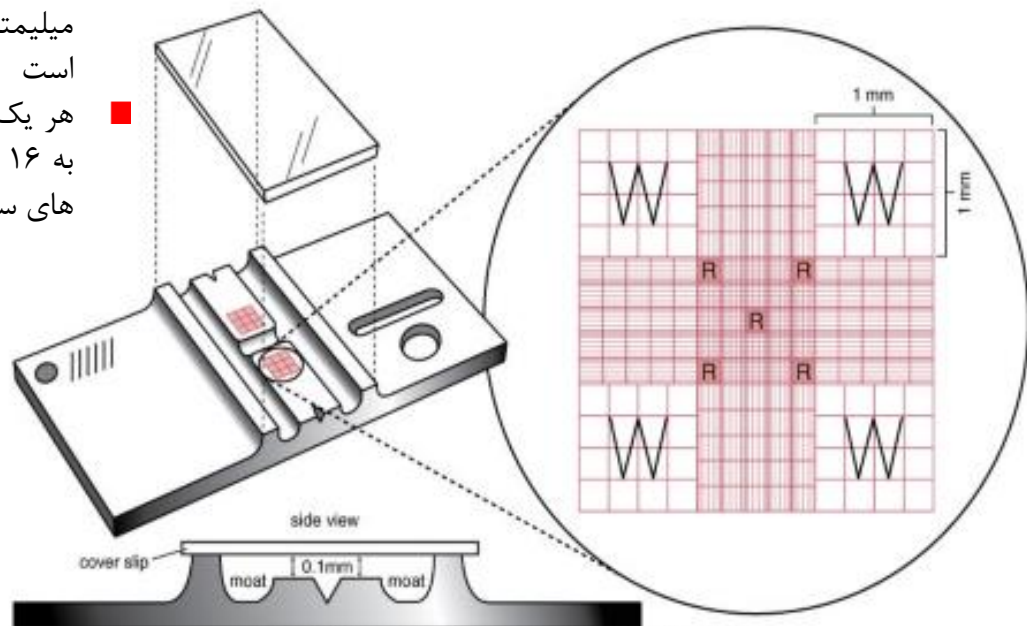
- لام هموسیتومتر لامی است که با استفاده از آن می توان تعداد یک نوع سلول را در حجم معینی از یک سوسپانسیون سلولی به دست آورد
- لام مورد استفاده لامل ویژه ای است که ضخیم تر از لامل های معمولی است و قابلیت انعطاف کمتری دارد؛ بنابراین تنش سطحی مایع تغییر شکلی در آن ایجاد نمی کند
- روی لام های هموسیتومتر دو ناحیه جهت شمارش سلولی به صورت مشبک طراحی شده است (counting chamber) که کار شمارش سلول را بسیار راحتتر می کند

■ محفظه شمارش مورد استفاده جهت شمارش سلولی از یک مربع ۳ در ۳ میلیمتر بزرگ تشکیل شده که به ۹ مربع ۱ در ۱ میلیمتر تقسیم شده است

■ هر یک از مربع های ۱ در ۱ میلیمتر بزرگ که در چهار گوشه قرار دارند به ۱۶ مربع متوسط تقسیم شده اند (از این مربع ها برای شمارش گلبول های سفید استفاده می شود)

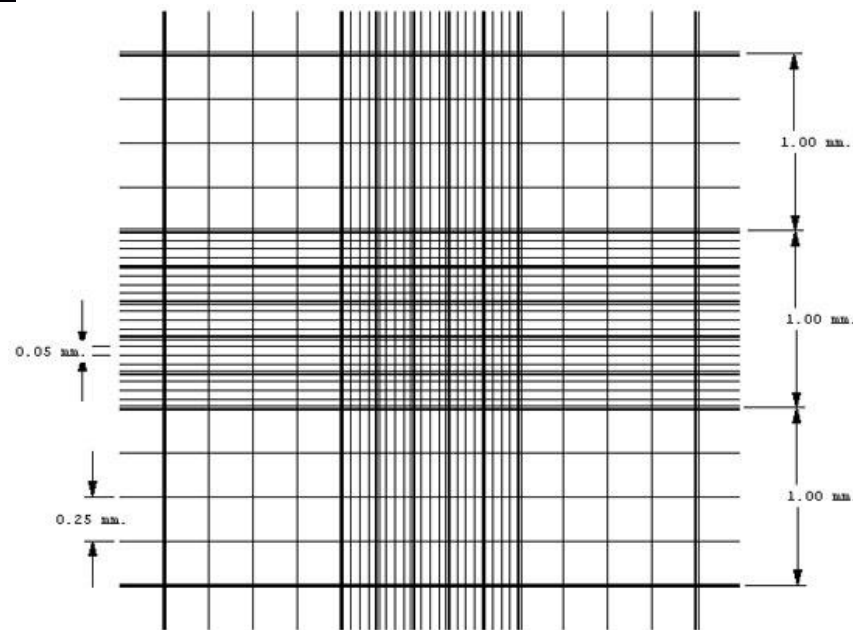
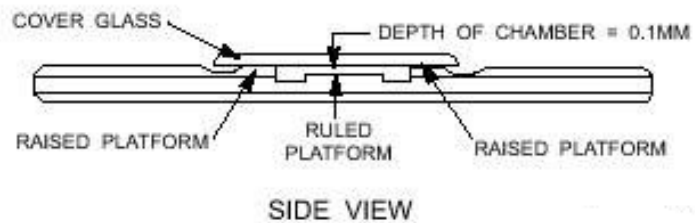
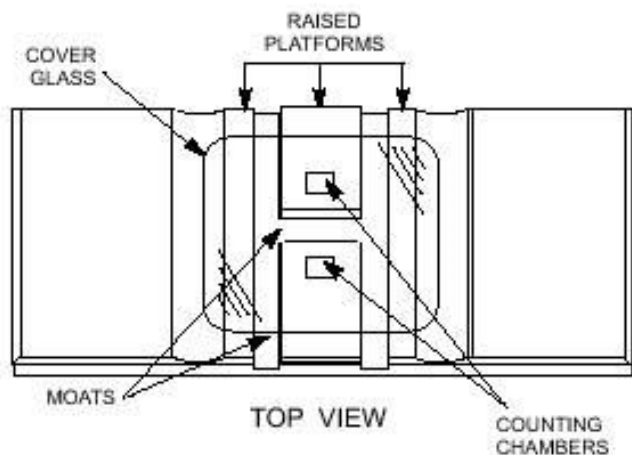
■ مربع مرکزی در لام نئوبار اصلاح شده به ۲۵ مربع متوسط تقسیم شده که هر یک خود به ۱۶ مربع کوچکتر تقسیم شده اند (از مربع مرکزی جهت شمارش گلبول های قرمز استفاده می شود)

■ لامی که روی نمونه گذاشته می شود در ارتفاع مشخصی قرار می گیرد که به طور استاندارد در همه انواع لام های هموسیتومتر ۰/۱ میلیمتر است



(From Rodak BF. Hematology: clinical principles and applications, ed 2, Philadelphia, 2002, Saunders.)





لام های هموسیتومتر ضخیم تر از لام های معمولی هستند؛ بنابراین هنگام کار با آنها مراقب باشید که عدسی شیئی به لام برخورد نکند



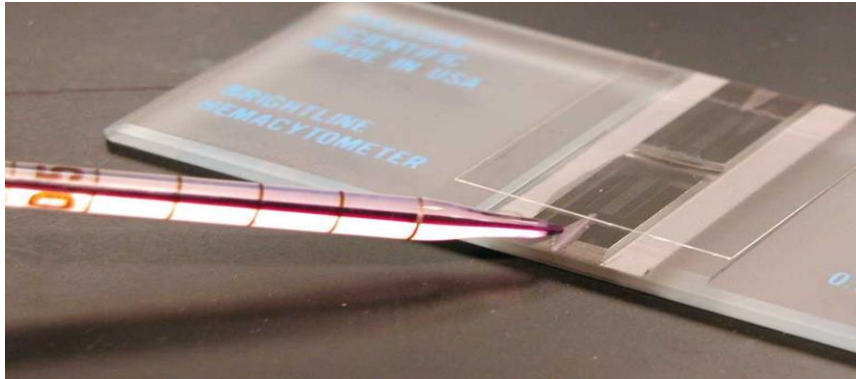
## رقیق کردن خون جهت شمارش حجمی گلبول های سفید

- ▶ برای رقیق کردن خون بدون استفاده از پیپت ملانژور سفید به روش زیر عمل کنید:
- ▶ در یک لوله آزمایش ۹۵۰µl محلول مارکانو با کمک سمپلر ۱۰۰۰µl متغیر بریزید
- ▶ با کمک سمپلر مناسب دیگری ۵۰µl خون کامل به محلول مارکانو داخل لوله آزمایش اضافه نمایید. دقت کنید که پس از کشیدن خون به داخل سمپلر حتماً اطراف سرسمپلر را با پنبه پاک کنید تا خون اضافه وارد محلول مارکانو نشود. به این ترتیب خون را بیست مرتبه رقیق کرده اید
- ▶ ضریب رقت را به خاطر داشته باشید؛ هر ضریب رقتی به کار رود، بعداً در محاسبه تعداد نهایی سلول ها در نظر گرفته می شود
- ▶ به آرامی چند بار پیپتاژ کنید تا خون و محلول مارکانو به خوبی با یکدیگر مخلوط شوند. مراقب باشید مخلوط خون و مارکانو کف نکند
- ▶ مخلوط آماده شده را ۵ دقیقه در حرارت اتاق نگهدارید
- ▶ سوسپانسیون سلولی باید قبل از قرار گرفتن روی لام هموسیتومتر به خوبی تهیه شود و همگن باشد. سلول هایی که به یکدیگر چسبیده اند در شمارش اشکال ایجاد می کنند



## روش انتقال سوسپانسیون سلولی روی لام هموسیتومتر

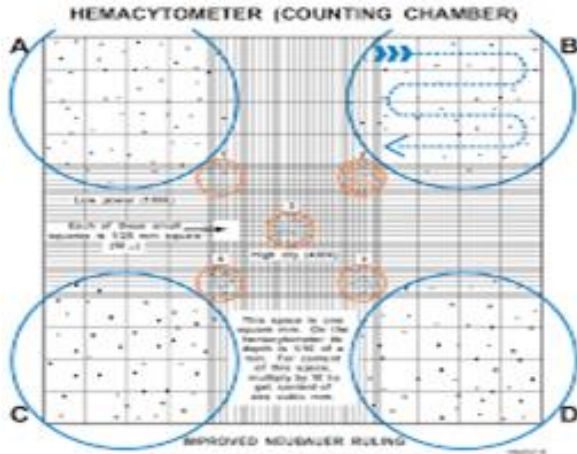
- ▶ لامل را روی محفظه شمارش لام هموسیتومتر قرار دهید
- ▶ خون و محلول مارکانو را به خوبی با یکدیگر همگن کنید
- ▶ یک قطره (به میزان ۱۰ الی ۱۵ میکرولیتر) از مخلوط خون و مارکانو همگن شده را با کمک سمپلر مناسب بردارید
- ▶ نوک سمپلر را کنار لامل قرار داده و مخلوط خون و مارکانو را کاملاً در زیر لامل و روی محفظه شمارش تخلیه کنید
- ▶ میزان خون و مارکانو برداشته شده باید به اندازه ای باشد که فقط روی سطح محفظه شمارش را پر کند و محلول اضافه ای برای سرریز در شیارهای لام وجود نداشته باشد
- ▶ در صورتی که مخلوط خون و مارکانو روی لامل بیاید باز هم شمارش اشتباه خواهد شد



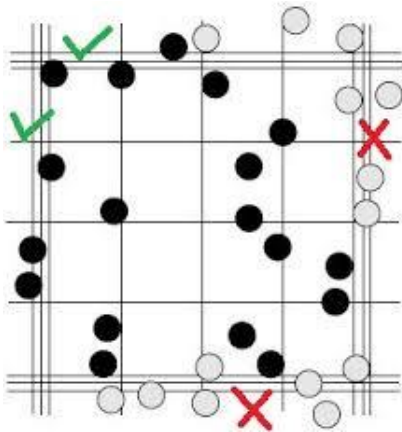
- تراکم سلول ها نه باید زیاد و نه کم باشد. اگر تراکم زیاد باشد سلول ها همپوشانی داشته و شمارش مشکل می شود؛ اگر تراکم کم باشد خطای آماری ایجاد می شود و لازم می گردد که شمارش در تعداد بیشتری مربع انجام گیرد که کار زمانبری است
- سلول ها باید بین مربع ها یکنواخت توزیع شده باشند



## روش شمارش گلبول های سفید



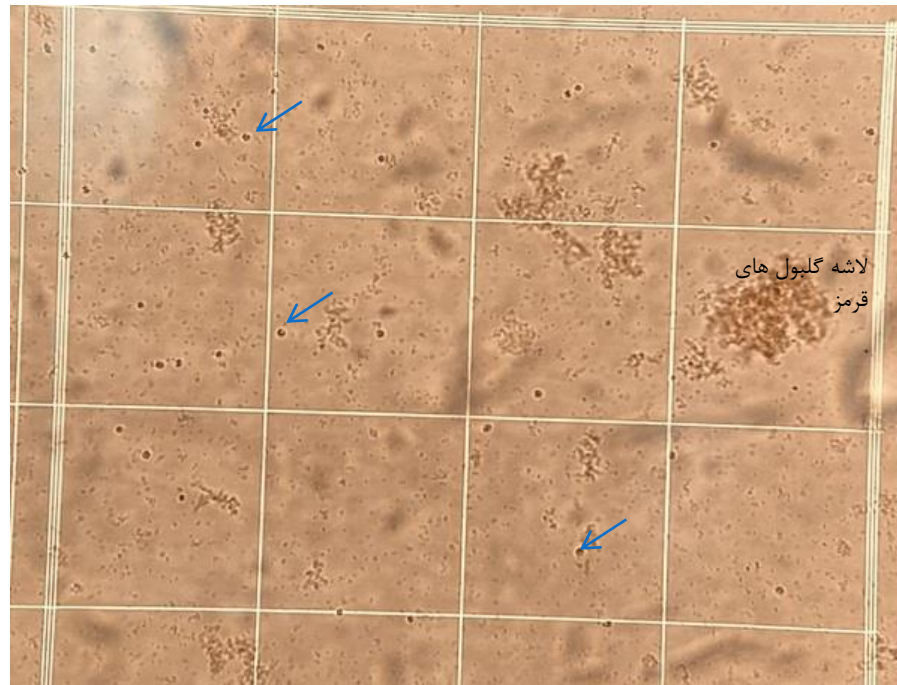
- ▶ با عدسی ۴ ناحیه شمارش روی لام هموسیتومتر را ببایید. از عدسی 10X برای شمارش استفاده کنید
- ▶ هنگام شمارش باید سلول ها کاملاً بی حرکت و مستقر شده باشند
- ▶ برای شمارش گلبول های سفید از مربع های ۱ در ۱ کناری استفاده می شود
- ▶ در هر مربع ۱\*۱ میلی متر از مربع کوچک واقع در سمت چپ ردیف اول شمارش را شروع کرده و در آخرین مربع سمت چپ ردیف چهارم شمارش را خاتمه دهید
- ▶ فقط سلول هایی شمارش می شوند که کاملاً در داخل مربع ۱\*۱ واقع شده باشند
- ▶ در هنگام شمارش آن دسته از سلول هایی که روی خطوط مرزی قرار می گیرند نیازمند توجه ویژه ای هستند و فقط سلول هایی شمارش می شوند که روی خطوط بالا و سمت چپ قرار دارند. در صورتی که لام هموسیتومتری که استفاده می کنید دارای خطوط سه گانه مرزی است خط وسط ملاک عمل است
- ▶ شمارش در هر دو محفظه شمارش روی لام هموسیتومتر باید انجام شود؛ اگر نتیجه نهایی خیلی باهم تفاوت داشت، نشان دهنده نمونه برداری نادرست است





## روش شمارش گلبول های سفید

- ▶ گلبول های سفید با عدسی شیئی ۱۰ و در یک زمینه روشن به صورت نقاط تیره ای دیده می شوند (مانند تصویر زیر)
- ▶ تنظیم نور و کندانسور میکروسکوپ برای مشاهده بهتر بسیار اهمیت دارد. اگر کندانسور در موقعیت مناسبی نباشد ممکن است سلول ها را نبینید
- ▶ ذرات دیگر مانند آشغال، لاشه گلبول های قرمز یا باکتری ها را نباید با سلول مورد نظر اشتباه گرفت
- ▶ در صورت لزوم می توان از عدسی ۴۰ برای تشخیص بهتر گلبول های سفید از سایر ذرات استفاده کرد



گلبول های سفید هنگام شمارش با لام نئوبار. تصویر در آزمایشگاه فیزیولوژی جانوری دانشگاه اصفهان تهیه شده است



## روش محاسبه تعداد گلبول های سفید در یک میلیمتر مکعب خون

- ▶ تعداد کل گلبول های سفید موجود در ۴ مربع کناری را شمارش کرده و میانگین آن را به دست آورید
- ▶ در صورتی که خون را ۱۰ مرتبه رقیق کرده اید، عدد به دست آمده را در ۱۰۰ و در صورتی که خون را ۲۰ مرتبه رقیق کرده اید، عدد به دست آمده را در ۲۰۰ ضرب کنید تا تعداد کل گلبول های سفید در یک میلیمتر مکعب از نمونه خون مورد نظر به دست آید
- ▶ به طور مثال اگر میانگین تعداد گلبول های سفید شمارش شده ۴۵ عدد باشد و خون ۲۰ بار رقیق شده باشد، خواهیم داشت:

$$۴۵ * ۲۰۰ = ۹۰۰۰ / \text{mm}^3$$

### ● چگونگی به دست آوردن ضریب ۲۰۰

چون خون ۱ به ۲۰ رقیق شده است؛ بنابراین برای به دست آوردن تعداد گلبول های سفید در خون رقیق نشده باید تعداد را در ۲۰ ضرب کنید  
چون حجم بین لام و لامل ۰/۱ میلیمتر مکعب (۱\*۱\*۰/۱) است، برای به دست آوردن تعداد گلبول های سفید در یک میلیمتر مکعب باید تعداد را در ۱۰ ضرب کنید  
پس داریم:

$$۲۰۰ = (\text{ضریب حجم}) * ۱۰ * (\text{ضریب رقت}) ۲۰$$

**Thank you for your attention!**



**Questions?**

